

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Zentrum für Frauen- und  
Kinderheilkunde, Ernst von Bergmann Klinikum Potsdam

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Radke

in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung  
Potsdam-Rehbrücke, Abteilung für Gastrointestinale Mikrobiologie

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Michael Blaut

# **Evaluation von Methoden zum Nachweis von Bifidobakterien in Frauenmilch**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Manuela Görsdorf  
geb. am 04.02.1980 in Jena

aus Potsdam

Rostock, Oktober 2012

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Michael Radke  
Chefarzt der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Ernst von Bergmann Klinikum Potsdam

2. Gutachter:

PD Dr. med. habil. Thomas Erler  
Chefarzt der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Carl-Thiem-Klinikum Cottbus

3. Gutachter:

PD Dr. med. habil. Frank Walther  
Kinder- und Jugendklinik  
Universitätsmedizin Rostock

**Datum der Einreichung:** 30. Oktober 2012

**Datum der Verteidigung:** 04. Juni 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Material.....</b>	<b>10</b>
<b>Material Vorstudie .....</b>	<b>10</b>
<b>2. 1. Auswahlkriterien.....</b>	<b>10</b>
<b>2. 2. Gewinnung der Frauenmilchproben, Transport und Lagerung .....</b>	<b>10</b>
<b>Material Hauptstudie .....</b>	<b>12</b>
<b>2. 3. Auswahlkriterien.....</b>	<b>12</b>
<b>2. 4. Gewinnung der Frauenmilchproben, Transport und Lagerung .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>Methoden Vorstudie .....</b>	<b>15</b>
<b>3. 1. Kulturelle Analyse.....</b>	<b>15</b>
<b>3. 2. DNA-Extraktion .....</b>	<b>16</b>
3. 2. 1. DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform .....	17
3. 2. 2. DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit.....	18
<b>3. 3. Polymerase-Kettenreaktion .....</b>	<b>19</b>
3. 3. 1. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R .....	19
3. 3. 2. PCR mit den Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r .....	20
3. 3. 3. Verdünnungsreihen.....	21
3. 3. 4. Variation der Annealing-Temperatur .....	21
3. 3. 5. Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 58 °C.....	21
<b>3. 4. Zusatz von Bifidobacterium infantis ATCC•15702™ in Milchproben .....</b>	<b>22</b>
<b>3. 5. Verarbeitung von Kuhmilch.....</b>	<b>23</b>
<b>3. 6. Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>23</b>
<b>3. 7. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten .....</b>	<b>24</b>
3. 7. 1. Klonierung auf Grundlage der Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R.....	24
<b>Methoden Hauptstudie .....</b>	<b>26</b>
<b>3. 8. DNA-Extraktion mittels FastDNA• SPIN Kit .....</b>	<b>26</b>
<b>3. 9. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R.....</b>	<b>26</b>
<b>3. 10. Ermittlung der unteren Nachweisgrenze .....</b>	<b>27</b>
<b>3. 11. PCR mit der omnitag-OLS•-DNA-Polymerase.....</b>	<b>27</b>

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
<b>Ergebnisse Vorstudie</b> .....	<b>29</b>
<b>4. 1. Kulturelle Analyse</b> .....	<b>29</b>
<b>4. 2. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R</b> .....	<b>29</b>
<b>4. 3. PCR mit den Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r</b> .....	<b>33</b>
<b>4. 4. Verdünnungsreihen</b> .....	<b>33</b>
<b>4. 5. Variation der Annealing-Temperatur</b> .....	<b>33</b>
<b>4. 6. Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 58 °C</b> .....	<b>35</b>
<b>4. 7. Zusatz von Bifidobacterium infantis ATCC•15702™ in Milchproben</b> .....	<b>36</b>
<b>4. 8. Verarbeitung von Kuhmilch</b> .....	<b>39</b>
<b>4. 9. Klonierung auf Grundlage der Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R</b> .....	<b>40</b>
<b>Ergebnisse Hauptstudie</b> .....	<b>42</b>
<b>4. 10. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R</b> .....	<b>42</b>
<b>4. 11. Statistische Analyse</b> .....	<b>47</b>
<b>4. 12. Ermittlung der unteren Nachweisgrenze</b> .....	<b>48</b>
<b>4. 13. PCR mit der omnitag-OLS•-DNA-Polymerase</b> .....	<b>49</b>
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>51</b>
<b>5. 1. Diskussion der Ergebnisse der Vorstudie</b> .....	<b>51</b>
<b>5. 2. Diskussion der Ergebnisse der Hauptstudie</b> .....	<b>60</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>Thesen zur Dissertation</b> .....	<b>77</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>83</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>85</b>
<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	<b>92</b>

## 1. Einleitung und Zielstellung

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass der Magen-Darm-Trakt des Feten steril ist.

Die bakterielle Besiedlung erfolgt unter der Geburt sowie in den ersten Stunden und Tagen postnatal mit Keimen, die in erster Linie von der Mutter und aus der Umwelt stammen (31, 50, 58).

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die sich damit auseinandersetzen, dass bereits während der Schwangerschaft, das heißt schon vor der Geburt eine bakterielle Kolonisation des Feten stattfinden könnte (4, 22, 23). In den Studien von Jiménez et al. wurde gezeigt, dass Darmbakterien der Mutter über die Plazenta an den Feten weitergegeben werden. Enterokokken konnten sowohl im Nabelschnurblut von Neugeborenen, die durch elektive Sectio caesarea geboren wurden, nachgewiesen werden (22), als auch aus Mekonium von gesunden Neugeborenen isoliert werden (23). Die Gruppe um Schultz (54) konnte probiotische Keime, welche die Mutter in der Spätschwangerschaft aufgenommen hatte, aus Stuhlproben von Neugeborenen isolieren, die durch Sectio caesarea geboren wurden.

Die mikrobiologische Besiedlung des Magen-Darm-Trakts Neugeborener unter und nach der Geburt ist initial hauptsächlich vom Geburtsmodus und der Umwelt abhängig (14, 44, 51). Im weiteren Verlauf spielt die Art der Ernährung eine entscheidende Rolle. Bei der Ernährung mit Frauenmilch bildet sich im Darm der gestillten Säuglinge in den ersten zwei Lebenswochen eine spezifische Flora aus, die sich zu über 95% aus Bifidobakterien zusammensetzt, neben einer geringen Menge von Laktobazillen und potentiell pathogenen Keimen (2, 17, 26, 57, 65).

Erstmals wurde 1905 durch Tissier beschrieben, dass Frauenmilch die Entstehung einer von Bifidobakterien dominierten Darmflora begünstigt (61).

Beim nicht mit Frauenmilch ernährten Säugling hingegen, entsteht eine mannigfaltige Darmflora, die neben Bifidobakterien und Laktobazillen zu einem Großteil auch Enterobakterien, Enterokokken, Bacteroides und Clostridium difficile enthält (13, 18, 29, 44, 57).

Die Erstbeschreibung der Bifidobakterien geht auf Tissier im Jahre 1900 (60) zurück.

In den folgenden Jahren und Jahrzehnten wurde versucht, diese Bakterienspezies eingehend zu untersuchen. Bis Mitte der 60er Jahre wurden Bifidobakterien als Spezies

*Lactobacillus bifidus* im Genus *Lactobacillus* geführt (8, 46). Im Verlauf wurde die Zugehörigkeit zu dieser Gattung jedoch angezweifelt (8) und die Bifidobakterien wurden als eigene Spezies unter dem Stamm der Actinobacteria eingeordnet (24, 55).

Bifidobakterien sind anaerobe, grampositive, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, deren typischer Lebensraum der menschliche und tierische Magen-Darm-Trakt ist. Durch die Bildung von Milch- und Essigsäure aus Laktose beeinflussen sie den pH-Wert des Chymus und unterdrücken auf diese Weise das Wachstum und die Proliferation pathogener Bakterien im Darm (10, 19, 28, 42, 63).

Derzeit werden laut der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) 40 Arten von Bifidobakterien unterschieden. Beim Menschen konnten Bifidobakterien hauptsächlich aus dem Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt sowie aus der Mundhöhle isoliert werden (6, 53). Weiterhin wird ein Vorkommen von Bifidobakterien im Intestinaltrakt warmblütiger Tiere und von Honigbienen beschrieben. Auch aus Abwasser, fermentierter Milch und bei anaerober Gärung konnten einzelne Arten von Bifidobakterien isoliert werden (6, 24, 28).

Der Nachweis von Bifidobakterien aus dem Stuhl von Säuglingen, die ausschließlich durch Frauenmilch ernährt werden, gelang in den letzten Jahren problemlos mittels kultureller Analysemethoden und im Verlauf auch mittels kulturunabhängiger molekularbiologischer Methoden. Bei gestillten Säuglingen konnten vor allem *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* und *Bifidobacterium bifidum* isoliert werden (5, 32, 37).

Im Klinischen Wörterbuch Pschyrembel (258. Auflage) aus dem Jahr 1998 war nachzulesen, dass Bifidobakterien neben oben genannten Quellen auch in Frauenmilch vorhanden sind. Jedoch konnten in der vorhandenen Fachliteratur und den Veröffentlichungen im Jahre 2006, in Vorbereitung auf die vorliegende Studie, nur wenige Nachweise über das Vorhandensein von Bifidobakterien in Frauenmilch gefunden werden.

Frauenmilch ist in den letzten Jahren und Jahrzehnten eingehend untersucht worden. Es wurden die Bestandteile der Frauenmilch analysiert sowie Ursachen für ihre immunologischen und infektionspräventiven Eigenschaften beschrieben (1, 10, 20, 21, 30, 49). Weiterhin konzentrierte sich die Forschung auf Bakterien und Viren, die durch das Stillen auf den Säugling übertragen werden können.

Ein großes Augenmerk wurde auch auf Wachstumsfaktoren in der Frauenmilch gelegt, die das Entstehen der Bifidusflora unterstützen (5, 18, 29).

In Frauenmilch wurde dazu seit 1957 ein Bifidusfaktor vermutet, der das Wachstum von Bifidobakterien im Darm der gestillten Säuglinge begünstigt (9). Gänzlich geklärt ist diese Frage bis heute noch nicht. Die Ergebnisse neuerer Studien deuten darauf hin, dass die Oligosaccharide der Frauenmilch möglicherweise den Bifidusfaktor darstellen, der für die Zunahme des Bestandes an Bifidobakterien im Darm gestillter Säuglinge verantwortlich ist (26, 27).

Wenig im Fokus stand die mikrobiologische Zusammensetzung der Frauenmilch. Im Laufe der letzten Jahre, parallel zu den durchgeführten Untersuchungen der hier vorliegenden Studie, wurden die ersten Arbeiten veröffentlicht, die Bifidobakterien in Frauenmilch nachweisen konnten (2, 3, 11, 15, 16, 33, 37, 45, 57, 62).

Neben den geglückten Nachweisen von Bifidobakterien und bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilchproben entstand die Frage, wie die bakterielle DNA und die Bifidobakterien selber in die Milch gelangen.

Eine Vermutung bestand darin, dass im Anschluss an die orale Besiedlung des Kindes mit vaginalen Bakterien unter der Geburt, durch zeitnahes Anlegen des Neugeborenen an die mütterliche Brust, diese Bakterien auf die Brustdrüse übertragen werden und im Verlauf eine Quelle für den kindlichen Magen-Darm-Trakt darstellen.

Die Studie von Sinkiewicz und Nordström (56) beschrieb hierzu die Annahme, dass sich die sterile Frauenmilch bei der Passage durch die Brustwarze mit Bakterien wie Laktobazillen und Bifidobakterien anreichert und diese dann vom Säugling aufgenommen werden. Für eine Reihe an Bakterien, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt besiedeln, trifft die Aussage zu, dass die Keime der mütterlichen Haut über die Milchgänge in die Brust und damit in die Frauenmilch gelangen (45, 64).

In anderen Untersuchungen konnte hingegen gezeigt werden, dass die Frauenmilch selbst die Quelle für die Laktobazillen und Bifidobakterien darstellt, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt postnatal besiedeln (16, 34, 35, 36, 45). Martín et al. konnten 2003 zeigen (34), dass weder die Bakterien, die von der Hautoberfläche im Brustbereich isoliert werden konnten, noch die Bakterien, die aus Vaginalabstrichen stillender Mütter gewonnen wurden, den untersuchten Laktobazillen aus dem Stuhl der gestillten Säuglinge ähnelten. Die gleiche Forschergruppe zeigte 2007 (36), durch die Untersuchung von Frauenmilch und Stuhlproben, dass die Geburtsmethode eine

untergeordnete Rolle bei der Besiedlung des Magen-Darm-Trakts mit Laktobazillen bei gestillten Kindern darstellt.

Obwohl diese Studien belegen, dass die Frauenmilch selbst die Quelle der Laktobazillen und Bifidobakterien ist, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt besiedeln, ist mit dem heutigen Forschungsstand noch nicht hinreichend erklärt, wie die Bifidobakterien in die Frauenmilch gelangen.

Im Jahr 2007 wurde durch die Gruppe um Perez eine weitere Theorie zu dieser Frage aufgestellt (45). Es wurde die Annahme formuliert, dass durch bakterielle Translokation mittels mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, Bakterien aus der Darmflora der Mutter durch das mütterliche Kreislaufsystem in die Brustdrüse transportiert werden. Auf diese Weise könnten Bifidobakterien in die Frauenmilch gelangen. Es konnten in der Untersuchung die gleichen rDNA Sequenzen von Bifidobakterien in Stuhlproben von Mutter und Säugling sowie im mütterlichen Blut und in der Frauenmilch nachgewiesen werden.

Um diese Theorie der Translokation empirisch auf breiter Basis zu belegen und die Frage zu klären, wie die Bifidobakterien und deren bifidobakterienspezifische DNA in die Frauenmilch gelangen, müssten weitere Studien folgen.

## **Zielstellung**

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Bifidobakterien mit Hilfe einer bisher nicht eingesetzten molekularbiologischen Methode in Frauenmilchproben gesunder Probandinnen nachzuweisen.

Wie im Vorfeld beschrieben, existierten im Jahre 2006, während der Vorbereitung auf die vorliegende Studie, nur wenige Veröffentlichungen über Nachweise von Bifidobakterien aus Frauenmilchproben.

Parallel zu den hier vorgestellten Untersuchungen wurden mehrere Arbeiten von internationalen Forschergruppen veröffentlicht, die sich, wie oben beschrieben, mit der gleichen Fragenstellung auseinandersetzten.

Im Rahmen von Vorstudien zur vorliegenden Untersuchung wurden verschiedene Verfahren des Transports, der Verarbeitung, der kulturellen Analyse und der molekularbiologischen Weiterverarbeitung getestet, um optimale Bedingungen für die Frauenmilchproben der Hauptstudie zu definieren.



Für die sich anschließende Hauptstudie wurden Frauenmilchproben parallel aus der unbehandelten Brust einer Seite und der vorher keimreduzierten Brust der Gegenseite an drei verschiedenen Abnahmetagen gewonnen.

Ziel war es, auf diese Weise das Vorhandensein von Bifidobakterien zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entbindung zu untersuchen. Weiterhin sollte getestet werden, ob sich eine Keimreduktion vor der Abnahme auf den Nachweis der Bifidobakterien aus den Milchproben auswirkt, da die Frage, wie die Bifidobakterien in die Frauenmilch gelangen, nach wie vor nicht endgültig geklärt ist.

Diese Dissertationsschrift ist ein Beitrag zum Nachweis von Bifidobakterien in Frauenmilch unter Verwendung verschiedener methodischer Vorgehensweisen.

Das Einverständnis der Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg zur Durchführung der Studie wurde im November 2006 eingeholt.

Die vorliegende Studie wurde vom Nestlé Nutrition Institute, Schweiz gesponsert.

## 2. Material

### Material Vorstudie

#### 2. 1. Auswahlkriterien

Im Rahmen der Vorstudien erfolgte eine zufällige Auswahl von gesunden Frauen als Probandinnen für die Gewinnung der Frauenmilchproben, unabhängig vom Verlauf der Schwangerschaft, der Art und dem Zeitpunkt der Entbindung oder einer Medikamenteneinnahme.

#### 2. 2. Gewinnung der Frauenmilchproben, Transport und Lagerung

Von Dezember 2006 bis August 2007 wurde bei insgesamt 24 Probandinnen je eine Frauenmilchprobe abgenommen.

Es wurde kein fester Abnahmetag für die Frauenmilchgewinnung im Rahmen der Vorstudien definiert, die Abnahme erfolgte ab dem 3. Tag bis zum 91. Tag nach der Entbindung, siehe Tabelle 1.

Dabei wurde von 19 Probandinnen vor dem 10. Tag postpartal Frauenmilch abgenommen, frühestens am 3. Tag und spätestens am 7. Tag nach der Entbindung. Bei 5 Probandinnen erfolgte die Abnahme der Frauenmilch nach dem 10. Tag postpartal, frühestens am 13. Tag und spätestens am 91. Tag nach der Entbindung.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Abnahmetage Frauenmilchproben Vorstudie

Abnahmetag postpartal	Probandin Nummer	Anzahl der Proben
3. Tag	4, 22	2
4. Tag	2, 8, 11, 12, 20, 21, 23	7
5. Tag	3, 5, 10, 13	4
6. Tag	16, 17, 18, 19	4
7. Tag	9, 24	2
13. Tag	6	1
21. Tag	1	1
24. Tag	7	1
32. Tag	15	1
91. Tag	14	1

Eine weitere Übersicht über alle Entnahmetage befindet sich im Anhang, siehe Tabelle 2. Die Gewinnung der Frauenmilch erfolgte jeweils nur aus einer Brust einer jeden Probandin ohne vorherige Reinigung der Brustwarze und des Warzenhofes. Die Abnahme erfolgte unabhängig vom Zeitpunkt des letzten Stillens und die Vormilch wurde nicht verworfen.

Bei der 1. Probandin wurde die Frauenmilch für die Probengewinnung per Hand ausgestrichen. Im weiteren Verlauf erfolgte die Abnahme mit Hilfe einer vaporisierten Hand-Brustpumpe der Firma MEDela (Deutschland; Darstellung siehe Anhang Abbildung 1), wodurch sich die Gewinnung der Frauenmilch wesentlich komplikationsloser gestaltete.

Im Rahmen der Vorstudien wurden insgesamt 18 Frauenmilchproben unmittelbar nach dem Transport ins Labor kulturell untersucht.

Es wurden hierfür verschiedene Transportbedingungen getestet, um die Umstände für die anaeroben Bifidobakterien bis zur Weiterverarbeitung zu optimieren.

Der Transport aller 18 kulturell untersuchten Milchproben erfolgte gekühlt. 8 dieser Frauenmilchproben wurden gekühlt und unter anaeroben Bedingungen mittels eines chemischen Anaerobiersystems (AnaeroGen™ Oxoid, UK) in einem Anaerobengefäß transportiert, bei 3 Milchproben erfolgte der Transport zusätzlich stark abgedunkelt.

Bei den übrigen 6 Frauenmilchproben der Vorstudien fand keine kulturelle Analyse statt. Diese Milchproben wurden alle unter anaeroben Bedingungen im Anaerobengefäß transportiert, bei 3 Proben erfolgte zusätzlich eine Kühlung während des Transports.

Eine Übersicht befindet sich im Anhang, siehe Tabelle 3.

Zum Austesten einer geeigneten Milchmenge wurden einige der 24 Frauenmilchproben nach dem Transport ins Labor und vor der molekularbiologischen Weiterverarbeitung in mehrere Portionen aufgeteilt.

11 Milchproben wurden nicht in kleinere Portionen aufgeteilt, die Weiterverarbeitung erfolgte bei diesen Proben mit mindestens 4 ml bis maximal 15 ml Milch.

13 Frauenmilchproben wurden vor der Weiterverarbeitung in insgesamt 31 kleinere Portionen geteilt, es wurde mit mindestens 1 ml bis maximal 15 ml Milch gearbeitet. Zusammengefasst wurden bei 11 der 24 Frauenmilchproben Portionen > 5 ml weiterverarbeitet. Bei insgesamt 13 der Frauenmilchproben erfolgte die

Weiterverarbeitung von mindestens einer Portion, welche nicht größer als 5 ml war ( $\leq 5$  ml).

Die Probenaufbereitung und molekularbiologische Weiterverarbeitung erfolgte bei insgesamt 17 Portionen bereits am Entnahmetag innerhalb von 2 Stunden nach der Gewinnung der Frauenmilch. Insgesamt 25 Milchportionen wurden vor ihrer Weiterverarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **Material Hauptstudie**

### **2. 3. Auswahlkriterien**

Als Probandinnen für die Gewinnung der Frauenmilchproben wurden gesunde Frauen mit einer unauffälligen Anamnese, einem physiologischen Schwangerschaftsverlauf, einer komplikationslosen vaginalen Entbindung sowie einem unauffälligen Wochenbettverlauf ausgesucht.

Die Probandinnen sollten in den letzten 6 Monaten vor und unter der Geburt keine Medikamente eingenommen haben, insbesondere keine Antibiotika, Steroide, Immunsuppressiva oder Zytostatika. Ausgenommen waren die typischen prä-, sub- und postpartalen Standardmedikationen.

### **2. 4. Gewinnung der Frauenmilchproben, Transport und Lagerung**

Im Oktober und November 2007 wurden von 11 Probandinnen an jeweils 3 Abnahmetagen Frauenmilchproben gewonnen.

Die Termine für die Abnahme der Frauenmilchproben wurden wie folgt festgelegt:

1. Termin: 2. Tag ( $\pm 2$ ) postpartal, am 0. - 4. Tag nach der Entbindung,
2. Termin: 10. Tag ( $\pm 2$ ) postpartal, am 8. - 12. Tag nach der Entbindung,
3. Termin: 18. Tag ( $\pm 2$ ) postpartal, am 16. - 20. Tag nach der Entbindung.

An jedem dieser Abnahmetermine erfolgte eine Entnahme von Frauenmilch aus der linken, unbehandelten Brust sowie aus der rechten, vorher mit sterilem Aqua gereinigten Brust einer jeden Probandin.

Die Gewinnung der Frauenmilchproben erfolgte insgesamt ab dem 2. Tag bis zum 19. Tag nach der Entbindung, siehe Tabelle 4. Dabei wurden in insgesamt 14 Fällen Frauenmilchproben vor dem 10. Tag postpartal abgenommen, frühestens am 2. Tag und spätestens am 9. Tag nach der Entbindung. Bei weiteren 19 Fällen wurden Frauenmilchproben ab dem 10. Tag postpartal abgenommen, frühestens am 10. Tag und spätestens am 19. Tag nach der Entbindung.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Abnahmetage Frauenmilchproben Hauptstudie

Termin	Abnahmetag postpartal	Probandin Nummer
1.	2. Tag	III
1.	3. Tag	I, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI
1.	4. Tag	II, IX
2.	9. Tag	V, VI, VII
2.	10. Tag	VIII, IX, X
2.	11. Tag	III, IV
2.	12. Tag	I, II, XI
3.	17. Tag	I, VI, VII, VIII, IX
3.	18. Tag	V, X, XI
3.	19. Tag	II, III, IV

Eine weitere Übersicht über alle Abnahmedaten und die Nummerierungen der Milchproben befindet sich im Anhang, siehe Tabellen 5, 6 und 7.

Die Frauenmilchgewinnung erfolgte unabhängig vom Zeitpunkt des letzten Stillens und die Vormilch wurde nicht verworfen.

Entnommen wurden sämtliche Frauenmilchproben mit Hilfe einer sterilisierten und steril verpackten Hand-Brustpumpe der Firma MEDela unter Verwendung von sterilen Einmalhandschuhen. Nach der Probenentnahme wurden die Milchproben umgehend in sterile Reagenzröhren der Firma Sarstedt (Deutschland; Darstellung siehe Anhang Abbildung 2) umgefüllt und bei -20 °C mittels eines transportablen Kühlbehälters abgedunkelt gelagert. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte ebenfalls dunkel und bei -20 °C.

Von jeder Frauenmilchprobe wurden 2 ml unter gleichen Bedingungen molekularbiologisch weiterverarbeitet. Aufgrund von nur sehr wenig zur Verfügung stehender Milch bei der Probengewinnung konnten bei den Frauenmilchproben

II 2 links, II 2 rechts, VIII 2 rechts, X 1 links, X 1 rechts und X 3 links nur jeweils 1,5 ml Milch weiterverwendet werden. Bei den Frauenmilchproben V 2 links und XI 1 rechts stand jeweils nur 1 ml Milch zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

### 3. Methoden

#### Methoden Vorstudie

##### 3. 1. Kulturelle Analyse

Das Material von 18 Frauenmilchproben wurde innerhalb von 2 - 3 Stunden nach der Abnahme unter der Sterilarbeitsbank im Labor zur kulturellen Analyse von Bifidobakterien auf Kultur-Agarplatten aufgetragen. Verwendet (+) wurden der nicht-selektive Columbia-Blutagar (bioMérieux Deutschland GmbH) und selektive Kulturmedien wie BSM-Agar (Bifidus Selektive Medium Agar; Fluka, CH), MRS-Agar (de Man, Rogosa and Sharp; Roth, Deutschland) oder Rogosa-Agar (Oxoid, UK), siehe Tabelle 8.

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Kultur-Agarplatten

Frauenmilchprobe	Columbia B. Agar	BSM Agar	MRS Agar	Rogosa Agar
1	+	+	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	-	+
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	+	+	+	-
9	+	+	+	-
10	+	+	+	-
11	+	+	+	-
12	+	+	+	-
13	+	+	+	-
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-
22	+	-	+	+
23	+	-	+	+
24	+	-	+	+

Die Platten wurden jeweils 48 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen mittels eines chemischen Anaerobiersystems (AnaeroGen™ Oxoid, UK) inkubiert. Im Anschluss wurden mittels Gramfärbung (12) und Begutachtung unter dem Mikroskop mögliche grampositive Stäbchenbakterien herausgefiltert. Die weitere Identifikation der

Bakterienspezies erfolgte mit dem VITEK® System (bioMérieux Deutschland GmbH) gemäß den Angaben des Herstellers.

Als Positivkontrolle wurden unter gleichen Bedingungen Bifidobakterien der Stämme *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ (ATCC® Global Bioresource Center™, USA) und *Bifidobacterium catenulatum* ATCC® 27539™ (ATCC® Global Bioresource Center™, USA) auf den Kultur-Agarplatten zur kulturellen Analyse aufgetragen. Dabei wurde *Bifidobacterium infantis* auf allen 4 oben aufgeführten Agarplatten aufgetragen und *Bifidobacterium catenulatum* auf dem Columbia-Blutagar, BSM-Agar und Rogosa-Agar. Die Inkubation und die anschließende Identifikation der Bakterienspezies erfolgten, wie oben für die Frauenmilchproben beschrieben.

### **3. 2. DNA-Extraktion**

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA aus der Frauenmilch, als Grundlage für weitere molekularbiologische Untersuchungen, erfolgte im Rahmen der Vorstudien versuchsweise bei einigen Proben mit der Phenol-Chloroform-Extraktion und bei anderen mit Hilfe des FastDNA® SPIN Kit (Qbiogene, Inc., USA).

Die Phenol-Chloroform DNA-Extraktion wurde bei 12 Frauenmilchproben bzw. 14 einzelnen Portionen durchgeführt, davon bei 3 Portionen bereits am Entnahmetag innerhalb von 2 Stunden nach der Abnahme und bei 11 Portionen nach einer Lagerung bei -20° C über einige Tage.

Die DNA-Isolierung mittels FastDNA® SPIN Kit wurde bei 17 Frauenmilchproben bzw. 28 einzelnen Portionen angewendet, davon bei 14 Portionen am Entnahmetag und bei 14 Portionen nach einer Lagerung bei -20° C.

Bei insgesamt 5 Frauenmilchproben erfolgte die DNA-Extraktion bei den einzelnen Portionen mit unterschiedlichen Methoden. Eine genaue Übersicht über die jeweilige Methode der DNA-Isolierung einer jeden Frauenmilchprobe im Rahmen der Vorstudien befindet sich im Anhang, siehe Tabelle 3.



### 3. 2. 1. DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform

In Vorbereitung für die Phenol-Chloroform DNA-Extraktion erfolgte eine Aufbereitung der Frauenmilchproben (38, 59). Die jeweilige Portion, maximal 10 ml und minimal 5 ml Frauenmilch, wurde mit der gleichen Menge von Denaturierungspuffer (10 mM Tris-HCL, 1% SDS, 2% Triton X-100, 100 mM NaCl, pH 8) für 30 Minuten bei 4500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss bis auf 0,5 ml abdekantiert, das Pellet resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde wieder abdekantiert, eventuelle Milchfettreste wurden mit einem sterilen Tupfer entfernt und es folgte eine Resuspendierung des Pellets mit 500 µl TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8). Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet für die DNA-Extraktion genutzt.

Zu Beginn der Extraktion wurde das Pellet einer jeden Probe mit 1 ml TN 150 (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 8) resuspendiert, es wurden sterile Glasperlen (Durchmesser 0,1 mm) und 150 µl TE gepuffertes Phenol hinzugegeben. Diese Mischung wurde über 3 Minuten mittels Bead-Beater bei 5000 rpm homogenisiert und anschließend für die weitere Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erfolgte eine Inkubation für 2 Minuten auf einem Vortexer bei Raumtemperatur und anschließend die Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000 x g und 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 150 µl TE gepuffertem Phenol versetzt. Nach Inkubation auf dem Vortexer für 2 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000 x g und 4 °C wurde die so gewonnene obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben, anschließend wurde die Probe auf dem Vortexer für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 Minuten bei 11000 x g und 4 °C zentrifugiert. 500 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1000 µl 96% EtOH und 50 µl NaAC (3M NaAc) hinzugegeben. Zur Ausfällung der DNA wurde diese Mischung mindestens 20 Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss für 20 Minuten bei 11000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% eiskaltem EtOH

vorsichtig gewaschen. Es folgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000 x g und 4 °C, der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37 °C luftgetrocknet. Zuletzt wurde das gewonnene Pellet in 10 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### **3. 2. 2. DNA-Extraktion mittels FastDNA• SPIN Kit**

In Vorbereitung für die DNA-Extraktion mit dem FastDNA• SPIN Kit wurden die Frauenmilchproben im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die jeweilige Portion, maximal 15 ml und minimal 1 ml, wurde für 10 Minuten bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert, die Milchfettschicht mit einem sterilen Tupfer abgetragen und der wässrige Überstand verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 x g und 4 °C wurde der restliche Überstand abdekantiert und das gewonnene Pellet für die DNA-Extraktion verwendet.

Das Pellet wurde am Anfang der DNA-Isolierung in 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und in die Lysing Matrix A-Tubes (Qbiogene, Inc., USA) gegeben. Es folgte die Zugabe von 1 ml Cell Lysis Solution (CLS-TC, Qbiogene) und eine Homogenisierung für 40 Sekunden im FastPrep® Instrument (Qbiogene) auf Stufe 6.0. Die Tubes wurden im Anschluss für 5 Minuten auf Eis gelagert, vor der erneuten Homogenisierung mittels FastPrep® Instrument für 40 Sekunden auf Stufe 6.0. Nach einer anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur über 45 Minuten folgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 x g und Raumtemperatur. 700 µl des Überstandes wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert, mit 700 µl Binding Matrix (Qbiogene) durch Invertieren vermischt und auf dem Vortexer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Sekunden bei 14000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde vorsichtig mit 500 µl SEW-M (Qbiogene) resuspendiert und in ein SPIN Module (SPIN Filter und Catch Tube, Qbiogene) gegeben. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 x g und Raumtemperatur wurde der Durchfluss verworfen und erneut unter gleichen Bedingungen 1 Minute zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde anschließend durch eine Recovery-Tube (Qbiogene) ersetzt, die DNA oberhalb des SPIN Filters vorsichtig mit 100 µl DES (Qbiogene) eluiert und für 5 Minuten im Wasserbad bei 55 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 x g und

Raumtemperatur wurde der Durchfluss in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt und die so gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

### **3. 3. Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode um in vitro DNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen. Ein PCR-Programm setzt sich aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt zusammen (43, 48). Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird für einige Sekunden eine bestimmte Temperatur gehalten (Annealing-Temperatur), die eine spezifische Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge erlaubt. Danach wird die Temperatur auf 72 °C angehoben, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Dieses Enzym verlängert den jeweiligen DNA-Strang mittels freier Nukleotide komplementär zur Matrize, wobei der Primer den Anfang des neuen Einzelstranges bildet (Elongation). Am Ende des Zyklus liegen zwei identische Doppelstränge vor, welche in weiteren Zyklen jeweils als Matrize dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ermöglichen.

#### **3. 3. 1. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Die DNA aller Proben der Vorstudie wurde für eine PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F (5' CTC CTG GAA ACG GGT GG) und g-Bifid-R (5' GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A) verwendet (39, 40, 41).

Durchgeführt wurden die Polymerase-Kettenreaktionen mit einem Taq DNA Polymerase Kit von Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, USA). Für je 1 µl DNA-Template einer jeden Frauenmilchprobe wurde ein Reaktionsansatz aus 5 µl 10 x Taq Puffer (Tris-HCL ohne Magnesiumchlorid, Invitrogen™), 0,8 µl dNTPs (12,5 mM), 3 µl Magnesiumchlorid (50 mM), 1,25 µl g-Bifid-F (10 pmol/ µl), 1,25 µl g-Bifid-R (10 pmol/ µl), 0,5 µl Taq-Polymerase (Invitrogen™) und 37,2 µl bidestilliertem Wasser angesetzt. Als Negativkontrolle wurde bidestilliertes Wasser genutzt, als Positivkontrolle DNA des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™.

Für die Durchführung des PCR-Programmes wurde ein Thermozykler (Hybaid, Deutschland) unter folgenden Bedingungen genutzt: initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 20 Sekunden, Annealing bei 55 °C für 20 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden, gefolgt von einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 5 Minuten und einer darauf folgenden Lagerung der Proben bei 4 °C.

### **3. 3. 2. PCR mit den Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r**

Bei 12 Frauenmilchproben bzw. 18 einzelnen Portionen (siehe Tabelle 9 im Anhang) wurde zusätzlich das DNA-Material in einer PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern Bif 164-mod-f (5' GGG TGG TAA TAC CGG ATG) und Bif 662-GC-r (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG CCA CCG TTA CAC CGG GAA) eingesetzt (48, 52).

Bei diesen 18 Milchportionen erfolgte die DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit, wie unter Punkt 3. 2. 2. beschrieben.

Es wurde das Taq DNA Polymerase Kit von Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz für je 1 µl DNA-Template setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl 10 x Taq Puffer (Tris-HCL ohne Magnesiumchlorid, Invitrogen™), 1 µl dNTPs (12,5 mM), 3 µl Magnesiumchlorid (50 mM), 1 µl Bif 164-mod-f (10 pmol/ µl), 1 µl Bif 662-GC-r (10 pmol/ µl), 0,5 µl Taq-Polymerase (Invitrogen™) und 37,5 µl bidestilliertes Wasser. Als Negativkontrolle wurde bidestilliertes Wasser und als Positivkontrolle DNA des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ eingesetzt.

Im Thermozykler (Hybaid, Deutschland) lief das PCR-Programm unter folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 58 °C für 20 Sekunden und Elongation bei 68 °C für 40 Sekunden. Am Ende erfolgte ein letztes Annealing bei 62 °C für 20 Sekunden, gefolgt von einer abschließenden Elongation bei 68 °C für 7 Minuten und einer darauf folgenden Lagerung der Proben bei 4 °C.

### **3. 3. 3. Verdünnungsreihen**

Zur möglichen Optimierung der PCR-Bedingungen wurden im Rahmen der Vorstudie Verdünnungsreihen des DNA-Materials der Frauenmilchproben 8, 11, 17 und 18 angefertigt, nach der DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit (siehe Punkt 3. 2. 2.).

Von der DNA dieser Milchproben wurde jeweils 1 µl einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung mit bidestilliertem Wasser anstatt des ursprünglichen DNA-Templates in einer PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie unter 3. 3. 1. beschrieben, eingesetzt.

### **3. 3. 4. Variation der Annealing-Temperatur**

Zur Verbesserung der PCR-Bedingungen erfolgte ein Austesten der optimalen Annealing-Temperatur für die Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R. Dazu wurde DNA der Frauenmilchprobe 8 und des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ verwendet, gewonnen durch die DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit (siehe Punkt 3. 2. 2.).

Dieses DNA-Material wurde auf der Grundlage der PCR-Reaktionsansätze, wie unter 3. 3. 1. beschrieben, in 6 verschiedenen PCR-Programmen eingesetzt.

Diese PCR-Programme unterschieden sich nur in der Höhe der Annealing-Temperaturen voneinander, diese lagen bei 53,3 °C, 54 °C, 56 °C, 58,6 °C, 61,4 °C und 62,9 °C. Der weitere Ablauf der PCR-Programme erfolgte wie unter Punkt 3. 3. 1. aufgezählt.

### **3. 3. 5. Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 58 °C**

Im Anschluss an das Austesten einer optimalen Annealing-Temperatur für die bifidobakterienspezifischen Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R wurde im Rahmen der Vorstudie die DNA einiger Milchproben in einer weiteren PCR eingesetzt.

Gewählt wurde für diese PCR eine Annealing-Temperatur von 58 °C.

Untersucht wurden insgesamt 12 Frauenmilchproben bzw. 18 einzelne Portionen (siehe Tabelle 9 im Anhang), bei allen war die DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit durchgeführt worden, wie unter Punkt 3. 2. 2. beschrieben. Es wurde das Taq DNA Polymerase Kit von Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, USA) genutzt. Der Reaktionsansatz für je 1 µl DNA-Template der Frauenmilchproben setzte sich zusammen aus: 5 µl 10 x Taq Puffer (Tris-HCL ohne Magnesiumchlorid, Invitrogen™),

0,8 µl dNTPs (12,5 mM), 3 µl Magnesiumchlorid (50 mM), 1,25 µl g-Bifid-F (10 pmol/ µl), 1,25 µl g-Bifid-R (10 pmol/ µl), 0,5 µl Taq-Polymerase (Invitrogen™) und 37,2 µl bidestilliertem Wasser. Bidestilliertes Wasser diente als Negativkontrolle und DNA des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ als Positivkontrolle.

Das PCR-Programm im Thermozykler (Hybaid, Deutschland) erfolgte unter folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 20 Sekunden, Annealing bei 58 °C für 20 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden, anschließende Elongation bei 72 °C für 5 Minuten und Lagerung der Proben bei 4 °C.

### **3. 4. Zusatz von Bifidobacterium infantis ATCC•15702™ in Milchproben**

Im Rahmen der Vorstudie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten einzelnen Portionen von insgesamt 5 Frauenmilchproben Bifidobakterien zugesetzt. Verwendet wurden jeweils 0,2 ml des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stammes, das entsprach einer Bakterienanzahl von  $1,28 \times 10^7$ .

Untersucht werden sollte auf diese Weise die Effektivität der Transportbedingungen, der kulturellen Analyse und der molekularbiologischen Untersuchungen bezüglich der Bifidobakterien.

Je einer Portion der Frauenmilchproben 1 und 3 wurden nach dem Transport ins Labor und unmittelbar vor der Phenol-Chloroform DNA-Extraktion Bifidobakterien zugesetzt, die Weiterverarbeitung erfolgte analog zu den anderen Milchportionen.

Direkt im Anschluss an die Abnahme der Frauenmilchprobe 10 wurden einer Portion Bifidobakterien zugesetzt. Der Transport beider Portionen und die Weiterverarbeitung im Labor erfolgten unter denselben Bedingungen.

Die Frauenmilchproben 14 und 15 wurden nach ihrer Abnahme in 10 gleich große Portionen geteilt. Jeweils 3 Portionen wurden ohne Zusatz von Bifidobakterien weiterverarbeitet. 4 Portionen beider Frauenmilchproben wurden unmittelbar nach der Abnahme Bifidobakterien zugesetzt, den übrigen 3 Portionen erst nach dem Transport ins Labor.

Eine genaue Übersicht zur Weiterverarbeitung der einzelnen Portionen der 5 Frauenmilchproben befindet sich in Tabelle 10 im Anhang. Die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform und FastDNA® SPIN Kit sowie die PCR mit den

bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R erfolgte, wie in den Abschnitten 3. 2. 1., 3. 2. 2. und 3. 3. 1. beschrieben.

### **3. 5. Verarbeitung von Kuhmilch**

Zur Optimierung der Methode wurde pasteurisierte, homogenisierte Kuhmilch verarbeitet. Es sollte untersucht werden, ob durch eine Lagerung bei -20 °C vor der Weiterverarbeitung mittels FastDNA® SPIN Kit der Nachweis von PCR-Produkten beeinflusst wird.

5 Portionen (A-E) à 8 ml Kuhmilch wurden jeweils  $1,28 \times 10^7$  (0,2 ml) Bifidobakterien des Stammes *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ zugesetzt.

Portion A und B wurden aufbereitet, wie in Punkt 3. 2. 1. für die Phenol-Chloroform DNA-Extraktion beschrieben, und anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit (siehe 3. 2. 2.), bei der Portion A am selben Tag und bei Portion B nach einer Lagerung bei -20 °C.

Die Portion C wurde nach dem Zusatz der Bifidobakterien am selben Tag weiterverarbeitet, wie unter Punkt 3. 2. 2. dargestellt. Portion D wurde vor der Weiterverarbeitung, wie in 3. 2. 2. geschildert, bei -20 °C für einige Tage gelagert. Die Portion E wurde nach der Bifidobakterienzugabe aufbereitet, wie in 3. 2. 2. beschrieben, das gewonnene Pellet jedoch erst über einige Tage bei -20 °C gelagert, bevor die endgültige DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit folgte.

Die PCR erfolgte bei allen Proben, wie unter Punkt 3. 3. 1. geschildert.

### **3. 6. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Effektivität aller DNA-Extraktionen und Polymerase-Kettenreaktionen wurde jeweils im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (48). Es wurden hierzu 1,2%-ige Agarose-Gele mit TAE-Puffer (Tris 40 mM, Eisessig 20 mM, EDTA 100 mM, pH 8) hergestellt und die Proben im Verhältnis 4:1 mit Probenpuffer (Bromphenolblau 0,1%, EDTA 0,1 M, Tris-HCL 0,01 M und Glycerol 50% in bidestilliertem Wasser) vermischt aufgetragen. Als Größenmarker diente der Low DNA Mass Ladder von Invitrogen™ (Life Technologies Corporation, USA). Die Elektrophorese wurde bei 85 Volt über 60 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung

des Gels in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) über 1 Stunde, hinterher konnten die PCR-Produkte mittels UV-Licht visualisiert werden. Das erwartete Amplifikat lag bei einer Größe von 563 Basenpaaren.

### **3. 7. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung ist eine Methode, bei der ein DNA-Fragment in einen Vektor eingeführt wird, welcher die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht (12, 43). Dabei ist die DNA als Klon stabiler und unproblematischer zu vervielfältigen als mit der Polymerase-Kettenreaktion.

Vor der Klonierung wird mittels PCR die zu analysierende DNA-Sequenz vervielfältigt und anschließend mit einem Plasmidvektor, einem ringförmigen DNA-Molekül, ligiert. Die auf diese Weise entstandenen rekombinanten Plasmide werden in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen transformiert. Diese Bakterienzellen, die rekombinante Plasmide enthalten, heißen Klone. Es folgt eine Vervielfältigung der Klone und die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA. Aus dieser DNA kann später in Sequenzierreaktionen die genaue Basenfolge ermittelt und damit die DNA identifiziert und zugeordnet werden.

#### **3. 7. 1. Klonierung auf Grundlage der Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Im Rahmen der Vorstudie wurden exemplarisch die PCR-Produkte der Proben 8, 11 und 12 sowie des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ mit dem pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega, USA) kloniert.

Als Erstes wurden durch eine PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie unter 3. 3. 1. beschrieben, die zu analysierenden DNA-Sequenzen vervielfältigt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mit dem High Pure PCR Product Purifikation Kit (Roche Applied Science, USA) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1000 (peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) ermittelt. Die darauf folgende Ligationsreaktion wurde mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector durchgeführt, der Ligationsansatz für jede Probe ist in Tabelle 11 aufgeführt. Zur Optimierung wurde nach Herstellerempfehlung mit einem Vector Molar



Ratio von 3:1 gerechnet, damit ergab sich bei einer Insertlänge von 556 Basenpaaren eine erforderliche Menge von 27,81 ng pro PCR-Produkt.

**Tabelle 11:** Ligationsansatz

	Probe 8 (µl)	Probe 11 (µl)	Probe 12 (µl)	Bif. infantis (µl)
2xRapid Ligations Buffer	5	5	5	5
pGEM <sup>+</sup> -T Easy Vector	1	1	1	1
PCR-Produkt	1,93	1,83	1,66	0,47
T <sub>4</sub> - DNA-Ligase	1	1	1	1
bidest.Wasser	1,07	1,17	1,34	2,53

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend nach den Angaben des Herstellers in kompetente E. coli JM 109-Zellen transformiert. Von jedem Ansatz wurden 100 µl direkt, 100 µl in einer 1:100 Verdünnung und 100 µl in einer 1:10 Verdünnung auf LB/Cb/IPTG/X-Gal-Agarplatten (LB-Agar (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,5), Cb 100 µg/ml, IPTG 0,5 mM, X-Gal 80 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Klone, deren Plasmide das ligierte DNA-Fragment enthalten, sind an einer Weißfärbung zu erkennen (12). Dahingegen sind die Klone, welche nur den Vektor enthalten, durch das Markergen lacZ des Plasmidvektors blau gefärbt. Dieses Markergen lacZ kodiert ein Enzym, welches den Indikator X-Gal der Agarplatten spaltet und so zur Freisetzung eines blauen Farbstoffes führt. Wenn jedoch ein ligiertes DNA-Fragment im Plasmid enthalten ist, dann ist das Markergen lacZ unterbrochen, das Enzym wird nicht exprimiert und der blaue Farbstoff nicht freigesetzt. Dementsprechend wurden die auf den Agarplatten gewachsenen weißen Kolonien gepickt und erneut auf LB/Cb/IPTG/X-Gal-Agarplatten ausplattiert. Eine blaue Kolonie wurde als Negativkontrolle ebenfalls ausgestrichen, die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurde von jeweils 5 weißen Kolonien einer jeden Probe ein Verdünnungsausstrich auf LB/Cb/IPTG/X-Gal-Agarplatten angefertigt. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden möglichst 10 weiße Kolonien pro Probe in je 5 ml Flüssigmedium LB/Cb (20 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Aus diesen Kulturen wurden im Anschluss mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, USA) die Plasmide gemäß den Herstellerangaben isoliert. Zur Kontrolle der ligierten DNA-Fragmente der Plasmide erfolgte eine PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie unter 3. 3. 1. beschrieben. Hierfür wurde eine 1:100 Verdünnung mit

bidestilliertem Wasser benutzt. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1000 bestimmt. Zur Sequenzierung wurde pro Probe 1 µg Plasmid-DNA an die Firma Eurofins MWG Operon, Deutschland verschickt.

Die ermittelten Sequenzen wurden mit der Software Vector NTI® suite 9.0.0. (InforMax inc.) bearbeitet, sodass nur die Region zwischen den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R erhalten blieb. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) wurden die DNA-Sequenzen der Frauenmilchproben 8, 11, 12 und des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ anschließend zugeordnet und identifiziert.

## **Methoden Hauptstudie**

### **3. 8. DNA-Extraktion mittels FastDNA• SPIN Kit**

Unmittelbar nach ihrer Abnahme wurden die insgesamt 66 Frauenmilchproben der 11 Probandinnen der Hauptstudie bei -20 °C gelagert. Die anschließende Aufbereitung und DNA-Extraktion vor der weiteren Verarbeitung erfolgte mit Hilfe des FastDNA® SPIN Kit (Qbiogene, Inc., USA), wie unter Punkt 3. 2. 2. beschrieben. Danach wurde die DNA-Konzentration der einzelnen Proben mit dem NanoDrop 1000 (peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) ermittelt.

### **3. 9. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Die gewonnene DNA aller 66 Frauenmilchproben wurde in eine PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie unter Punkt 3. 3. 5. dargestellt, eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, wie in 3. 6. beschrieben.

### **3. 10. Ermittlung der unteren Nachweisgrenze**

Zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze der angewendeten Methode wurde mit einer Verdünnungsreihe des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stammes (ATCC® Global Bioresource Center™, USA) gearbeitet.

Mit Hilfe der Thoma-Zählkammer wurde eine Bakterienanzahl von  $2,185 \times 10^9$  pro ml bestimmt. In zwei sterilen Eppendorfgefäßen wurde je 1 ml des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stammes für 10 Minuten bei  $14000 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der wässrige Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS (NaCl 8 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,24 g/l, pH 7,4) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation über 10 Minuten bei  $14000 \times g$  und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das Pellet im ersten Eppendorfgefäß wurde mit 200 µl PBS für die weitere Verarbeitung aufgenommen und entsprach somit  $2,185 \times 10^9$  Bakterien. Das andere Pellet wurde ebenfalls mit 200 µl PBS resuspendiert und für eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten bis minimal 21,85 Bakterien pro ml genutzt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden mit PBS bis auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Analog zu den Frauenmilchproben erfolgte die weitere Verarbeitung. Die jeweils 200 µl wurden für die DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit, wie unter 3. 2. 2. beschrieben, eingesetzt.

Es folgten die PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R (siehe 3. 3. 5.) und die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3. 6.).

### **3. 11. PCR mit der omnitag-OLS®-DNA-Polymerase**

Am Ende der Untersuchungen der Hauptstudie wurde eine Taq-Polymerase, die omnitag-OLS®-DNA-Polymerase (OLS® OMNI Life Science GmbH, Deutschland), in einer PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R getestet.

Verwendet wurde DNA-Material nach der DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit, wie in Punkt 3. 2. 2. beschrieben. Genutzt wurde das Material der Probandinnen V 1 links und X 1 rechts, sowie des Bifidobacteriums infantis ATCC® 15702™. Als Negativkontrolle diente bidestilliertes Wasser. Pro Probe wurden 4 verschiedene Pufferlösungen (1 - 4) jeweils einmal mit Enhancer A, Enhancer B und einmal ohne Enhancerlösung mit bidestilliertem Wasser gemäß den Herstellerangaben getestet.

Für je 1  $\mu\text{l}$  DNA-Template wurde ein Reaktionsansatz aus 5  $\mu\text{l}$  Puffer (1, 2, 3 oder 4, OLS<sup>®</sup>), 3,3  $\mu\text{l}$  Enhancer (A, B oder bidest. Wasser, OLS<sup>®</sup>), 0,5  $\mu\text{l}$  dNTPs (12,5 mM), 2,5  $\mu\text{l}$  g-Bifid-F (10 pmol/  $\mu\text{l}$ ), 2,5  $\mu\text{l}$  g-Bifid-R (10 pmol/  $\mu\text{l}$ ), 0,2  $\mu\text{l}$  omnitaq-OLS<sup>®</sup>-DNA-Polymerase und 10  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser angesetzt.

Das PCR-Programm im Thermozykler lief unter folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten, anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 20 Sekunden, Annealing bei 58 °C für 20 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden, gefolgt von einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 5 Minuten und einer darauf folgenden Lagerung der Proben bei 4 °C. Die sich anschließende Agarose-Gelelektrophorese erfolgte, wie in Punkt 3. 6. beschrieben.

## **4. Ergebnisse**

### **Ergebnisse Vorstudie**

#### **4. 1. Kulturelle Analyse**

Für den kulturellen Nachweis von Bifidobakterien wurden 18 Frauenmilchproben der Vorstudie auf bifidobakterienspezifischen Kultur-Agarplatten ausgestrichen, wie unter Punkt 3. 1. beschrieben. Die Identifikation von auf diesen Platten gewachsenen grampositiven Stäbchenbakterien erfolgte mit VITEK® System (bioMérieux Deutschland GmbH).

Es ließen sich auf den verwendeten Kultur-Agarplatten keine Bifidobakterien aus den untersuchten 18 Frauenmilchproben anzüchten oder nachweisen.

Der als Positivkontrolle verwendete Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stamm wuchs auf dem BSM-Agar und auf dem MRS-Agar und konnte mittels VITEK® System identifiziert werden. Auf dem Rogosa-Agar konnte kein Wachstum des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stammes beobachtet werden. Der Bifidobacterium catenulatum ATCC® 27539™ Stamm konnte mit dem VITEK® System, nach dem Wachstum auf dem Rogosa- und BSM-Agar, identifiziert werden.

#### **4. 2. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Alle 42 Portionen der 24 Frauenmilchproben der Vorstudie wurden in einer PCR mit den für Bifidobakterien spezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R eingesetzt, wie unter 3. 3. 1. beschrieben. Nachgewiesen werden sollte bifidobakterienspezifische DNA in den Frauenmilchproben.

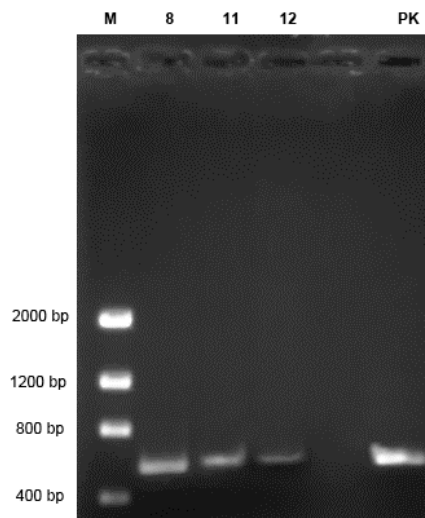
**Tabelle 12:** Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben der Vorstudie mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R

Probe	Entnahme	Portionsgröße	Verarbeitung	Extraktion	DNA Nachweis
1	21. Tag pp.	10 ml	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	-
2	4. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
3	5. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
4	3. Tag pp.	7 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
5	5. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
6	13. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
7	24. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
		10 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
8	4. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
		4 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv
9	7. Tag pp.	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
		3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
10	5. Tag pp.	8 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
11	4. Tag pp.	4 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv
12	4. Tag pp.	13 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv
13	5. Tag pp.	5 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
14	91. Tag pp.	7,5 ml	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	-
		7,5 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
		7,5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
15	32. Tag pp.	5 ml	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
		5 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
		5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv
16	6. Tag pp.	15 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
17	6. Tag pp.	10 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		2 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
18	6. Tag pp.	15 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		2 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
19	6. Tag pp.	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
		3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
20	4. Tag pp.	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
		3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
21	4. Tag pp.	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
		3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-
22	3. Tag pp.	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
23	4. Tag pp.	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
24	7. Tag pp.	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
		5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-

Wie in Tabelle 12 aufgeführt, gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA (positiv) bei 4 von 24 Frauenmilchproben und damit bei insgesamt 16,7%.

Die Abnahme der Milch erfolgte bei den Proben 8, 11 und 12 jeweils am 4. Tag postpartal (pp.), bei der Frauenmilchprobe Nummer 15 am 32. Tag nach der Entbindung. Der Nachweis gelang bei den Proben 8, 11 und 12 jeweils nach einer Lagerung der Frauenmilch bei -20 °C (nach Lagerung) und einer anschließenden DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit (FastDNA® Kit), siehe Abbildung 3.

Bei der ersten Portion der Frauenmilchprobe 8, bei welcher die DNA-Extraktion aus 10 ml Milch mit der Phenol-Chloroform-Extraktion (Phenol/Chloro.) erfolgte, konnte keine bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Bei der Frauenmilchprobe Nummer 15 konnte das einzige Mal mit der Phenol-Chloroform-Extraktion sowohl nach der Weiterverarbeitung am Entnahmetag (Entnahmetag) als auch nach einer Lagerung bei -20 °C bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Nur bei dieser Probe gelang der Nachweis mit beiden Extraktionsmethoden.



**Abbildung 3:** Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben 8, 11 und 12; *Bifidobacterium infantis* ATCC- 15702™ als Positivkontrolle (PK); Größenmarker (M)

Von den 12 Frauenmilchproben bzw. 14 Milchportionen, deren DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert wurde, konnte insgesamt nur bei einer Probe, Probe Nummer 15, bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang hier aus beiden untersuchten Portionen sowohl am Entnahmetag als auch nach der Lagerung bei -20 °C.

Bei den 17 Frauenmilchproben bzw. 28 Milchportionen, bei denen die DNA Extraktion auch mit Hilfe des oder ausschließlich mit dem FastDNA® SPIN Kit erfolgte, gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA bei insgesamt 4 Milchproben bzw. 4 Portionen. Bei diesen insgesamt 28 Portionen erfolgte die Weiterverarbeitung von 14 Portionen direkt am Entnahmetag und bei den übrigen 14 Portionen erst nach einer Lagerung bei -20 °C.

Der Nachweis gelang aus 4 Milchportionen deren Weiterverarbeitung nach der Lagerung erfolgte.

Insgesamt 5 Frauenmilchproben wurden in einzelne Portionen geteilt, welche im Anschluss unterschiedlich weiterverarbeitet wurden. Bei 3 dieser Milchproben konnte auch mit verschiedenen Extraktionsmethoden kein Nachweis erzielt werden. In den 3 Portionen der Frauenmilchprobe 15 konnte trotz unterschiedlicher Verarbeitungsweise jedes Mal bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Bei der Frauenmilchprobe Nummer 8 konnte in der Portion, deren DNA mit der Phenol-Chloroform-Extraktion isolierte wurde, keine bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Dahingegen gelang der Nachweis bei der 2. Portion, deren DNA mittels FastDNA® SPIN Kit isoliert wurde.

Es wurden im Rahmen der Vorstudie Frauenmilchproben untersucht, die zwischen dem 3. und dem 91. Tag nach der Entbindung abgenommen wurden. Der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA gelang bei 3 Milchproben des 4. postpartalen Tages und bei der Milchprobe, die am 32. Tag postpartal abgenommen wurde.

Die verarbeiteten Milchportionen hatten ein Volumen von 5 bis 10 ml bei der Phenol-Chloroform-Extraktion und 1 bis 15 ml bei der DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit. Bifidobakterienspezifische DNA konnte in der Milchportion von 5 ml mit der Phenol-Chloroform-Extraktion nachgewiesen werden. Mittels FastDNA® SPIN Kit gelang der Nachweis bei Portionen mit 4, 5 und 13 ml Milch.



### **4. 3. PCR mit den Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r**

Das Material von 12 Frauenmilchproben bzw. 18 einzelnen Portionen wurde in einer PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r, wie unter Punkt 3. 3. 2. beschrieben, eingesetzt. Die DNA-Extraktion bei allen Milchproben erfolgte mit dem FastDNA® SPIN Kit. Bei 7 Portionen wurde ein Volumen von minimal 1 ml bis maximal 15 ml Milch bereits am Entnahmetag weiterverarbeitet.

11 Milchportionen, mit einem Volumen von minimal 1 ml bis maximal 13 ml, wurden erst nach einer Lagerung bei -20 °C weiterverarbeitet.

Bei keiner der untersuchten Frauenmilchproben gelang mit dieser PCR und dem Einsatz der ebenfalls für Bifidobakterien spezifischen Primer Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA. Bei der als Positivkontrolle eingesetzten DNA des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA mit den oben genannten Primern.

### **4. 4. Verdünnungsreihen**

Aus dem isolierten DNA-Material von 4 Frauenmilchproben wurden zur möglichen Optimierung der PCR-Bedingungen Verdünnungsreihen mit bidestilliertem Wasser angefertigt. Gewählt wurden hierzu die Milchproben 8 und 11, bei denen der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA bereits gelungen war, sowie die beiden Milchproben 17 und 18. Je 1 µl der 1:10 und 1:100 Verdünnung wurde in einer PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie unter Punkt 3. 3. 3. beschrieben, eingesetzt.

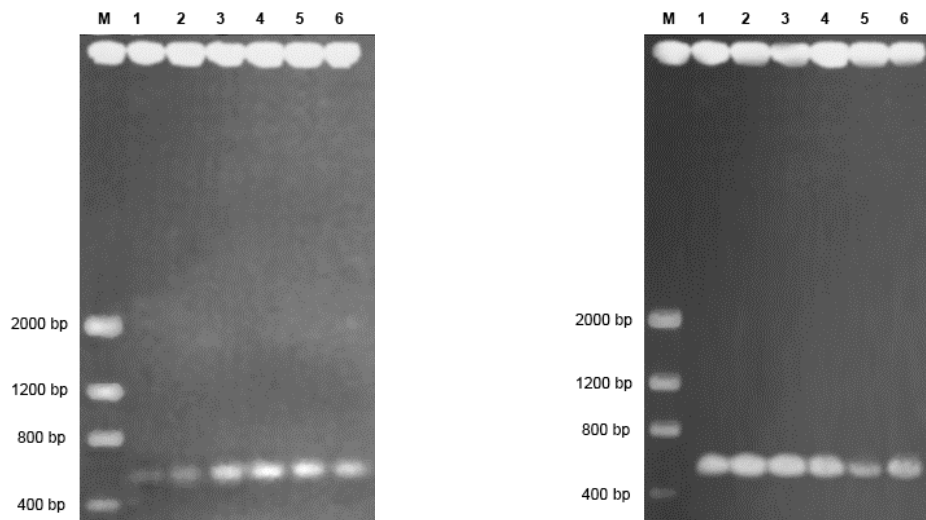
Bei keiner Verdünnungsstufe dieser 4 Frauenmilchproben gelang ein Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA.

### **4. 5. Variation der Annealing-Temperatur**

Um die PCR-Bedingungen zu verbessern, wurden verschiedene Annealing-Temperaturen für die bifidobakterienspezifischen Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R getestet. Hierzu wurde DNA-Material der Frauenmilchprobe 8 und des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes auf der Grundlage der PCR-Reaktionsansätze, wie in

Abschnitt 3. 3. 4. beschrieben, in jeweils 6 PCR-Programmen mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen eingesetzt.

Der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA bei der Frauenmilchprobe 8 und dem *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ gelang bei jeder der gewählten Temperaturen.



**Abbildung 4 (links):** Variation der Annealing-Temperatur bei Frauenmilchprobe 8; 53,3 °C (1), 54 °C (2), 56 °C (3), 58,6 °C (4), 61,4 °C (5), 62,9 °C (6); Größenmarker (M)

**Abbildung 5 (rechts):** Variation der Annealing-Temperatur beim *Bifidobacterium infantis* ATCC-15702™; 53,3 °C (1), 54 °C (2), 56 °C (3), 58,6 °C (4), 61,4 °C (5), 62,9 °C (6); Größenmarker (M)

Die sich auf dem Agarose-Gel darstellende Bande ist bei der Milchprobe 8 bei einer Annealing-Temperatur von 53,3 °C und 54 °C deutlich schwächer sichtbar, als bei den höheren Temperaturen. Am stärksten zeichnet sich die Bande bei einer Temperatur von 58,6 °C ab, siehe Abbildung 4.

Bei dem *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stamm zeigt sich auf dem Agarose-Gel eine starke Bande bei den Annealing-Temperaturen 53,3 °C, 54 °C, 56 °C und 58,6 °C. Die sich darstellende Bande ist auf dem Gel bei einer Annealing-Temperatur von 61,4 °C und 62,9 °C etwas schwächer, siehe Abbildung 5.

#### 4. 6. Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 58 °C

Nach dem Austesten einer optimalen Annealing-Temperatur für die bifidobakterienspezifischen Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R wurde das Material von 12 Frauenmilchproben bzw. 18 Milchportionen in einer weiteren PCR mit diesen Primern eingesetzt, wie unter Punkt 3. 3. 5. beschrieben. Gewählt wurde hierzu eine Annealing-Temperatur von 58 °C, weil sich die Bande in diesem Temperaturbereich im Test mit der DNA der Milchprobe 8 deutlich abzeichnete, siehe Tabelle 13.

**Tabelle 13:** Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA durch die PCR mit den Bifidobakterien-Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen

Probe	Portionsgröße	Verarbeitung	Extraktion	Nachweis/55	Nachweis/58
8	10 ml	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-	nicht erfolgt
	4 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv	positiv
11	4 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv	positiv
12	13 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv	positiv
16	15 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
17	10 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	nicht erfolgt
	2 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
18	15 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	nicht erfolgt
	2 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
19	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
	3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
20	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
	3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
21	1 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
	3 ml	nach Lagerung	FastDNA® Kit	-	positiv
22	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	nicht erfolgt
23	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	nicht erfolgt
24	1 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	3 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	-
	5 ml	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-	nicht erfolgt

Bifidobakterienspezifische DNA konnte nach der PCR mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C bei 8 von 12 (66,7%) untersuchten Frauenmilchproben nachgewiesen werden (positiv), dabei gelang der Nachweis bei 11 von 18 (61,1%) Einzelportionen.

Bei allen Frauenmilchproben war die DNA-Extraktion im Vorfeld mit dem FastDNA® SPIN Kit (FastDNA® Kit) erfolgt, es wurden dabei Portionen von minimal 1 ml bis

maximal 15 ml verarbeitet. Die Abnahme der Frauenmilch war bei den Proben 8, 11, 12, 20 und 21 am 4. Tag postpartal erfolgt. Die Proben 17, 18 und 19 wurden am 6. Tag nach der Entbindung gewonnen.

Der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA gelang bei allen 11 Milchportionen, die nach einer Lagerung bei -20 °C (nach Lagerung) weiterverarbeitet wurden. Kein Nachweis (-) gelang bei den 7 Frauenmilchportionen von insgesamt 4 Milchproben, die bereits am Entnahmetag (Entnahmetag) weiterverarbeitet wurden.

Der bereits gelungene Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben 8, 11 und 12 durch die PCR mit einer Annealing-Temperatur von 55 °C (Nachweis/55), konnte durch die PCR mit der Annealing-Temperatur von 58 °C erneut erbracht werden (Nachweis/58).

Bei den Frauenmilchproben 17, 18, 19, 20 und 21 gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA erst mit der PCR und der erhöhten Annealing-Temperatur von 58 °C.

Kein Nachweis, auch nicht durch die PCR mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C, glückte bei den Milchproben 16, 22, 23 und 24, welche am Entnahmetag weiterverarbeitet wurden.

#### **4. 7. Zusatz von *Bifidobacterium infantis* ATCC•15702™ in Milchproben**

Insgesamt 5 Frauenmilchproben wurden im Rahmen der Vorstudien zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Abnahme Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes zugesetzt, wie im Abschnitt 3. 4. beschrieben.

Auf diese Weise sollten die Transportbedingungen, die kulturelle Analyse und die gewählten molekularbiologischen Nachweismethoden für die Bifidobakterien untersucht werden.

**Tabelle 14:** Übersicht des Nachweises des zu verschiedenen Zeitpunkten zugesetzten *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ in Frauenmilchproben

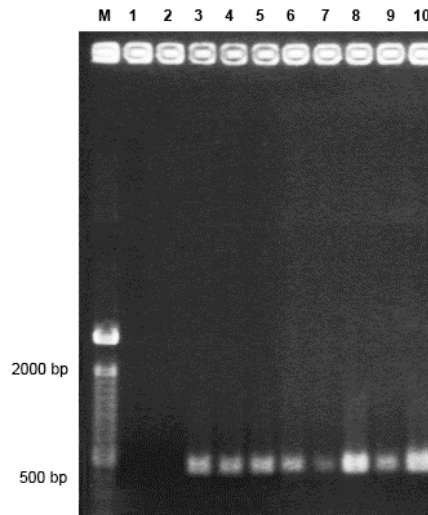
Probe	Portion	Bifidobakterien	Verarbeitung	Extraktion	Nachweis
1	10 ml	I	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	-
	10 ml	III	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
3	10 ml	I	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
	10 ml	IV	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
10	8 ml	I	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
	8 ml	II	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
14 - 1	7,5 ml	I	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	-
- 2	7,5 ml	I	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	-
- 3	7,5 ml	II	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
- 4	7,5 ml	II	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
- 5	7,5 ml	III	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
- 6	7,5 ml	III	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
- 7	7,5 ml	I	Entnahmetag	FastDNA® Kit	-
- 8	7,5 ml	II	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv
- 9	7,5 ml	II	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv
- 10	7,5 ml	III	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv
15 - 1	5 ml	I	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
- 2	5 ml	I	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
- 3	5 ml	II	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
- 4	5 ml	II	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
- 5	5 ml	III	Entnahmetag	Phenol/Chloro.	positiv
- 6	5 ml	III	nach Lagerung	Phenol/Chloro.	positiv
- 7	5 ml	I	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv
- 8	5 ml	II	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv
- 9	5 ml	II	nach Lagerung	FastDNA® Kit	positiv
- 10	5 ml	III	Entnahmetag	FastDNA® Kit	positiv

Wie in Tabelle 14 aufgeführt, gelang der Nachweis der DNA der zugesetzten Bifidobakterien (positiv) bei allen untersuchten Portionen der 5 Frauenmilchproben.

Bifidobakterienspezifische DNA konnte sowohl bei den Portionen nachgewiesen werden, denen Bifidobakterien unmittelbar nach der Probengewinnung und vor dem Transport ins Labor zugesetzt wurden (II), als auch bei den Portionen, denen die Bifidobakterien erst nach dem Transport und vor der Weiterverarbeitung im Labor zugesetzt wurden (III). Hierbei gab es keinen Unterschied, ob die jeweilige Portion bereits am Entnahmetag (Entnahmetag) weiterverarbeitet wurde oder erst nach einer Lagerung bei -20 °C (nach Lagerung). Der Nachweis gelang nach der Phenol-Chloroform-Extraktion (Phenol/Chloro.) und nach der DNA-Isolierung mittels FastDNA® SPIN Kit (FastDNA® Kit). Die bifidobakterienspezifische DNA konnte auch bei der Portion

nachgewiesen werden, welcher Bifidobakterien erst nach einer Lagerung bei -20 °C, vor der DNA-Extraktion zugesetzt wurden (IV).

Wie im Abschnitt 4. 2. bereits beschrieben, konnte bei der Frauenmilchprobe 15 bifidobakterienspezifische DNA auch bei den Portionen nachgewiesen werden, denen keine Bifidobakterien des Stammes *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ zugesetzt wurden (I), siehe Abbildung 6.



**Abbildung 6:** Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben 14 und 15; Portionen 14 - 1, 14 - 2 ohne Zusatz von Bifidobakterien (1, 2), Portionen 14 - 3, 14 - 4 und 14 - 5 Zusatz von Bifidobakterien (3, 4, 5); Portionen 15 - 1 und 15 - 2 ohne Zusatz von Bifidobakterien (6, 7), Portionen 15 - 3, 15 - 4, 15 - 5 Zusatz von Bifidobakterien (8, 9, 10) (siehe Tabelle 14); Größenmarker (M)

Die Portionen der Frauenmilchproben 10, 14 und 15, bei denen der Zusatz von Bifidobakterien unmittelbar nach ihrer Abnahme und noch vor dem Transport erfolgte (II), wurden nach ihrem Transport ins Labor auf bifidobakterienspezifischen Kultur-Agarplatten ausgestrichen.

Der zugesetzte *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stamm wuchs bei jeder Portion auf dem BSM-Agar und auf dem MRS-Agar und konnten mittels VITEK® System identifiziert werden.

#### 4. 8. Verarbeitung von Kuhmilch

Zur weiteren Untersuchung und möglichen Optimierung der Methode erfolgte eine Verarbeitung von pasteurisierter, homogenisierter Kuhmilch, wie unter Punkt 3. 5. beschrieben. Den einzelnen Milchportionen von jeweils 8 ml wurden Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes zugesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte bei allen Proben mit dem FastDNA® SPIN Kit. Variiert wurden die Art und der Zeitpunkt der Aufbereitung vor der DNA-Isolierung.

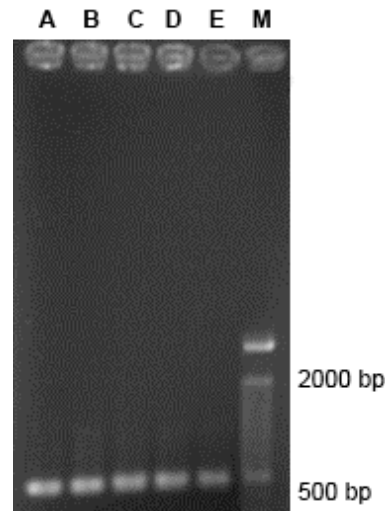
**Tabelle 15:** Zusammenfassung der Verarbeitungsschritte der Kuhmilchproben

Probe	Aufbereitung	Extraktion mit FastDNA® Kit	Nachweis
A	Waschschritt am Entnahmetag	im Anschluss an Aufbereitung	positiv
B	Waschschritt am Entnahmetag	nach Lagerung	positiv
C	Zentrifugation am Entnahmetag	im Anschluss an Aufbereitung	positiv
D	Zentrifugation nach Lagerung	im Anschluss an Aufbereitung	positiv
E	Zentrifugation am Entnahmetag	nach Lagerung	positiv

Bei allen 5 Kuhmilchproben konnte die DNA der zugesetzten Bifidobakterien nachgewiesen werden (positiv), unabhängig von der Art der Aufbereitung und vom Zeitpunkt der DNA-Extraktion, siehe Tabelle 15. Die Proben A und B wurden bereits am Entnahmetag wie in Vorbereitung für die Phenol-Chloroform-Extraktion aufbereitet (Waschschritt am Entnahmetag). Die DNA-Isolierung erfolgte bei Probe A direkt im Anschluss an die Aufbereitung. Das Pellet der Probe B wurde nach der Aufbereitung und vor der DNA-Extraktion erst bei -20 °C gelagert (nach Lagerung).

Die Milchproben C, D und E wurden gemäß der Vorbereitung der DNA-Isolierung mittels FastDNA® SPIN Kit aufbereitet (Zentrifugation), wobei die Probe D vorher bei -20 °C über einige Tage gelagert wurde. Das durch die Zentrifugationsschritte gewonnene Pellet der Proben C und D wurde umgehend weiterverarbeitet (im Anschluss an Aufbereitung). Das Pellet der Probe E wurde erst nach einer Lagerung bei -20 °C in die DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit eingesetzt.

In Abbildung 7 sind die Banden der Proben A, B, C und D sehr deutlich sichtbar. Die Bande der Probe E ist ebenfalls gut sichtbar, aber etwas schwächer als die übrigen 4 Banden.



**Abbildung 7:** Zusatz von *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ in Kuhmilch; Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Proben A-E (siehe Tabelle 15); Größenmarker (M)

#### 4. 9. Klonierung auf Grundlage der Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R

Durch die PCR mit den für Bifidobakterien spezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R konnte bifidobakterienspezifische DNA in einigen Frauenmilchproben nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der Basenfolge und Identifizierung dieser nachgewiesenen bifidobakterienspezifischen DNA wurden im Rahmen der Vorstudie exemplarisch die PCR-Produkte der Milchproben 8, 11 und 12 mit dem pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems von Promega kloniert, wie im Abschnitt 3. 7. 1. beschrieben. Das PCR-Produkt des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes wurde als Positivkontrolle ebenfalls kloniert. Die auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA wurde zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG Operon in Deutschland verschickt. Anschließend wurden die ermittelten Sequenzen mit einer Software, wie unter 3. 7. 1. aufgeführt, bearbeitet und mit Hilfe der NCBI-Datenbank identifiziert (siehe Tabelle 16).



**Tabelle 16:** Übersicht der identifizierten Sequenzen aus den PCR-Produkten der Frauenmilchproben 8, 11 und 12 und des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™

Probe	identifizierte Bakteriensequenz	Prozent der Übereinstimmung
8	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	100%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	100%
	<i>Bifidobacterium</i> sp. h12	99%
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99%
	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	99%

Probe	identifizierte Bakteriensequenz	Prozent der Übereinstimmung
11	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	97%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	97%
	<i>Bifidobacterium</i> sp. h12	97%

Probe	identifizierte Bakteriensequenz	Prozent der Übereinstimmung
12	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99%
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	99%
	<i>Bifidobacterium longum</i>	99%

Probe	identifizierte Bakteriensequenz	Prozent der Übereinstimmung
Positivkontrolle	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99%
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	99%
	<i>Bifidobacterium longum</i>	99%

Es konnte durch die NCBI-Datenbank ermittelt werden, dass die erhaltene Sequenz der Probe 8 zu 100% mit der Sequenz eines *Bifidobacterium pseudocatenulatum* und eines *Bifidobacterium catenulatum* übereinstimmt. Die Sequenz der Probe 11 stimmt zu 99% mit der Sequenz des *Bifidobacterium angulatum* überein. Bei der Probe 12 und dem als Positivkontrolle eingesetzten *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stamm stimmen die erhaltenen Sequenzen zu 99% mit der Sequenz des *Bifidobacterium infantis* als Subspezies des *Bifidobacterium longum*s überein.

## **Ergebnisse Hauptstudie**

### **4. 10. PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Es wurden insgesamt 66 Frauenmilchproben von 11 Probandinnen im Rahmen der Hauptstudie untersucht. Unmittelbar nach der jeweiligen Gewinnung der Milchproben an den festgelegten Abnahmetagen wurden diese bis zu ihrer molekularbiologischen Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die DNA-Extraktion erfolgte bei allen Proben unter gleichen Bedingungen mit dem FastDNA® SPIN Kit, wie im Abschnitt 3. 8. beschrieben. Mit dem NanoDrop1000 wurde die DNA-Konzentration ermittelt (siehe Tabelle 17). Anschließend wurde die gewonnene DNA aller Frauenmilchproben in einer PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, wie in Punkt 3. 9. dargestellt, eingesetzt.

Bifidobakterienspezifische DNA sollte auf diesem Weg zu verschiedenen Zeitpunkten in der Milch beider Brüste der jeweiligen Probandin nachgewiesen werden. Die rechte Brust wurde, im Gegensatz zur linken Brust einer jeden Probandin, vor der Abnahme mit sterilem Aqua gereinigt, wie in Abschnitt 2. 4. beschrieben.

Eine Übersicht über die Abnahmetage und die Nummerierung der Frauenmilchproben der Hauptstudie befindet sich in den Tabellen 5, 6 und 7 im Anhang.

**Tabelle 17:** DNA-Konzentration der Frauenmilchproben der Hauptstudie in ng/ $\mu$ l

Probe	I 1 links	I 2 links	I 3 links	I 1 rechts	I 2 rechts	I 3 rechts
DNA-Konzentration	61,56	34,03	31,39	59,70	293,73	31,00

Probe	II 1 links	II 2 links	II 3 links	II 1 rechts	II 2 rechts	II 3 rechts
DNA-Konzentration	41,33	36,87	25,52	38,69	51,24	37,32

Probe	III 1 links	III 2 links	III 3 links	III 1 rechts	III 2 rechts	III 3 rechts
DNA-Konzentration	45,88	41,92	58,07	43,52	59,01	56,43

Probe	IV 1 links	IV 2 links	IV 3 links	IV 1 rechts	IV 2 rechts	IV 3 rechts
DNA-Konzentration	86,99	83,38	78,60	86,06	66,85	46,90

Probe	V 1 links	V 2 links	V 3 links	V 1 rechts	V 2 rechts	V 3 rechts
DNA-Konzentration	69,57	69,38	54,53	55,56	48,19	50,93

Probe	VI 1 links	VI 2 links	VI 3 links	VI 1 rechts	VI 2 rechts	VI 3 rechts
DNA-Konzentration	60,30	60,44	32,41	42,18	31,62	36,22

Probe	VII 1 links	VII 2 links	VII 3 links	VII 1 rechts	VII 2 rechts	VII 3 rechts
DNA-Konzentration	55,14	75,61	42,46	55,69	67,50	54,45

Probe	VIII 1 links	VIII 2 links	VIII 3 links	VIII1rechts	VIII2rechts	VIII3rechts
DNA-Konzentration	38,81	37,76	31,03	35,46	41,27	35,31

Probe	IX 1 links	IX 2 links	IX 3 links	IX 1 rechts	IX 2 rechts	IX 3 rechts
DNA-Konzentration	50,38	51,12	44,50	34,10	38,85	62,82

Probe	X 1 links	X 2 links	X 3 links	X 1 rechts	X 2 rechts	X 3 rechts
DNA-Konzentration	58,80	36,08	39,69	46,67	43,28	57,74

Probe	XI 1 links	XI 2 links	XI 3 links	XI 1 rechts	XI 2 rechts	XI 3 rechts
DNA-Konzentration	82,93	62,88	50,47	104,26	51,24	39,13

Die Probandinnen sind durchnummeriert mit den Zahlen I bis XI, die Abnahmetage sind gekennzeichnet mit 1, 2 und 3 für den ersten, zweiten und dritten Abnahmetermin. Die Bezeichnungen links und rechts stehen für die Brustseite, aus der die jeweilige Frauenmilchprobe entnommen wurde.

Die im Anschluss an die DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit ermittelten DNA-Konzentration der einzelnen Milchproben lagen zwischen minimal 25,52 ng/µl (Probe II 3 links) und maximal 293,73 ng/µl (Probe I 2 rechts).

Das als Positivkontrolle eingesetzte Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ hatte nach der DNA-Isolierung mittels FastDNA® SPIN Kit eine Konzentration von 23,99 ng/µl.

Für die PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R wurde, wie oben beschrieben, jeweils 1 µl der auf diese Weise gewonnenen DNA einer jeden Frauenmilchprobe eingesetzt.

**Tabelle 18:** Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben der Hauptstudie mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R

Abnahmetermin, Brustseite	Probandin											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
1. Termin, linke Brust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1. Termin, rechte Brust	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2. Termin, linke Brust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2. Termin, rechte Brust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Termin, linke Brust	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Termin, rechte Brust	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA gelang (+) bei 5 von 66 untersuchten Frauenmilchproben (7,6%) und bei insgesamt 4 von 11 Probandinnen (36,4%), wie in Tabelle 18 dargestellt.

Bei Probandin III konnte in 2 der 6 entnommenen Proben bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Bei dieser Probandin gelang auch das einzige Mal der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus den Proben beider Brüste an einem Abnahmetermin. Der Nachweis gelang hier am 19. Tag postpartal im Rahmen des 3. Abnahmetermins.

In den Frauenmilchproben der Probandinnen VII, VIII und X konnte bei jeweils einer Probe bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9 – 11). Jeder dieser 3 Nachweise gelang an einem anderen Abnahmetag, bei keiner dieser Probandinnen konnte in einer anderen Probe bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Bei Probandin VII gelang der Nachweis am 17. Tag postpartal,

bei Probandin VIII am 3. Tag postpartal und bei der Probandin X am 10. Tag nach der Entbindung.

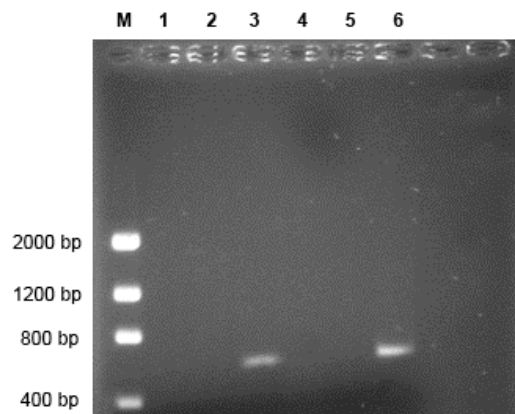
In den jeweils 22 Frauenmilchproben, die am ersten und am zweiten Abnahmetermin entnommen wurden, ließ sich jeweils nur in einer Probe bifidobakterienspezifische DNA nachweisen. Der Nachweis gelang bei 3 der 22 Proben des dritten Abnahmetermins.

Insgesamt konnte bifidobakterienspezifische DNA in 3 der 33 Proben (9,1%) nachgewiesen werden, die aus den Brüsten der rechten Seite entnommen wurden, welche vor der Abnahme mit sterilem Aqua gereinigt wurden. Der Nachweis gelang bei 2 von 33 Frauenmilchproben (6,1%), die aus den unbehandelten, linken Brüsten gewonnen wurden.

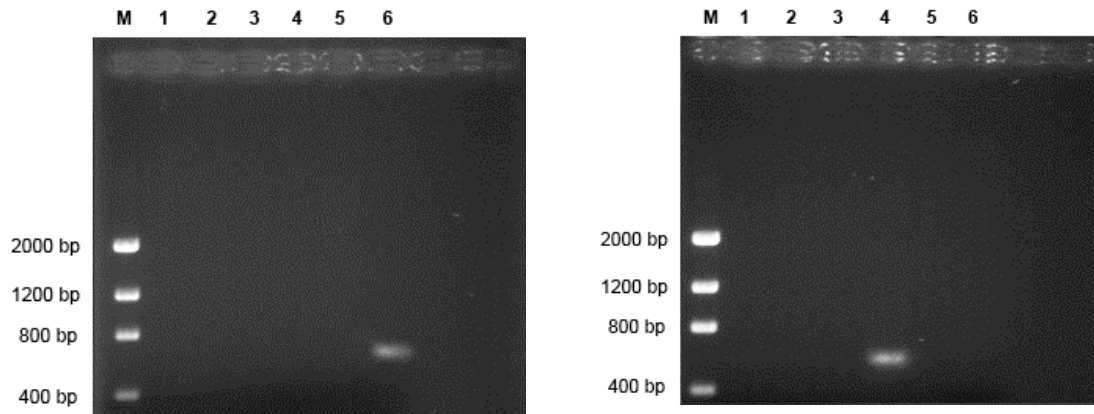
Bei 7 der 11 Probandinnen (63,6%) gelang kein Nachweis (-) von bifidobakterienspezifischer DNA aus den untersuchten Frauenmilchproben.

In insgesamt 61 von 66 Milchproben (92,4%) konnte mit der angewandten Methode keine bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden.

Wie in Abschnitt 2. 4. beschrieben, konnte bei insgesamt 8 Frauenmilchproben nur ein Volumen von 1 ml bzw. 1,5 ml verwendet werden. Bei keiner dieser 8 Frauenmilchproben gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA.

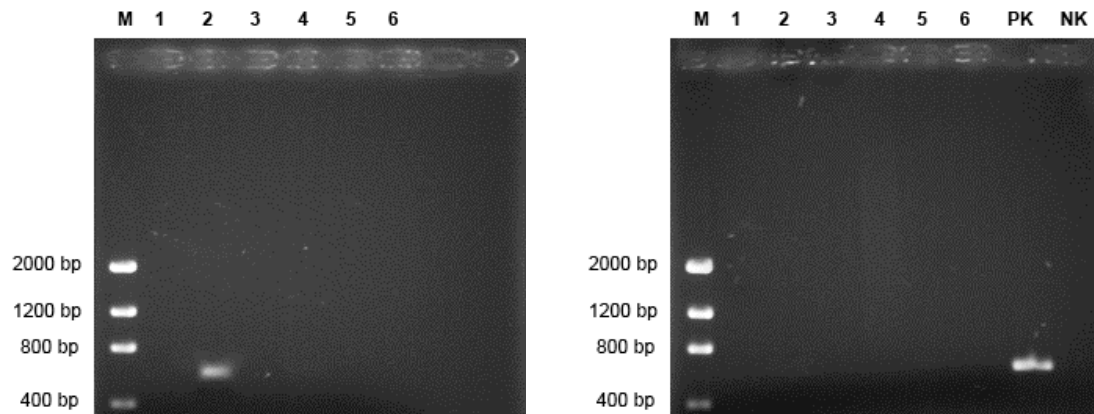


**Abbildung 8:** Probandin III (1-6);Bande am Abnahmetermin 3 links (3) und rechts (6);Größenmarker (M)



**Abbildung 9 (links):** Probandin VII (1-6); Bande am Abnahmetermin 3 rechts (6); Größenmarker (M)

**Abbildung 10 (rechts):** Probandin VIII (1-6); Bande am Abnahmetermin 1 rechts (4); Größenmarker (M)



**Abbildung 11 (links):** Probandin X (1-6); Bande am Abnahmetermin 2 links (2); Größenmarker (M)

**Abbildung 12 (rechts):** Probandin XI (1-6); Bande beim *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ (Positivkontrolle, PK); Negativkontrolle (NK); Größenmarker (M)

**Legende zu den Abbildungen 8-12:**

1. Abnahmetermin (1 linke Brust, 4 rechte Brust);
2. Abnahmetermin (2 linke Brust, 5 rechte Brust);
3. Abnahmetermin (3 linke Brust, 6 rechte Brust)

#### 4. 11. Statistische Analyse \*

Für eine statistische Analyse der PCR-Ergebnisse der Hauptstudie wurde ein Chi-Quadrat Test mit der Software R (47) durchgeführt. Im Vergleich wurden die Ergebnisse und Nachweisquoten von 4 internationalen Studien herangezogen, siehe Tabelle 19.

**Tabelle 19:** Übersicht der herangezogenen Studien für die statistische Analyse

Studie	Probandinnenzahl	positive Nachweise	Quote in %
Grönlund 2007 (15)	61	61	100
Gueimonde 2007 (16)	20	17	85
Martín 2009 (37)	23	22	95,65
Collado 2009 (11)	50	50	100
vorliegende Studie	11	4	36,36

Mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests konnten die Nachweisquoten der 4 Studien mit der vorliegenden verglichen werden. Aufgrund der kleinen Stichprobenzahlen ist der p-Wert durch Simulation bestimmt worden.

Die Nachweisquote der vorliegenden Studie ist mit der kleinsten Quote aus den 4 aufgelisteten Studien verglichen worden. Es handelt sich hierbei um die bei Gueimonde et al. (16) beschriebene positive Nachweisquote von 17 zu 20. Die Teststatistik war 7,6822 mit einem Simulations-p-Wert von 0,0133.

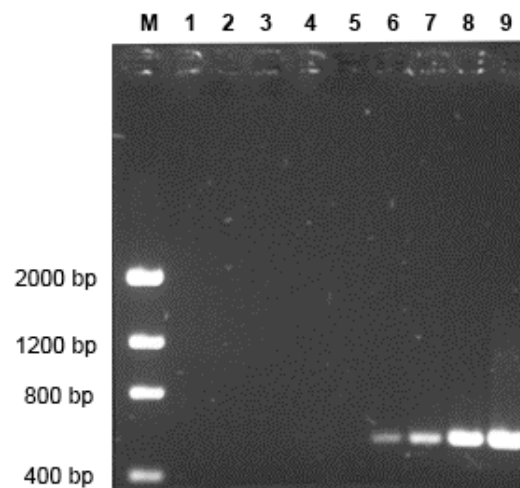
Daraus kann geschlossen werden, dass die Nachweisquote der in der vorliegenden Studie verwendeten, molekularbiologischen Methode signifikant kleiner ist, als die Quoten in den anderen zum Vergleich herangezogenen Studien.

\* Durchführung des statistischen Nachweises durch Herrn Prof. Antony Unwin, Ph.D., Universität Augsburg, Institut für Mathematik, Lehrstuhl für Rechnerorientierte Statistik und Datenanalyse

#### 4. 12. Ermittlung der unteren Nachweisgrenze

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes sollte die untere Nachweisgrenze der verwendeten Methode bestimmt werden.

Es wurde eine Bakterienanzahl von  $2,185 \times 10^9$  pro ml für den *Bifidobacterium infantis* Stamm ermittelt und eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten bis minimal 21,85 Bakterien pro ml hergestellt, wie in Abschnitt 3. 10. beschrieben. Die molekularbiologische Weiterverarbeitung aller Verdünnungsstufe erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei den Frauenmilchproben. Nach der DNA-Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit wurde die gewonnene DNA in einer PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R eingesetzt, wie in Punkt 3. 10. aufgeführt wird.



**Abbildung 13:** Verdünnungsreihe des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ von 21,85 Bakterien/ml (1) bis  $2,185 \times 10^9$  Bakterien/ml (9); Größenmarker (M)

Die Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes sind bis zu einer Verdünnungsstufe von  $2,185 \times 10^6$  Bakterien pro ml mit der in dieser Studie verwendeten Methode darstellbar, siehe Abbildung 13. Ab einer Menge von  $2,185 \times 10^5$  Bakterien pro ml und weniger lässt sich auf dem Agarose-Gel, im Anschluss an die PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R, keine Bande mehr erkennen.



#### 4. 13. PCR mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase

Zum möglichen Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben wurde am Ende der Untersuchungen der Hauptstudie ergänzend eine Taq-Polymerase der Firma OLS® OMNI Life Science GmbH in einer PCR mit den bifidobakterienspezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R getestet. Es wurde exemplarisch das DNA-Material der Probandinnen V 1 links und X 1 rechts eingesetzt, nach der DNA-Isolierung mittels FastDNA® SPIN Kit. Als Positivkontrolle diente das Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™, bidestilliertes Wasser als Negativkontrolle. Pro Probe wurden gemäß den Herstellerangaben 4 verschiedene Pufferlösungen (1 - 4) jeweils mit Enhancer (Verstärker) A, Enhancer B und einmal nur mit bidestilliertem Wasser getestet, wie in Abschnitt 3. 11. beschrieben.

**Tabelle 20:** Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in der PCR mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase

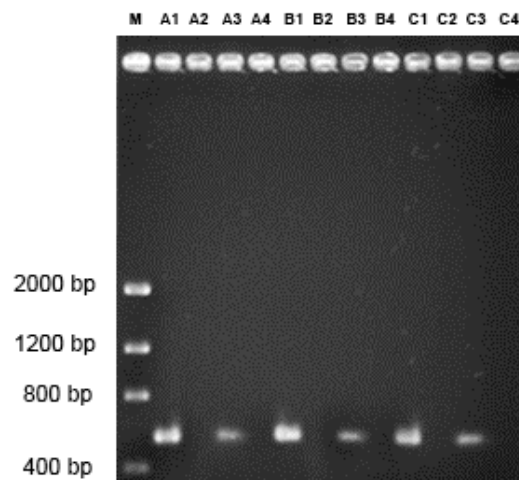
Puffer und Enhancer	Nachweis V 1 links	Nachweis X 1 rechts	Nachweis Positivkontr.
Puffer 1 + Enhancer A	-	-	+
Puffer 1 + Enhancer B	-	+	+
Puffer 1 + dest. Wasser	-	-	+
Puffer 2 + Enhancer A	-	+	+
Puffer 2 + Enhancer B	-	-	+
Puffer 2 + dest. Wasser	-	-	+
Puffer 3 + Enhancer A	-	-	+
Puffer 3 + Enhancer B	-	-	+
Puffer 3 + dest. Wasser	-	+	+
Puffer 4 + Enhancer A	-	+	+
Puffer 4 + Enhancer B	-	+	+
Puffer 4 + dest. Wasser	-	+	+

Der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase eingesetzt in einer PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R gelang (+) bei der Frauenmilchprobe X 1 rechts bei 6 von 12 Ansätzen und bei dem Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stamm (siehe Tabelle 20).

Dabei gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in der Milchprobe X 1 rechts unter Verwendung des Puffers 4 sowohl mit der Enhancerlösung A und B als auch nur mit bidestilliertem Wasser (dest. Wasser), siehe Abbildung 14. Unter Verwendung des Puffers 1 gelang der Nachweis bei dieser Milchprobe nur mit Enhancer

B, bei Puffer 2 mit Enhancer A und bei Puffer 3 nur mit bidestilliertem Wasser ohne den zusätzlichen Einsatz einer Verstärkerlösung. Damit ist das Ergebnis der PCR aus Punkt 4. 10. für die Frauenmilchprobe X 1 rechts widerlegt, bei welcher keine bifidobakterienspezifische DNA in dieser Milchprobe nachgewiesen werden konnte.

Bei der Frauenmilchprobe V 1 links konnte keine bifidobakterienspezifische DNA in der PCR mit der omnitacq-OLS®-DNA-Polymerase nachgewiesen (-) werden, das Ergebnis der PCR aus Punkt 4. 10. wurde bestätigt.



**Abbildung 14:** Testdurchlauf der omnitacq-OLS®-DNA-Polymerase und Puffer Nummer 4; Enhancer A (A), Enhancer B (B), bidestilliertes Wasser (C); *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ (1), Negativkontrolle (2), Probandin X 1 rechts (3), Probandin V 1 links (4); Bande beim *Bifidobacterium* (A1, B1, C1); Nachweis bei Probandin X 1 rechts (A3, B3, C3); Größenmarker (M)

## 5. Diskussion

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurden Frauenmilchproben untersucht, um mittels kultureller Analyse und einer molekularbiologischen Methode Bifidobakterien in Frauenmilch nachzuweisen.

Zu Beginn der Untersuchungen gab es nur wenige Veröffentlichungen zu dieser Thematik, das heißt zum Nachweis von Bifidobakterien in Frauenmilch. Das änderte sich erst in den letzten 4 bis 5 Jahren durch mehrere Publikationen von internationalen Forschergruppen (2, 3, 11, 15, 16, 33, 37, 45, 57, 62).

In der vorliegenden Studie wurde bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilchproben nachgewiesen und im Vergleich mit internationalen Veröffentlichungen eine weitere Methode für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch getestet.

### 5. 1. Diskussion der Ergebnisse der Vorstudie

#### Kulturelle Analyse

Um Bifidobakterien mit Hilfe der kulturellen Analyse in Frauenmilch nachzuweisen, wurden im Rahmen der Vorstudie Milchproben von insgesamt 18 Probandinnen auf bifidobakterienspezifischen Kultur-Agarplatten ausgestrichen.

Eine Kultivierung von Bifidobakterien aus Frauenmilch gelang nicht, wie in Abschnitt 4. 1. beschrieben wurde.

Es wurden vielfältige Transportmöglichkeiten getestet, um möglichst optimale Bedingungen zu erreichen. Die problemlose Kultivierung von Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes, welche der Frauenmilch zugesetzt wurden, zeigte, dass sowohl die gewählten Transportmethoden, als auch die Kultur-Agarplatten das Wachstum von Bifidobakterien in Frauenmilch ermöglichten.

In diesen Fällen wurden jeweils 0,2 ml des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes, entsprechend einer Anzahl von  $1,28 \times 10^7$  Bifidobakterien, der Frauenmilch zugesetzt, eine Untersuchung mit geringeren Mengen erfolgte nicht. Es kann somit keine Aussage zur Sensitivität der gewählten Methode getroffen werden.

Die 18 untersuchten Frauenmilchproben wurden im Rahmen der Vorstudie außerdem ohne vorherige Keimreduktion der Brustwarze oder des Warzenvorhofes abgenommen. Es kann daher vermutet werden, dass, falls sich Bifidobakterien in einer dieser Milchproben in geringer Anzahl befanden, die in Überzahl vorhandenen Hautbakterien das mögliche Wachstum dieser Bifidobakterien dominant beeinflussten.

In der Literatur sind nur wenige Arbeiten zu finden, welche die erfolgreiche Kultivierung von Bifidobakterien auf Kultur-Agarplatten beschreiben (33, 37, 56, 57).

Die Gruppe um Martín (37) verwendete hierzu ebenfalls ein MRS-Medium (de Man, Rogosa and Sharp; Roth, Deutschland), welches auch in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde. Jedoch wurde der Kultur-Agar bei Martín et al. (37) zusätzlich mit der Aminosäure L-Cystein angereichert und die ersten Tropfen der Frauenmilch bei der Probenabnahme verworfen, um Verunreinigungen zu minimieren. Auf diese Weise konnten bei 8 von 23 Frauenmilchproben Bifidobakterien auf den Agarplatten angezüchtet werden. Die oben genannten Verfahrensweisen scheinen gut geeignet zu sein, um Bifidobakterien aus Frauenmilchproben anzuzüchten und sollten daher unbedingt in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Dass Bifidobakterien schwer zu kultivieren sind, zeigt sich darin, dass mit der gleichen Verfahrensweise, die von Martín et al. beschrieben (37) wurde, unter anderem bei Perez et al. (45) zwei Jahre zuvor keine Kultivierung von Bifidobakterien aus Frauenmilch gelang.

Eine weitere interessante Beobachtung hierzu wurde mit der Arbeit von Sinkiewicz und Nordström (56) geliefert, in der regionale und ethnische Differenzen in der mikrobiologischen Zusammensetzung von Frauenmilchproben bezüglich Bifidobakterien und Laktobazillen beschrieben wurden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten Unterschiede zwischen Frauenmilchproben aus Europa, Asien, Afrika und Südamerika sowie zwischen städtischen und ländlichen Regionen auf. Unter anderem zeigten Stichproben, dass z. B. in Japan und Südkorea bei einer sehr großen Anzahl von Milchproben Bifidobakterien nachweisbar waren, im Gegensatz zu Stichproben aus Peru und Dänemark. Außerdem konnte festgestellt werden, dass in ländlichen Regionen nationalitätenunabhängig Milchsäurebakterien in einer größeren Anzahl aus Frauenmilchproben nachzuweisen waren.

Es kann daher vermutet werden, dass neben methodischen Differenzen auch regionale und ethnische Unterschiede der Frauenmilch den kulturellen Nachweis von Bifidobakterien beeinflussen. Trotz gleicher Verfahrensweisen erbrachten Studien aus

Spanien von Martín et al. (37) und der Schweiz von Perez et al. (45) unterschiedliche Ergebnisse. Andererseits könnten diese regionalen Unterschiede auch durch die Instabilität der Methode begründet sein. Es sollten an dieser Stelle intensive kulturelle Untersuchungen von Frauenmilch folgen, um die Frage zu klären, ob die schwierige kulturelle Anzucht der Bifidobakterien durch mangelnde Reproduzierbarkeit der Methode oder durch regionale Unterschiede bedingt ist. Verwendet werden sollte dazu die bisher in der Literatur als am erfolgreichsten beschriebene Methode von Martín et al. (37).

### **Aufbereitung der Frauenmilchproben**

Getestet wurden mit der vorliegenden Studie zwei Möglichkeiten der DNA-Extraktion, unterschiedliche Zeitpunkte der Isolierung und verschieden große Milchvolumina.

Die Versuche erfolgten im Rahmen der Vorstudie nicht systematisch.

Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4. 2. zeigten, scheint die DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit insgesamt günstiger für die Isolierung von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch zu sein, wobei im direkten Vergleich mit beiden Extraktionsmethoden nur eine kleine Stichprobengröße von 5 Frauenmilchproben untersucht wurde.

Außerdem wurden bei den ersten Milchproben größere Volumina von Frauenmilch verarbeitet als im weiteren Verlauf der Vorstudie. Das Protokoll für die Phenol-Chloroform-Extraktion verlangte ein eingesetztes Volumen von 10 ml Milch. Trotzdem konnte bifidobakterienspezifische DNA im Anschluss an die Phenol-Chloroform-Extraktion gerade bei der Frauenmilchprobe Nummer 15 nachgewiesen werden, bei der abnahmetechnisch bedingt nur 5 ml Milch eingesetzt werden konnte. Weitere Untersuchungen von Frauenmilchproben, deren DNA aus geringeren Milchvolumina mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert wurde, erfolgten nicht. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass aus einem größeren Volumen mit Hilfe dieser Extraktionsmethode nur deshalb keine bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden konnte, weil zuviel Material und eventuell verbleibende Inhibitoren für die PCR aus der Frauenmilch diese empfindliche Nachweismethode nachhaltig beeinträchtigten (7).

Ein Austesten von weiteren DNA-Isolationsmethoden für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht.

In zukünftigen Studien könnte zum Beispiel der QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, Deutschland) ausprobiert werden. Dieser wurde in anderen Studien erfolgreich bei Untersuchungen mit Frauenmilch eingesetzt, die erzielten Ergebnisse und erbrachten Nachweise lagen deutlich über jenen der hier vorliegenden Studie (16, 36, 37).

Zum Beispiel konnte bei Martín et al. (37) auf der Grundlage der DNA-Extraktion mittels des QIAamp DNA Stool Mini Kit bei 22 von 23 untersuchten Frauenmilchproben bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden. Der weitere Verlauf der molekularbiologischen Untersuchung inklusive verwendeter Primer und PCR-Analyse unterschied sich ebenfalls deutlich vom Verlauf der hier vorliegenden Studie. Eine bessere Ausbeute nur aufgrund der verwendeten Extraktionsmethode anzunehmen, könnte zu diesem Zeitpunkt vermutet werden und müsste in folgenden Studien eingehend untersucht sowie getestet werden.

Für die weiteren Untersuchungen und auch für die Frauenmilchproben der Hauptstudie wurde im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen letztendlich die DNA-Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit gewählt.

### **PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R**

Im Verlauf der vorliegenden Studie wurde das DNA-Material von insgesamt 12 Frauenmilchproben nach der Isolation mit dem FastDNA® SPIN Kit in einer weiteren PCR mit den für Bifidobakterien spezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R eingesetzt. Für das Programm dieser PCR wurde eine Annealing-Temperatur von 58 °C gewählt, nachdem eine optimale Annealing-Temperatur für die Primer im Vorfeld ausgetestet wurde. Weitere Milchproben konnten nicht untersucht werden, da das DNA-Material teilweise bereits aufgebraucht war.

Die Ergebnisse in Abschnitt 4. 6. zeigten, dass die höhere Annealing-Temperatur von 58 °C besser für die eingesetzten Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R geeignet ist, da bei mehr Frauenmilchproben der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA gelang.

Insgesamt konnte im Rahmen der Vorstudie bei 9 von 24 untersuchten Frauenmilchproben bifidobakterienspezifische DNA durch die PCR mit den Primern g-Bifid-R und g-Bifid-F nachgewiesen werden, obwohl mittels der bifidobakterienspezifischen Kultur-Agarplatten keine Kultivierung von Bifidobakterien gelang.

Es stellt sich erneut die Frage, wieso keine Anzucht von Bifidobakterien aus der Frauenmilch auf bifidobakterienspezifischen Kultur-Agarplatten möglich war, wenn doch bifidobakterienspezifische DNA mit der PCR-Analyse nachgewiesen werden konnte. Weiterhin stellt sich die Frage, ob in der Frauenmilch überhaupt Bifidobakterien vorhanden sind oder nur deren DNA und wenn dem so ist, wie diese DNA in die Frauenmilch gelangt.

Einige Veröffentlichungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die Kultivierung von Bifidobakterien aus Frauenmilch prinzipiell möglich ist, wenn sie sich auch, wie oben beschrieben, schwierig gestaltet (33, 37, 56, 57).

Die Frage, wie die Bifidobakterien oder Sequenzen ihrer DNA in Frauenmilch gelangen, ist bis zum heutigen Tag nicht hinreichend geklärt.

Lange Zeit galt die Annahme, dass Bifidobakterien und Laktobazillen den kindlichen Magen-Darm-Trakt unter anderem auf die gleiche Weise besiedeln, wie Bakterien vaginalen Ursprungs. Nach der Geburt und der damit verbundenen oralen Besiedlung des Neugeborenen werden die Bakterien vaginalen Ursprungs durch das Anlegen an die mütterliche Brust auf die Brustdrüse und in die Milchgänge übertragen und stellen im Verlauf eine Quelle für die Besiedlung des kindlichen Magen-Darm-Trakts dar.

Dieser Annahme wurden in den letzten Jahren viele Studien gegenübergestellt, die belegen, dass die Frauenmilch selbst die Quelle für Bifidobakterien und Laktobazillen darstellt, die den kindlichen Darm besiedeln (11, 16, 34, 35, 36, 57). In Bezug auf den Geburtsmodus konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Die vaginale Entbindung scheint eine untergeordnete Rolle bei der bakteriellen Zusammensetzung der kindlichen Darmflora zu spielen, denn auch nach Schnittentbindungen wurde eine große Vielfalt von Milchsäurebakterien im kindlichen Darm gestillter Säuglinge nachgewiesen (34, 36).

Eine weitere Theorie bezüglich der Frage, wie die Bifidobakterien bzw. Sequenzen ihrer DNA in die Frauenmilch gelangen, wurde von der Gruppe um Perez im Jahr 2007 (45) aufgestellt. Die Forschergruppe konnte identische Sequenzen ribosomaler DNA (rDNA) von Bifidobakterien sowohl in Stuhlproben von Müttern und ihren gestillten Säuglingen

nachweisen, als auch im mütterlichen Blut und in der Frauenmilch selbst. Es wurde angenommen, dass aus der Darmflora der Mutter stammende bakterielle rDNA-Sequenzen mittels mononukleärer Zellen des peripheren Blutes durch das mütterliche Kreislaufsystem in die Brustdrüse transportiert werden. Es wurde hier von einer bakteriellen Translokation als einzigartiger physiologischer Prozess ausgegangen, welcher, einer Untersuchung der gleichen Forschergruppe bei Mäusen zufolge, während der Spätschwangerschaft und Stillzeit zunahm.

Zusammenfassend würde diese Theorie der Translokation von Perez et al. (45) den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilchproben erklären, welcher auch mit der vorliegenden Studie gelang. Nicht geklärt ist weiterhin, ob auf diese Weise auch Bifidobakterien selbst aus dem Darm der Mutter in die Brustdrüse und anschließend über die Frauenmilch in den Magen-Darm-Trakt des gestillten Säuglings gelangen können.

Dass sich Bifidobakterien in der Frauenmilch befinden, wurde, wie oben aufgeführt, in den letzten Jahren mehrmals bewiesen (33, 37, 56, 57), obwohl die Kultivierung aus der Frauenmilch in der hier vorliegenden Studie nicht funktionierte.

Weitere Untersuchungen sollten folgen, um die Theorie der Translokation empirisch und auf breiter Basis belegen zu können und um letztendlich die Frage zu klären, wie Bifidobakterien und deren DNA-Sequenzen in die Frauenmilch gelangen.

### **Optimierung der Versuchsabläufe**

Im weiteren Verlauf der Vorstudie erfolgten Optimierungsversuche, um für die sich anschließende Hauptstudie optimale Bedingungen und Versuchsabläufe für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilchproben mittels der gewählten molekularbiologischen Methode herauszufinden.

Wie die Ergebnisse im Abschnitt 4. 4. zeigten, stellte dabei der Einsatz von Verdünnungsreihen der Milchproben keine Optimierungsvariante dar.

Auch durch die Verwendung der für Bifidobakterien spezifischen Primer Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r in einer PCR mit DNA-Material von 12 Frauenmilchproben, wie unter 4. 3. beschrieben, gelang kein Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA, obwohl bei 8 dieser 12 Milchproben der Nachweis mittels der PCR mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R im Vorfeld bereits gelungen war.



Die an dieser Stelle der Studie eingesetzten Primer Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r sowie das PCR-Programm wurden verwendet, wie bei Reichardt (48) nach Vornahme von Modifikationen beschrieben. Reichardt erhielt auf diese Weise ein PCR-Produkt für DNA aus Reinkulturen von *Bifidobacterium longum*, *bifidum*, *infantis*, *pseudocatenulatum* und *lactis* Bb12 sowie als Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus den Stuhlproben von Frühgeborenen.

Es wird daher insgesamt von der Annahme ausgegangen, dass die Primer Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r weniger gut für Untersuchungen mit Frauenmilch geeignet sind, als die Primer g-Bifid-F und g-Bifid-R.

Die Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes, welche, wie in Punkt 4. 7. beschrieben, 5 Frauenmilchproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Abnahme zugesetzt wurden, ließen sich problemlos mit den gewählten molekularbiologischen Methoden sowie im Rahmen der kulturellen Analyse nachweisen.

Dabei konnte die bifidobakterienspezifische DNA im Anschluss an beide DNA-Extraktionsmethoden sowohl nach der Weiterverarbeitung am Entnahmetag als auch nach einer Lagerung bei -20 °C nachgewiesen werden.

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die in der vorliegenden Studie gewählten Methoden für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch grundsätzlich geeignet sind. Dennoch muss an dieser Stelle konstatiert werden, dass Untersuchungen mit weiteren Bifidobakterienstämmen und mit einer geringeren Anzahl von zugesetzten Bakterien nicht durchgeführt wurden, um diese Annahme auf breiter Basis belegen zu können. Verwendet wurden für diese Untersuchung jeweils 0,2 ml des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes, entsprechend einer Anzahl von  $1,28 \times 10^7$  Bifidobakterien pro Frauenmilchprobe.

Im Rahmen der Vorstudie konnten durch die Versuche mit den Frauenmilchproben zur Frage des Zeitpunktes und der Art der optimalen molekularbiologischen Weiterverarbeitung keine Aussagen getroffen werden, da die Untersuchungen nicht nach einheitlichen Kriterien erfolgten.

Um möglichst optimale Bedingungen zu erarbeiten, erfolgte exemplarisch eine Untersuchung von Kuhmilch, der Bifidobakterien des *Bifidobacterium infantis* ATCC® 15702™ Stammes zugesetzt wurden, wie in Abschnitt 4. 8. aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass bifidobakterienspezifische DNA bevorzugt bei den Frauenmilchproben nachweisbar war, die vor der molekularbiologischen Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert wurden. Diese Beobachtung würde sich mit einer physikalischen Methode des Zellaufschlusses erklären lassen (25). Bei dieser Zellaufschlussmethode wird durch thermische Veränderungen, wie durch Einfrieren und anschließendes Auftauen von Suspensionen erreicht, dass die entstehenden Eiskristalle den Druck in der Zelle erhöhen und ein Aufplatzen der Zellmembran bewirken. Dementsprechend würde eine Lagerung der Milchproben bei -20 °C vor der eigentlichen DNA-Extraktion die Ausbeute von DNA-Material erhöhen können.

Für den Ablauf der sich anschließenden Hauptstudie wurde die Aufbereitungsmethode des FastDNA® SPIN Kit gewählt, da gleich gute Ergebnisse erzielt wurden und diese Methode weniger aufwendig durchzuführen war. Weiterhin wurde eine Lagerung der Milchproben bei -20 °C vor der Weiterverarbeitung angestrebt, weil auf diese Weise zusätzlich ein physikalischer Zellaufschluss initiiert werden könnte.

### **Klonierung und Sequenzierung**

Durch die Ergebnisse der Klonierung und anschließenden Sequenzierung, wie in Abschnitt 4. 9. beschrieben, kann festgehalten werden, dass mittels der PCR mit den gewählten Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R eindeutig bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilch nachgewiesen wurde.

Die 3 Frauenmilchproben sowie der Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stamm konnten zu 99-100% der Spezies der Bifidobakterien zugeordnet werden. Die exemplarische Sequenzierung der Plasmid-DNA dieser Proben diente somit als Bestätigung der gewählten molekularbiologischen Methode.

Für eine eindeutige Zuordnung der Probe 8 zu einer Subspezies wäre vermutlich eine längere Sequenz oder eine Wiederholung der Klonierung und Sequenzierung mit spezifischeren Primern nötig gewesen, welche an dieser Stelle jedoch nicht durchgeführt wurde.

In der Literatur sind neben dem eigentlichen Nachweis von Bifidobakterien und bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilch auch einige Studien zu finden, die über die nachgewiesenen Subspezies berichten:

Martín et al. konnten 2009 (37) aus Frauenmilchproben *Bifidobacterium breve*, *adolescentis* und *bifidum* isolieren. Der Gruppe um Gueimonde (16) gelang die Isolation von *Bifidobacterium longum* inklusive der Untergruppe *Bifidobacterium infantis* aus allen positiv getesteten Frauenmilchproben. Weiterhin konnten *Bifidobacterium animalis*, *bifidum* und *catenulatum* nachgewiesen werden sowie vereinzelt *Bifidobacterium adolescentis* und *breve*. Perez et al. wiesen 2007 (45) *Bifidobacterium longum* in Frauenmilchproben nach. Alp und Aslim (2) gelang der Nachweis von *Bifidobacterium bifidum*, *breve*, *longum* und *pseudocatenulatum* aus Frauenmilch.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie gliedern sich in diese Nachweisreihen von Bifidobakterien-DNA aus Frauenmilchproben ein. Zusätzlich konnte DNA des *Bifidobacterium angulatum* in Frauenmilch nachgewiesen werden.

Es erfolgte im weiteren Verlauf der vorliegenden Studien keine erneute Klonierung und Sequenzierung der übrigen positiven Nachweise von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilchproben. In Hinblick auf die in der vorliegenden Studie nachgewiesene DNA des *Bifidobacterium angulatum*, welches in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, sollten in zukünftigen Studien alle erbrachten Nachweise weiter untersucht werden, um den Wissensstand über die Subspezies der Bifidobakterien in Frauenmilch zu erweitern.

## 5. 2. Diskussion der Ergebnisse der Hauptstudie

Auf der Grundlage der Ergebnisse der oben aufgeführten Vorstudie erfolgte im Anschluss eine strukturierte und einheitliche Untersuchung von Frauenmilchproben im Rahmen einer Hauptstudie.

Die bei dieser Hauptstudie untersuchten Frauenmilchproben von insgesamt 11 Probandinnen wurden unmittelbar nach ihrer Abnahme bei -20 °C gelagert. Auf diese Weise war es möglich, den Transport und die molekularbiologische Weiterverarbeitung aller Milchproben unter einheitlichen Bedingungen erfolgen zu lassen. Unterschiede und Abweichungen bei der Weiterverarbeitung konnten so minimiert werden.

Eine kulturelle Analyse der Milchproben wurde nicht durchgeführt, da eine Kultivierung von Bifidobakterien mit den gewählten Methoden im Rahmen der Vorstudie nicht gelungen war.

### Aufbereitung der Frauenmilchproben

Nach Aufbereitung der insgesamt 66 Frauenmilchproben mit dem FastDNA® SPIN Kit erfolgte eine Bestimmung der DNA-Konzentrationen aller Frauenmilchproben, welche eine große Spannweite zeigten, wie in Abschnitt 4. 10. aufgezeigt wurde.

Damit wurden auf der einen Seite die Anforderungen des Herstellers der bei der PCR eingesetzten Taq-Polymerase erfüllt, welche eine Templatmenge von 10 pg bis 1000 ng voraussetzt, um optimal zu arbeiten. Andererseits wurde für den PCR-Reaktionsansatz unabhängig von der DNA-Konzentration jeweils genau 1 µl der gewonnenen DNA pro Milchprobe eingesetzt und damit bei den meisten Proben eine relativ geringe DNA-Menge verwendet.

Es wird vermutet, dass die Verwendung einer definierten Templatmenge von beispielsweise 500 ng pro Probe zur Stabilität der Methode beigetragen und möglicherweise eine bessere Ausbeute erbracht hätte.

Weiterhin ist auffällig, dass auch bei dem als Positivkontrolle eingesetzten Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ nur eine DNA-Konzentration von 23,99 ng/µl gemessen werden konnte. Es zeigte sich, bezogen auf die DNA-Konzentrationen, nur eine geringe Ausbeute von DNA durch die Extraktion mit dem FastDNA® SPIN Kit, sowohl bei den Frauenmilchproben als auch bei dem angezüchteten Bifidobakterienstamm.

Ein diesbezüglicher Vergleich mit der in der Vorstudie ebenfalls angewendeten Phenol-Chloroform DNA-Extraktion war nicht möglich, da im Anschluss an diese Extraktionsmethode keine Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte. Die Ausbeute dieser Methode lag, gemessen an den erbrachten Nachweisen im Rahmen der Vorstudie, noch niedriger als bei der Extraktion mittels FastDNA® SPIN Kit, wie oben bereits erwähnt.

In internationalen Veröffentlichungen lagen die Ergebnisse und erbrachten Nachweise unter Verwendung des QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, Deutschland) deutlich über denen der hier vorgestellten Studie (16, 36, 37). Natürlich unterschied sich auch die weitere molekularbiologische Analyse dieser Studien von der hier vorliegenden und eine bessere Ausbeute lediglich aufgrund der verwendeten Extraktionsmethode kann nur vermutet werden. In zukünftigen Studien sollte daher im Vorfeld der QIAamp DNA Stool Mini Kit an Frauenmilch und gezüchteten Bifidobakterienstämmen getestet und anhand der DNA-Konzentration mit dem FastDNA® SPIN Kit verglichen werden, um die Ausbeute und perspektivisch auch die Ergebnisse der verwendeten Methode zu verbessern.

### **Abnahmebedingungen**

Die Milchproben zur Durchführung der Hauptstudie wurden, um Verunreinigungen zu minimieren, mit sterilisierten Hand-Brustpumpen abgenommen, unabhängig vom Zeitpunkt des letzten Stillens und ohne das Verwerfen der Vormilch. Es ist anzunehmen, dass, wenn die erste Milchportion verworfen worden wäre, Verunreinigungen durch Hautkeime noch weiter hätten minimiert werden können. Da aber in den ersten Tagen nach der Entbindung teilweise nur sehr geringe Milchvolumina zur Verfügung stehen, war dies meist nicht möglich. Es wurde daher im Rahmen dieser Studie die erste Milchportion durchgängig nicht verworfen.

In zukünftigen Studien sollte, um in diesem Punkt Verbesserungen zu erzielen, darauf geachtet werden, dass die Probenentnahme nach einem möglichst langen Abstand zum letzten Stillen erfolgt und die erste Milchportion bzw. wenigstens die ersten Milchtropfen verworfen werden. Auf diese Weise würde die Anzahl der Hautbakterien, die sich gegebenenfalls auch in den Brustdrüsengängen befinden, minimiert werden.

In der Studie von Martín et al. (37) wurde ähnlich verfahren. Die Milchproben wurden hier per Hand mit sterilen Handschuhen abgenommen, nach einer Säuberung der

Brustwarze und des Warzenhofes mit sterilem Wasser und Seife. Es wurde beschrieben, dass jeweils die ersten Tropfen verworfen wurden, entsprechend einer Menge von ca. 500 µl.

Die Verfahren sollten in zukünftigen Studien kombiniert werden, da durch den Einsatz der sterilisierten Hand-Brustpumpen wesentlich mehr Milch, vor allem in den ersten Tagen postpartal, gewonnen werden kann.

### **Vergleich der Abnahmezeitpunkte**

Die Abnahme der Frauenmilchproben für die Hauptstudie erfolgte bei jeder Probandin zu drei definierten Zeitpunkten, am 2. Tag ( $\pm 2$ ), am 10. Tag ( $\pm 2$ ) und am 18. Tag ( $\pm 2$ ) nach der Entbindung.

Wie in Abschnitt 4. 10. beschrieben, konnte im Rahmen des ersten Abnahmeterrmins nur ein einziges Mal bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden, bei Probandin VIII am 3. Tag nach der Entbindung, aus der Milchprobe der rechten Brust.

Damit gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA mit der vorliegenden Studie zu einem sehr frühen Zeitpunkt postpartal.

In der Untersuchung von Martín et al. aus dem Jahr 2009 (37) konnte am 4. Tag nach der Entbindung bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilch nachgewiesen werden und zwar als bisher zeitigster in der Literatur aufgeführter Nachweis postpartal. Zusätzlich gelang dieser Forschergruppe auch die in der Literatur erstmalige Beschreibung des kulturellen Nachweises von Bifidobakterien aus Frauenmilchproben auf Kultur-Agarplatten, abgenommen zwischen dem 4. und 7. Tag nach der Entbindung.

Bei den Frauenmilchproben der vorliegenden Studie, die im Rahmen des zweiten Abnahmeterrmins untersucht wurden, gelang ebenfalls nur einmal der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA, bei Probandin X am 10. Tag nach der Entbindung, aus der Milchprobe der linken Brust.

Im weiteren Verlauf konnte weder bei Probandin VIII noch bei Probandin X aus einer weiteren Milchprobe bifidobakterienspezifische DNA isoliert werden. Außerdem gelang bei diesen beiden Probandinnen der Nachweis auch nur aus der Milchprobe einer Brust des jeweiligen Abnahmetages.

Im Rahmen des dritten Abnahmeterrmins konnte bei insgesamt 3 Frauenmilchproben bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden, bei Probandin VII am 17. Tag

postpartal, aus der Milchprobe der rechten Brust sowie bei Probandin III am 19. Tag nach der Entbindung, aus den Frauenmilchproben beider Seiten.

Es gelang somit nur ein einziges Mal der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA bei mehr als einer untersuchten Milchprobe einer Probandin und nur einmal aus beiden Milchproben eines Abnahmetages.

Insgesamt konnte am 1. und am 2. Abnahmetermin bei nur jeweils einer der 22 untersuchten Frauenmilchproben bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden.

Am 3. Abnahmetag gelang der Nachweis bei 3 Proben von insgesamt 2 Probandinnen.

Es ist anzunehmen, dass zum Zeitpunkt des 3. Abnahmetermins, vom 16.-20. Tag nach der Entbindung, mehr bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilch zu finden ist, als zu früheren Zeitpunkten. Bei keiner der beiden Probandinnen vom 3. Abnahmetermin ließ sich bifidobakterienspezifische DNA am 1. oder 2. Abnahmetermin nachweisen. Demgegenüber steht die Tatsache, dass der Nachweis bei 2 Probandinnen nur jeweils einmal, am 3. Tag bzw. am 10. Tag postpartal gelang und danach im Verlauf nicht mehr, obwohl am 3. Abnahmetermin insgesamt deutlich mehr Proben positiv getestet wurden als vorher.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist es durch Untersuchungen von Stuhlproben wissenschaftlich belegt, dass bei gestillten Kindern mit zunehmendem Abstand zur Entbindung der Anteil von Bifidobakterien in der Darmflora ansteigt. Nachdem in den ersten Lebenstagen postnatal Enterokokken und Streptokokken in der mikrobiologischen Darmflora der Neugeborenen überwiegen, sind ab dem 10. Lebenstag Bifidobakterien als dominante Spezies der Darmflora in Stuhlproben frauenmilchernährter Kinder nachweisbar, gefolgt von Streptokokken, Laktobazillen und Enterokokken (2, 17, 26, 57).

Es wird grundsätzlich, wie bereits weiter oben beschrieben, vermutet, dass die in dieser Studie gewählte molekularbiologische Methode für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch zu wenig sensibel oder auch zu unspezifisch ist. Auf der einen Seite können die oben genannten Ergebnisse anderer Untersuchungen bezüglich der Zunahme von Bifidobakterien im Stuhl gestillter Säuglinge im Laufe der Zeit postnatal und auch die wachsenden Nachweise von bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilchproben mit den vorliegenden Ergebnissen nicht untermauert werden. Andererseits konnte in anderen Studien und

Veröffentlichungen bifidobakterienspezifische DNA aus Frauenmilchproben mit einer deutlich höheren Anzahl nachgewiesen werden.

Die Gruppe um Martín konnte beispielsweise 2009 (37) bei 22 von 23 Frauenmilchproben mittels einer nested-PCR mit den Primern Im3 und Im26 sowie den Primern Bif164-F und Bif662-R bifidobakterienspezifische DNA nachweisen. Zusätzlich konnten bei 8 von 23 untersuchten Frauenmilchproben Bifidobakterien mittels der kulturellen Analyse identifiziert werden. Gueimonde et al. gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA mit Hilfe einer PCR im Anschluss an die DNA-Extraktion mittels des QIAamp DNA Stool Mini Kit von Qiagen bei 17 von 20 Milchproben (16).

Obwohl zu bedenken ist, dass mit der vorliegenden Studie nur eine kleine Stichprobe untersucht wurde, so sind im Vergleich mit internationalen Untersuchungen andere Ergebnisse zu konstatieren, wie auch statistisch in Abschnitt 4. 11. kurz aufgezeigt wurde. Zukünftige Studien sollten sich daher beim Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch an den Methoden oben genannter Studien orientieren. Wie bereits beschrieben, sollte die DNA-Extraktion mittels QIAamp DNA Stool Mini Kit im Vergleich mit dem FastDNA® SPIN Kit getestet werden. Weiterhin bieten sich die bei Martín et al. (37) beschriebenen Bedingungen für die PCR an. Zusätzlich sollten die Abnahmebedingungen bei der Gewinnung der Frauenmilchproben, wie oben erwähnt, im Vorfeld optimiert werden.

### **Auswirkungen der Reinigung vor der Abnahme**

Bei den Probandinnen der vorliegenden Studie erfolgte an jedem Abnahmetag eine Entnahme von Frauenmilch aus der linken, unbehandelten Brust sowie aus der rechten, vorher mit sterilem Aqua gereinigten Brust. Auf diese Weise sollte eine Reduktion der Hautkeime jeweils einer Frauenmilchprobe erreicht werden, um zu untersuchen, ob sich dieses auf den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA auswirkt.

Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4. 10. zeigten, ließ sich ein Unterschied durch eine Reinigung der Brustwarze und des Warzenhofes vor der Abnahme in der vorliegenden Studie nicht erkennen.

Bei den Milchproben, die nach einer Keimreduktion mittels Wasser gewonnen wurden, ließ sich in einer geringen Prozentzahl mehr bifidobakterienspezifische DNA



nachweisen. Jedoch ist die Anzahl der an dieser Stelle zu vergleichenden Daten zu gering, als dass ein sich abzeichnender Trend beschrieben werden könnte.

Dieser Teil der Studie sollte nach dem Austesten einer sensitiveren molekularbiologischen Nachweismethode wiederholt werden.

Theoretisch wird bei dieser Untersuchung kein Unterschied im Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA durch eine Reduktion der Hautkeime erwartet. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die belegen, dass die Frauenmilch selbst die Quelle für die Bifidobakterien und Laktobazillen darstellt, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt postnatal besiedeln (11, 16, 34, 35, 36, 57), wenn auch weiterhin noch nicht hinreichend erklärt ist, wie die Bifidobakterien und deren DNA in die Frauenmilch gelangen.

Interessant ist aber trotzdem die Frage, ob eine verminderte Anzahl von Hautbakterien den Nachweis und das Wachstum der empfindlichen Bifidobakterien begünstigen würde, wenn davon ausgegangen wird, dass eine Überzahl der Hautbakterien das Wachstum von Bifidobakterien eventuell negativ beeinträchtigt.

Es muss aber auch in dieser Frage in Anbetracht der nicht als sensitiv genug erachteten Methode auf zukünftige Studien verwiesen werden.

### **Ermittlung der unteren Nachweisgrenze**

Es wurde mit einer Verdünnungsreihe des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ Stammes gearbeitet, um die untere Nachweisgrenze der in dieser Studie verwendeten Methode zu ermitteln. Wie in Abschnitt 4. 12. beschrieben, liegt die untere Nachweisgrenze, beeinflusst durch die Extraktionsmethode, die PCR und die Agarose-Gelelektrophorese, sehr hoch, was bereits im Vorfeld mehrmals vermutet wurde.

Da davon auszugehen ist, dass die Frauenmilchproben deutlich geringere Mengen an bifidobakterienspezifischer DNA enthalten, als der an dieser Stelle getestete Reinstamm, ist es nicht verwunderlich, dass nur bei 5 von 66 Milchproben der Hauptstudie auf diese Weise bifidobakterienspezifische DNA nachzuweisen war.

Es lässt sich vermuten, auch in Hinblick auf die höheren Nachweisquoten anderer Studien (16, 37), dass sich in deutlich mehr Frauenmilchproben der vorliegenden Studie bifidobakterienspezifische DNA befand und möglicherweise mit sensitiveren Methoden auch hätte nachgewiesen werden können.

In nachfolgenden Studien sollte daher bereits zu Beginn der Untersuchung und nach dem Austesten verschiedener Optimierungsmöglichkeiten für die DNA-Extraktion und PCR-Analyse die untere Nachweisgrenze durch Verdünnungsreihen mehrerer Reinstämmen ermittelt werden. Auf diese Weise könnten die Methoden weiter angepasst werden.

Während der vorliegenden Studie konnten diese Erkenntnisse zwar gewonnen, aus ressourcentechnischen Gründen aber nicht mehr umgesetzt werden.

### **PCR mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase**

Am Ende der Untersuchungen der Hauptstudie wurde ein Set der Firma OLS® OMNI Life Science GmbH (Deutschland) getestet, welches zur Amplifikation von GC-reichen DNA-Templates entwickelt wurde. Die zu den Actinomyceten zählenden Bifidobakterien gehören zu einer Gruppe von grampositiven Bakterien, die sich durch einen hohen Anteil von Guanin und Cytosin DNA-Basen (GC-reich) in ihrem DNA-Molekül auszeichnen (6, 28).

Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4. 13. zeigen, konnte mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase aus dem Material einer Probandin bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden, obwohl diese Probe im Vorfeld negativ getestet wurde.

Es bestätigt sich somit erneut die Annahme, dass die in der vorliegenden Studie getesteten molekularbiologischen Methoden zu wenig sensitiv für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch sind.

Der Einsatz der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase wurde am Ende der vorliegenden Hauptstudie stichprobenartig durchgeführt und konnte an dieser Stelle nicht für die gesamte Studie umgesetzt werden.

Für zukünftige Untersuchungen mit Frauenmilchproben könnten anhand der vorliegenden Daten optimale Bedingungen für die omnitaq- OLS®-DNA-Polymerase eruiert werden, um diese anstatt der Taq-Polymerase von Invitrogen™ in der PCR mit den für Bifidobakterien spezifischen Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R einzusetzen.

Diese Erkenntnisse könnten dann mit denen im Vorfeld aufgeführten und weiter oben beschriebenen Optimierungen kombiniert bei zukünftigen Untersuchungen von Frauenmilchproben angewendet werden.

## 6. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Studie gelang der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilchproben. Dabei wurde im Vergleich mit internationalen Studien eine weitere molekularbiologische Methode getestet.

Trotz einer geringen Stichprobenzahl knüpft die vorliegende Studie dabei an die Ergebnisse und Beobachtungen der internationalen Studien an:

Erstens ist eine Kultivierung von Bifidobakterien aus Frauenmilchproben auf Kultur-Agarplatten schwierig und gelang bisher nur wenigen Forschergruppen (33, 37, 56, 57). In der vorliegenden Studie gelang keine Kultivierung von Bifidobakterien.

Zweitens ist bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilch vorhanden und lässt sich mit geeigneten molekulargenetischen Methoden nachweisen. Eine Minimierung der Hautkeime der Brustwarze und des Warzenvorhofes vor der Gewinnung der Milchprobe hat keine Auswirkung auf den Nachweis, da die Frauenmilch selbst die Quelle für die Bifidobakterien und deren DNA darstellt, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt besiedeln (11, 16, 34, 35, 36, 57).

Schließlich sind Bifidobakterien und bifidobakterienspezifische DNA bereits wenige Tage postpartal in Frauenmilch nachweisbar, bei Martín et al. gelang der Nachweis am 4. Tag nach der Entbindung (37). In der vorliegenden Studie gelang bereits am 3. Tag postpartal der Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus einer Frauenmilchprobe.

Im Vergleich mit den Ergebnissen internationaler Studien ist die in der vorliegenden Studie verwendete molekularbiologische Methode offenbar zu wenig sensitiv für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilchproben, die verwendete kulturelle Methode ist gar nicht geeignet.

Im Rahmen der vorliegenden Vorstudie konnte bei 9 von 24 Probandinnen (37,5%) bifidobakterienspezifische DNA nachgewiesen werden, in der Hauptstudie bei 4 von 11 untersuchten Probandinnen (36,4%). Insgesamt wurden Frauenmilchproben von 35 Probandinnen untersucht, bei 13 Probandinnen (37,1%) gelang ein Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus den untersuchten Milchproben.

Für zukünftige Studien wurden in der Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse einige Optimierungsansätze formuliert.

Für die kulturelle Analyse sollten die ersten Milchtropfen nach einer Reinigung der Brustwarze verworfen werden, die Abnahme sollte möglichst mit einer sterilen Hand-Brustpumpe erfolgen. Die Verwendung eines MRS-Mediums, angereichert mit L-Cystein wie bei Martín et al. (37) beschrieben, hat sich als günstige Bedingung für die erfolgreiche Kultivierung von Bifidobakterien erwiesen.

Zur DNA-Extraktion sollten mehrere Methoden getestet werden, unter anderem der QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, Deutschland). Anschließend empfiehlt es sich, in oben genannter PCR die Taq-Polymerase mit Pufferset der Firma OLS® OMNI Life Science GmbH (Deutschland) einzusetzen sowie weitere Primer anderer Studien zu testen.

Auf diese Weise könnten die Ergebnisse und Erkenntnisse der vorliegenden Studie als methodenkritische Ansätze für zukünftige Untersuchungen von Frauenmilchproben gewertet werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen KF, Mihatsch W, Moreno LA, Puntis J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, van Goudoever J. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49 (1): 112-125.
2. Alp G, Aslim B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* 2010; 16 (2): 101-105.
3. Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Solís G, Salminen S, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol* 2011; 149 (1): 28-36.
4. Bakardjiev AI, Theriot JA, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathog* 2006; 2 (7): e80.
5. Beerens H, Romond C, Neut C. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. *Am J Clin Nutr* 1980; 33 (11): 2434-2439.
6. Beleut M. (2004). Untersuchung zur Katabolitrepression in *Bifidobakterien*. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
7. Bessetti J. (2007). An Introduction to PCR Inhibitors. URL: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Profiles%20In%20DNA/1001/An%20Introduction%20to%20PCR%20Inhibitors.ashx>; Abrufdatum: 15.03.2011.
8. Braun OH, Dehnert J, Hoffmann K, Kienitz M, Mayer JB, Reploh H, Reuter G, Seeliger HPR, Werner H. Die *Bifiduskeime* des Menschen. *Dtsch Med Wochenschr* 1964; 89: 1647-1652.

9. Braun OH. Über die infektionsverhütende Wirkung von Muttermilch und deren mögliche Ursachen. *Klin Padiatr* 1976; 188 (4): 297-310.
10. Braun OH, Heine WE. Zur physiologischen Bedeutung der Bifidusflora und des faekalen Lysozyms beim Brustkind. *Klin Padiatr* 1995; 207 (1): 4-7.
11. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48 (5): 523-528.
12. Ehler M. (2006). Molekularbiologischer Nachweis des Probiotikums Bb12 in den Fäzes von Frühgeborenen während einer probiotischen Supplementation. Potsdam: Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft.
13. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91 (441): 48-55.
14. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28 (1): 19-25.
15. Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2007; 37 (12): 1764-1772.
16. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 2007; 92 (1): 64-66.
17. Haarmann M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal Bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (5): 2318-2324.

18. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 (1): 61-67.
19. Heine H. Die bifidogene Wirkung der Muttermilch. *Kinderarztl Prax* 1989; 57 (3): 109-116.
20. Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Adv Food Nutr Res* 2008; 54: 45-80.
21. Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *Br Med J* 1990; 300 (6716): 11-16.
22. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005; 51 (4): 270-274.
23. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Res Microbiol* 2008; 159 (3): 187-193.
24. Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63 (4): 1268-1273.
25. Kellermann J. Aufplatzen erwünscht. Kriterien zur Auswahl der geeigneten Zellaufschlussmethode. *P&A Select Biotech* 2007; 5 (10): 24-27.
26. Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (6): 3158-3162.

27. Kunz C, Rudloff S. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 2006; 16: 1341-1346.
28. Lee JH, O'Sullivan DJ. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74 (3): 378-416.
29. Liepke C, Adermann K, Raida M, Mägert HJ, Forssmann HG, Zucht HD. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur J Biochem* 2002; 269 (2): 712-718.
30. López-Alaróon M, Villalpando S, Fajardo A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr* 1997; 127 (3): 436-443.
31. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (5): 1035S-1045S.
32. Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Mangin I, Touhami M, Bouziane-Nedjadi K, Pochart P. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 58 (3): 563-71.
33. Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49 (3): 343-348.
34. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143 (6): 754-758.
35. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* 2007; 158 (1): 31-37.



36. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* 2007; 103 (6): 2638-2644.
37. Martín R, Jiménez E, Heilig HG, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75 (4): 965-969.
38. Martinez G, Harel J, Gottschalk M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Can J Vet Res* 2001; 65 (1): 68-72.
39. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 (11): 5445-5451.
40. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 2003; 4 (2): 61-69.
41. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, Tanaka R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (1): 167-173.
42. Mitsuoka T, Kaneuchi C. Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nutr* 1977; 30 (11): 1799-1810.
43. Mülhardt C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. München: Elsevier.
44. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, von den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118 (2): 511-521.

45. Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119 (3): 724-732.
46. Petuely F. Der Bifidusfaktor. *Dtsch Med Wochenschr* 1957; 82 (46): 1957-1960.
47. R Development Core Team. (2010). R: A language and environment for statistical computing. Wien: R Foundation for Statistical Computing.
48. Reichardt N. (2004). Einfluss der oralen Gabe von *Bifidobacterium lactis* Stamm Bb12 auf die Populationsstruktur der intestinalen Mikrobiota Frühgeborener. Potsdam: Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft.
49. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005; 147 (2): 186-191.
50. Rotimi VO, Duerden BI. The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol* 1981; 14 (1): 51-62.
51. Salminen S, Isolauri E. Opportunities for improving the health and nutrition of the human infant by probiotics. *Nestlé Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008; 62: 223-237.
52. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (2): 504-513.
53. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (22): 14422-14427.

54. Schultz M, Göttl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38 (3): 293-297.
55. Seeliger HPR, Werner H. Quantitative und qualitative Untersuchungen über die anaeroben Lactobacillen im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Z Hyg Infektionskr* 1962; 148: 383-404.
56. Sinkiewicz G, Nordström EA. Occurrence of lactobacillus reuteri, lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk. *Pediatr Res* 2005; 58: 415.
57. Solís G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 2010; 16 (3): 307-310.
58. Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (6): 1225-1228.
59. Tasara T, Stephan R. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (10): 5957-5968.
60. Tissier H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourissons (état normal et pathologique)*. Paris: University of Paris.
61. Tissier H. (1905). *Répartition des microbes dans l'intestin du nourisson*. Paris: Annales de l'Institut de Pasteur.
62. Turrone F, Foroni E, Serafini F, Viappiani A, Montanini B, Bottacini F, Ferrarini A, Bacchini PL, Rota C, Delledonne M, Ottonello S, van Sinderen D, Ventura M. Ability of *Bifidobacterium breve* to grow on different types of milk: exploring the metabolism of milk through genome analysis. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77 (20): 7408-7417.

63. Veková E, Medková J, Rada V. Comparison of four methods for identification of bifidobacteria to the genus level. *Czech J Food Sci* 2002; 20 (5): 171-174.
64. West PA, Hewitt JH, Murphy OM. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol* 1979; 46 (2): 269-277.
65. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983; 72 (3): 317-321.

## **Thesen zur Dissertation**

I. Die mikrobiologische Besiedlung des Magen-Darm-Trakts Neugeborener unter und nach der Geburt ist initial hauptsächlich vom Geburtsmodus und der Umwelt abhängig. Im weiteren Verlauf spielt die Art der Ernährung eine entscheidende Rolle.

II. Bei der Ernährung mit Frauenmilch bildet sich im Darm der gestillten Säuglinge in den ersten zwei Lebenswochen eine dominierende Flora aus, die sich zu über 95% aus Bifidobakterien zusammensetzt.

III. Im Laufe der letzten Jahre wurden, parallel zu den Untersuchungen der hier vorliegenden Studie, die ersten Arbeiten veröffentlicht, die Bifidobakterien und bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilch nachweisen konnten.

IV. Es konnte gezeigt werden, dass die Frauenmilch selbst die Quelle für Laktobazillen und Bifidobakterien darstellt, die den kindlichen Magen-Darm-Trakt postnatal besiedeln.

V. Mit der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, dass eine Kultivierung von Bifidobakterien aus Frauenmilch auf Kultur-Agarplatten schwierig und nicht immer erfolgreich ist.

VI. Kulturunabhängige Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion mit dem Einsatz der Primer g-Bifid-F und g-Bifid R sind geeignet, um bifidobakterienspezifische DNA in Frauenmilchproben nachzuweisen.

VII. Bifidobakterienspezifische DNA lässt sich bereits in der frühen Laktationsperiode nachweisen.

VIII. Die Annahme, dass mit zunehmendem Abstand zur Entbindung der Anteil von bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilch zunimmt, konnte nicht belegt werden.

IX. Eine Reinigung der Brustwarze und des Warzenvorhofes mit sterilem Aqua vor der Abnahme der Frauenmilch hat nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA.

X. In internationalen Studien und Veröffentlichungen der letzten 4 – 5 Jahre wurde bifidobakterienspezifische DNA aus Frauenmilchproben auf der Grundlage von anderen molekularbiologischen Methoden mit einer deutlich höheren Anzahl als in der vorliegenden Studie nachgewiesen.

XI. Die in der vorliegenden Studie getestete DNA-Isolationsmethode und die sich anschließende Polymerase-Kettenreaktion ist als molekularbiologische Methode zu wenig sensitiv für den Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA aus Frauenmilch.

XII. Unter dem Vorbehalt einer kleinen Stichprobe knüpfen die Nachweise von bifidobakterienspezifischer DNA in Frauenmilch an die Ergebnisse und Beobachtungen internationaler Studien an.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Hand-Brustpumpe von MEDela	Anhang
Abb. 2:	Reagenz- und Zentrifugenröhre von Sarstedt	Anhang
Abb. 3:	Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben 8, 11 und 12; Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ als Positivkontrolle(PK); Größenmarker(M)	Seite 31
Abb. 4:	Variation der Annealing-Temperatur bei Frauenmilchprobe 8; 53,3 °C (1), 54 °C (2), 56 °C (3), 58,6 °C (4), 61,4 °C (5), 62,9 °C (6); Größenmarker (M)	Seite 34
Abb. 5:	Variation der Annealing-Temperatur beim Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™; 53,3 °C (1), 54 °C (2), 56 °C (3), 58,6 °C (4), 61,4 °C (5), 62,9 °C (6); Größenmarker (M)	Seite 34
Abb. 6:	Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben 14 und 15; Portionen 14 - 1, 14 - 2 ohne Zusatz von Bifidobakterien (1, 2), Portionen 14 - 3, 14 - 4 und 14 - 5 Zusatz von Bifidobakterien (3, 4, 5); Portionen 15 - 1 und 15 - 2 ohne Zusatz von Bifidobakterien (6, 7), Portionen 15 - 3, 15 - 4, 15 - 5 Zusatz von Bifidobakterien (8, 9, 10) (siehe Tabelle 14); Größenmarker (M)	Seite 38
Abb. 7:	Zusatz von Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ in Kuhmilch; Nachweis von bifidobakterienspezifischer DNA in den Proben A-E (siehe Tabelle 15); Größenmarker (M)	Seite 40
Abb. 8:	Probandin III (1-6); Bande am Abnahmetermin 3 links (3) und rechts (6); Größenmarker (M)	Seite 45

- Abb. 9: Probandin VII (1-6); Bande am Abnahmetermin 3 rechts (6); Größenmarker (M) Seite 46
- Abb. 10: Probandin VIII (1-6); Bande am Abnahmetermin 1 rechts (4); Größenmarker (M) Seite 46
- Abb. 11: Probandin X (1-6); Bande am Abnahmetermin 2 links (2); Größenmarker (M) Seite 46
- Abb. 12: Probandin XI (1-6); Bande beim Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ (Positivkontrolle, PK); Negativkontrolle (NK); Größenmarker (M) Seite 46
- Abb. 13: Verdünnungsreihe des Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ von 21,85 Bakterien/ml (1) bis  $2,185 \times 10^9$  Bakterien/ml (9); Größenmarker (M) Seite 48
- Abb. 14: Testdurchlauf der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase und Puffer Nummer 4; Enhancer A (A), Enhancer B (B), bidestilliertes Wasser (C); Bifidobacterium infantis ATCC® 15702™ (1), Negativkontrolle (2), Probandin X 1 rechts (3), Probandin V 1 links (4); Bande beim Bifidobakterium (A1, B1, C1); Nachweis bei Probandin X 1 rechts (A3, B3, C3); Größenmarker (M) Seite 50



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenfassung der Abnahmetage Frauenmilchproben Vorstudie	Seite 10
Tab. 2:	Auflistung der Abnahmetage Frauenmilchproben Vorstudie	Anhang
Tab. 3:	Überblick Frauenmilchproben Vorstudie	Anhang
Tab. 4:	Zusammenfassung der Abnahmetage Frauenmilchproben Hauptstudie	Seite 13
Tab. 5:	Auflistung der Abnahmetage Frauenmilchproben Hauptstudie	Anhang
Tab. 6:	Auflistung der Abnahmetage (postpartal) Frauenmilchproben Hauptstudie	Anhang
Tab. 7:	Nummerierung der Frauenmilchproben Hauptstudie	Anhang
Tab. 8:	Übersicht der verwendeten Kultur-Agarplatten	Seite 15
Tab. 9:	Übersicht der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen	Anhang
Tab. 10:	Zusatz von <i>Bifidobacterium infantis</i> zu Frauenmilchproben	Anhang
Tab. 11:	Ligationsansatz	Seite 25
Tab. 12:	Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben der Vorstudie mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R	Seite 30

Tab. 13:	Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA durch die PCR mit den Bifidobakterien-Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen	Seite 35
Tab. 14:	Übersicht des Nachweises des zu verschiedenen Zeitpunkten zugesetzten <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC® 15702™ in Frauenmilchproben	Seite 37
Tab. 15:	Zusammenfassung der Verarbeitungsschritte der Kuhmilchproben	Seite 39
Tab. 16:	Übersicht der identifizierten Sequenzen aus den PCR-Produkten der Frauenmilchproben 8, 11 und 12 und des <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC® 15702™	Seite 41
Tab. 17:	DNA-Konzentration der Frauenmilchproben der Hauptstudie in ng/μl	Seite 43
Tab. 18:	Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in den Frauenmilchproben der Hauptstudie mit den Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R	Seite 44
Tab. 19:	Übersicht der herangezogenen Studien für die statistische Analyse	Seite 47
Tab. 20:	Übersicht des Nachweises von bifidobakterienspezifischer DNA in der PCR mit der omnitaq-OLS®-DNA-Polymerase	Seite 49

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	Amerikanische Kulturen-Stammsammlung (engl.: American Type Culture Collection)
Bif.	Bifidobacterium
bzw.	beziehungsweise
Cb	Carbenicillin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	lat.: et alii
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
HCL	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	engl.: lysogeny broth
M	molare Konzentration in mol/l
mM	Millimolar
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomolar
rpm	Umdrehungen pro Minuten
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfat)
sp.	engl.: species
subsp.	engl.: subspecies

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	Thermus Aquaticus
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranosid

## Anhang



**Abbildung 1:**  
Hand-Brustpumpe von MEDela, Deutschland

(Zugriff am 21.08.2012 unter <http://www.die-milchpumpe.de/handbrustpumpe.php>)



**Abbildung 2:**  
Reagenz- und Zentrifugenröhre von Sarstedt, Deutschland

(Zugriff am 21.08.2012 unter [http://www.sarstedt.com/katalog/de/pubData/source/SARSTEDT\\_Katalog\\_Jubilaem.pdf](http://www.sarstedt.com/katalog/de/pubData/source/SARSTEDT_Katalog_Jubilaem.pdf))

**Tabelle 2:**

Auflistung der Abnahmetage Frauenmilchproben Vorstudie

Probandin	Entbindungstag	Probenabnahme	Tag postpartal
1	22.11.2006	13.12.2006	21. Tag
2	20.01.2007	24.01.2007	4. Tag
3	19.01.2007	24.01.2007	5. Tag
4	17.02.2007	20.02.2007	3. Tag
5	15.02.2007	20.02.2007	5. Tag
6	07.02.2007	20.02.2007	13. Tag
7	27.01.2007	20.02.2007	24. Tag
8	02.03.2007	06.03.2007	4. Tag
9	27.02.2007	06.03.2007	7. Tag
10	08.03.2007	13.03.2007	5. Tag
11	24.03.2007	28.03.2007	4. Tag
12	24.03.2007	28.03.2007	4. Tag
13	23.03.2007	28.03.2007	5. Tag
14	10.01.2007	11.04.2007	91. Tag
15	10.03.2007	11.04.2007	32. Tag
16	28.06.2007	04.07.2007	6. Tag
17	28.06.2007	04.07.2007	6. Tag
18	28.06.2007	04.07.2007	6. Tag
19	05.07.2007	11.07.2007	6. Tag
20	07.07.2007	11.07.2007	4. Tag
21	07.07.2007	11.07.2007	4. Tag
22	05.08.2007	08.08.2007	3. Tag
23	04.08.2007	08.08.2007	4. Tag
24	01.08.2007	08.08.2007	7. Tag

**Tabelle 3:**

Überblick Frauenmilchproben Vorstudie

Probe	Entnahmetag	Portion	Transport	Kultur	Keimzahl/ml	Verarbeitung	Extraktion
1	21.	10 ml	K	1	$3,6 \times 10^3$	Entnahmetag	P/C
2	4.	10 ml	MP, K	1	$1,6 \times 10^5$	Lagerung	P/C
3	5.	10 ml	MP, K	1	-	Lagerung	P/C
4	3.	7 ml	MP, K	2	$1,8 \times 10^5$	Lagerung	P/C
5	5.	10 ml	MP, K	2	$2 \times 10^4$	Lagerung	P/C
6	13.	10 ml	MP, K	2	$3 \times 10^5$	Lagerung	P/C
7	24.	10 ml	MP, K	2	$1,6 \times 10^4$	Lagerung	P/C
		10 ml	MP, K	-	-	Lagerung	Kit
8	4.	10 ml	MP, K, A	2	$7,5 \times 10^5$	Lagerung	P/C
		4 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
9	7.	10 ml	MP, K, A	2	$6,5 \times 10^5$	Lagerung	P/C
		3 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
10	5.	8 ml	MP, K, A	2	$4,2 \times 10^4$	Lagerung	P/C
11	4.	4 ml	MP, K	2	$2,7 \times 10^4$	Lagerung	Kit
12	4.	13 ml	MP, K	2	$4,5 \times 10^4$	Lagerung	Kit
13	5.	5 ml	MP, K	2	$6,5 \times 10^3$	Lagerung	Kit

14	91.	7,5 ml	MP, K, A	2	$2 \times 10^3$	Entnahmetag	P/C
		7,5 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	P/C
		7,5 ml	MP, K, A	-	-	Entnahmetag	Kit
15	32.	5 ml	MP, K, A	2	$1,7 \times 10^4$	Entnahmetag	P/C
		5 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	P/C
		5 ml	MP, K, A	-	-	Entnahmetag	Kit
16	6.	15 ml	MP, A	-	-	Entnahmetag	Kit
17	6.	10 ml	MP, A	-	-	Entnahmetag	Kit
		2 ml	MP, A	-	-	Lagerung	Kit
18	6.	15 ml	MP, A	-	-	Entnahmetag	Kit
		2 ml	MP, A	-	-	Lagerung	Kit
19	6.	1 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
		3 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
20	4.	1 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
		3 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
21	4.	1 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
		3 ml	MP, K, A	-	-	Lagerung	Kit
22	3.	1 ml	MP, K, A, D	3	$1,6 \times 10^4$	Entnahmetag	Kit
		3 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit
		5 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit
23	4.	1 ml	MP, K, A, D	3	$1,4 \times 10^5$	Entnahmetag	Kit
		3 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit
		5 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit
24	7.	1 ml	MP, K, A, D	3	$5,6 \times 10^3$	Entnahmetag	Kit
		3 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit
		5 ml	MP, K, A, D	-	-	Entnahmetag	Kit

Legende

Probe:	Frauenmilchprobe, laufende Nummerierung
Entnahmetag:	Tag der Abnahme postpartal
Portion:	eingesetzte Milchmenge in ml, gegebenenfalls mehrere Portionen
Transport:	Bedingungen während des Transportes ins Labor MP - Abnahme erfolgte mit Milchpumpe; K - gekühlter Transport; A - Transport unter anaeroben Bedingungen mittels eines chemischen Anaerobiersystems (AnaeroGen™ Oxoid, GB) im Anaerobengefäß; D - abgedunkelter Transport
Kultur:	kulturelle Analyse mit Kultur – Agarplatten 1 - Columbia Blutagar, BSM und Rogosa 2 - Columbia Blutagar, BSM und MRS 3 - Columbia Blutagar, MRS und Rogosa
Keimzahl:	ermittelte Gesamtkeimzahl mittels Columbia Blutagar
Verarbeitung:	molekularbiologische Weiterverarbeitung Entnahmetag - Weiterverarbeitung am Entnahmetag innerhalb von 2 Stunden Lagerung - Weiterverarbeitung nach der Lagerung bei -20 °C für einige Tage
Extraktion:	DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (P/C) oder FastDNA® SPIN Kit (Kit)

**Tabelle 5:**

Auflistung der Abnahmetage Frauenmilchproben Hauptstudie

Probandin	Entbindungstag	1. Abnahmetag 0. - 4. Tag	2. Abnahmetag 8. - 12. Tag	3. Abnahmetag 16. - 20 Tag
I	09.10.2007	12.10.2007	21.10.2007	26.10.2007
II	14.10.2007	18.10.2007	26.10.2007	02.11.2007
III	18.10.2007	20.10.2007	29.10.2007	06.11.2007
IV	18.10.2007	21.10.2007	29.10.2007	06.11.2007
V	21.10.2007	24.10.2007	30.10.2007	08.11.2007
VI	23.10.2007	26.10.2007	01.11.2007	09.11.2007
VII	24.10.2007	27.10.2007	02.11.2007	10.11.2007
VIII	24.10.2007	27.10.2007	03.11.2007	10.11.2007
IX	24.10.2007	28.10.2007	03.11.2007	10.11.2007
X	25.10.2007	28.10.2007	04.11.2007	12.11.2007
XI	25.10.2007	28.10.2007	06.11.2007	12.11.2007

**Tabelle 6:**

Auflistung der Abnahmetage (postpartal) Frauenmilchproben Hauptstudie

Probandin	1. Probenentnahme	2. Probenentnahme	3. Probenentnahme
I	3. Tag	12. Tag	17. Tag
II	4. Tag	12. Tag	19. Tag
III	2. Tag	11. Tag	19. Tag
IV	3. Tag	11. Tag	19. Tag
V	3. Tag	9. Tag	18. Tag
VI	3. Tag	9. Tag	17. Tag
VII	3. Tag	9. Tag	17. Tag
VIII	3. Tag	10. Tag	17. Tag
IX	4. Tag	10. Tag	17. Tag
X	3. Tag	10. Tag	18. Tag
XI	3. Tag	12. Tag	18. Tag



**Tabelle 7:**

Nummerierung der Frauenmilchproben Hauptstudie

Legende:

1. - 68.	laufende Nummerierung der Proben inklusive Positivkontrollen
I - IX	Probandinnen
1, 2, 3	Abnahmetermine 1, 2, 3
links	linke Brust
rechts	rechte Brust

1. I 1 links	7. II 1 links	13. III 1 links
2. I 2 links	8. II 2 links	14. III 2 links
3. I 3 links	9. II 3 links	15. III 3 links
4. I 1 rechts	10. II 1 rechts	16. III 1 rechts
5. I 2 rechts	11. II 2 rechts	17. III 2 rechts
6. I 3 rechts	12. II 3 rechts	18. III 3 rechts
19. IV 1 links	25. V 1 links	31. VI 1 links
20. IV 2 links	26. V 2 links	32. VI 2 links
21. IV 3 links	27. V 3 links	33. VI 3 links
22. IV 1 rechts	28. V 1 rechts	34. VI 1 rechts
23. IV 2 rechts	29. V 2 rechts	35. VI 2 rechts
24. IV 3 rechts	30. V 3 rechts	36. VI 3 rechts
37. VII 1 links	43. VIII 1 links	49. IX 1 links
38. VII 2 links	44. VIII 2 links	50. IX 2 links
39. VII 3 links	45. VIII 3 links	51. IX 3 links
40. VII 1 rechts	46. VIII 1 rechts	52. IX 1 rechts
41. VII 2 rechts	47. VIII 2 rechts	53. IX 2 rechts
42. VII 3 rechts	48. VIII 3 rechts	54. IX 3 rechts
55. X 1 links	61. XI 1 links	67. Bif. infantis
56. X 2 links	62. XI 2 links	68. Bif. infantis
57. X 3 links	63. XI 3 links	
58. X 1 rechts	64. XI 1 rechts	
59. X 2 rechts	65. XI 2 rechts	
60. X 3 rechts	66. XI 3 rechts	

**Tabelle 9:**

Übersicht der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen

Probennummer	Portion	I.	II.	III.
1	10 ml	-	0	0
2	10 ml	-	0	0
3	10 ml	-	0	0
4	7 ml	-	0	0
5	10 ml	-	0	0
6	10 ml	-	0	0
7	10 ml	-	0	0
	10 ml	-	0	0
8	10 ml	-	0	0
	4 ml	+	+	-
9	10 ml	-	0	0
	3 ml	-	0	0
10	8 ml	-	0	0
11	4 ml	+	+	-
12	13 ml	+	+	-
13	5 ml	-	0	0
14	7,5 ml	-	0	0
	7,5 ml	-	0	0
	7,5 ml	-	0	0
15	5 ml	+	0	0
	5 ml	+	0	0
	5 ml	+	0	0
16	15 ml	-	-	-
17	10 ml	-	0	0
	2 ml	-	+	-
18	15 ml	-	0	0
	2 ml	-	+	-
19	1 ml	-	+	-
	3 ml	-	+	-
20	1 ml	-	+	-
	3 ml	-	+	-
21	1 ml	-	+	-
	3 ml	-	+	-
22	1 ml	-	-	-
	3 ml	-	-	-
	5 ml	-	0	0
23	1 ml	-	-	-
	3 ml	-	-	-
	5 ml	-	0	0
24	1 ml	-	-	-
	3 ml	-	-	-
	5 ml	-	0	0

**Legende:**

I.: PCR mit Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R; Annealing-Temperatur von 55 °C

II.: PCR mit Primern g-Bifid-F und g-Bifid-R; Annealing-Temperatur von 58 °C

III.: PCR mit Primern Bif 164-mod-f und Bif 662-GC-r; Annealing-Temperatur 55 °C

+ Nachweis gelungen

- kein Nachweis gelungen

0 PCR nicht durchgeführt

**Tabelle 10:****Zusatz von Bifidobacterium infantis zu Frauenmilchproben**

Probe	Portion	Bifidobakt.	Transport	Kultur	Verarbeitung	Extraktion
1	10 ml	I	K	1	Entnahmetag	P/C
	10 ml	III	K	-	Entnahmetag	P/C
3	10 ml	I	MP, K	1	Lagerung	P/C
	10 ml	IV	MP, K	-	Lagerung	P/C
10	8 ml	I	MP, K, A	2	Lagerung	P/C
	8 ml	II	MP, K, A	2	Lagerung	P/C
14	7,5 ml	I	MP, K, A	2	Entnahmetag	P/C
	7,5 ml	I	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	7,5 ml	II	MP, K, A	2	Entnahmetag	P/C
	7,5 ml	II	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	7,5 ml	III	MP, K, A	-	Entnahmetag	P/C
	7,5 ml	III	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	7,5 ml	I	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit
	7,5 ml	II	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit
	7,5 ml	II	MP, K, A	-	Lagerung	Kit
	7,5 ml	III	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit
15	5 ml	I	MP, K, A	2	Entnahmetag	P/C
	5 ml	I	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	5 ml	II	MP, K, A	2	Entnahmetag	P/C
	5 ml	II	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	5 ml	III	MP, K, A	-	Entnahmetag	P/C
	5 ml	III	MP, K, A	-	Lagerung	P/C
	5 ml	I	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit
	5 ml	II	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit
	5 ml	II	MP, K, A	-	Lagerung	Kit
	5 ml	III	MP, K, A	-	Entnahmetag	Kit

**Legende**

Probe:	Frauenmilchprobe, laufende Nummerierung
Portion:	eingesetzte Milchmenge in ml, gegebenenfalls mehrere Portionen
Bifidobakt.:	Zusatz von Bifidobacterium infantis ATCC·15702™ I - keine Zugabe von Bifidobakterien erfolgt II - Zugabe von Bifidobakterien nach der Probengewinnung vor dem Transport III - Zugabe von Bifidobakterien nach dem Transport vor der Weiterverarbeitung IV - Zugabe von Bifidobakterien nach der Lagerung vor der DNA-Extraktion
Transport:	Bedingungen während des Transportes ins Labor MP - Abnahme erfolgte mit Milchpumpe; K - gekühlter Transport; A - Transport unter anaeroben Bedingungen mittels eines chemischen Anaerobiersystems (AnaeroGen™ Oxoid, GB) im Anaerobengefäß
Kultur:	kulturelle Analyse mit Kultur – Agarplatten 1 - Columbia Blutagar, BSM und Rogosa; 2 - Columbia Blutagar, BSM und MRS
Verarbeitung:	molekularbiologische Weiterverarbeitung Entnahmetag - Weiterverarbeitung am Entnahmetag innerhalb von 2 Stunden Lagerung - Weiterverarbeitung nach der Lagerung bei -20 °C für einige Tage
Extraktion:	DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (P/C) oder FastDNA® SPIN Kit (Kit)

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel nicht verwendet habe.

Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Potsdam, im Oktober 2012

Manuela Görsdorf