

**THE 4th JOINT COORDINATING COMMITTEE MEETING ,
SATREPS TB & Glanders Project**

**Development of isothermal
amplification and dipstick-based
genetic diagnostics for
mycobacteriosis in animals and
humans**

Yasuhiko Suzuki, Ph.D.

**Hokkaido University Distinguished Professor,
Division of Bioresources, International Institute for Zoonosis Control
Division of Research Support, Institute for Vaccine Research and Development
Department of Advanced Pharmaceutics, Faculty of Veterinary Medicine
Hokkaido University, Japan**

Discovery of Tubercle Bacilli



Dr. Robert Koch

Die Berliner Klinische Wochenschrift erscheint jeden Montag in der Woche von morgens 7 Uhr bis 6 Uhr. Sonntags und Feiertagen werden alle Erscheinungen der Redaktion ausgesetzt.

BERLINER

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT.

Organ für praktische Aerzte.

Mit Berücksichtigung der preussischen Medicinalverwaltung und Medicinalgesetzgebung nach amtlichen Mittheilungen.

Redacteur: Professor Dr. C. A. Siedl.

Verlag von August Hirschwald in Berlin.

Montag, den 10. April 1882.

Nr. 15.

Neunzehnter Jahrgang.

Inhalt: I. Koch: Die Aetiologie der Tuberculose. — II. Willrich: Ueber einen Fall von Wundstichvergiftung. — III. Küster: Ueber atrophische Tuberculose (Chiloid). — IV. Verhandlungen des Berliner medicinischen Vereins. — V. Fiedler: (Klinische Mittheilungen der Pharmakogenetik). — VI. Tagesgeschichtliche Mittheilungen. — VII. Amberg: Medicinische Mittheilungen. — VIII.

I. Die Aetiologie der Tuberculose.

Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März er. gehaltenen Vortrage.)

von

Dr. Robert Koch.

Regierungsrath im Kaiserlichen Gesundheitsamt.

Die von Villermé gemachte Entdeckung, dass die Tuberculose auf Thiere übertragbar ist, hat bekanntlich vielfache Bemerkungen über auch menschliche anthracinöse Miliarien hervorgerufen.

und die zum Zwecke der Isolirung und Züchtung der Tubercle-Viren angestellten Versuche konnten bis jetzt nicht als gelungen angesehen werden, so dass Cobain in der neuen erschienenen zweiten Auflage seiner Vorlesungen über allgemeine Pathologie „den directen Nachweis des tuberculinösen Virus als ein bis heute noch ungeklärtes Problem“ bezeichnete.

Bei meinen Untersuchungen über die Tuberculose habe ich mich seitens auch der bekannten Methoden bedient, ohne damit eine Auffassung über den Wesen der Krankheit zu erlangen.

Die Aetiologie der Tuberculosis

versucht von Tappinier und Andrieu die Übertragbarkeit der Tuberculose gegen jedes Zweifeln sicher gestellt und es muss ihr in Zukunft ein Platz unter den Infektionskrankheiten angewiesen werden.

Wenn die Zahl der Opfer, welche eine Krankheit fordert, als Maassstab für ihre Bedeutung zu gelten hat, dann müssen alle Krankheiten, namentlich aber die gefährlichsten Infektionskrankheiten, Pest, Cholera u. s. w., weit hinter der Tuberculose zurückstehen. Die Statistik lehrt, dass 1/10 aller Menschen an

Verstirrungen gestorben sind, die möglicherweise als Krankheitsursache gedeutet werden könnten. Dieser Nachweis gelang auch in der That durch ein bestimmtes Färbungsverfahren, mit Hilfe dessen in allen tuberculösen verdorbenen Organen charakteristische, bis dahin nicht bekannte Bacterien zu finden waren, wurde so weit führen, den Weg, auf welchem ich zu diesem neuen Verfahren gelangte, zu schildern und ich will deswegen nicht zur Beschreibung desselben übergehen.

Die Untersuchungsresultate werden in der bekannten, für

The Etiology of Tuberculosis

den menschlichen Tuberculose, von denen nur die Bedeutung der Tuberculose zur Fortschritt erwiesen werden sollen, das Interesse der Gesundheitspflege in Anspruch nehmen.

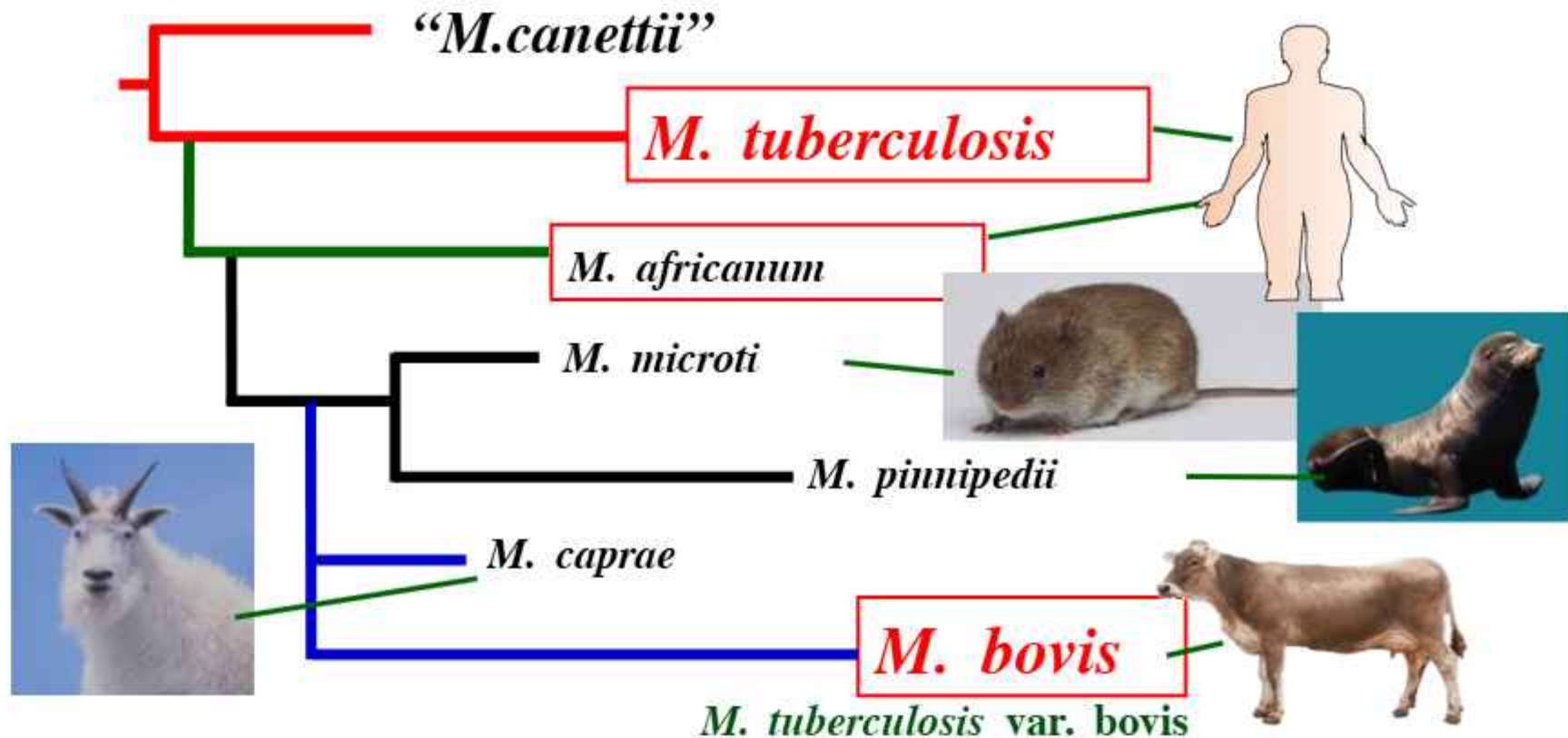
Es ist aus den Aufgaben der Gesundheitspflege gebürt, die Infektionskrankheiten vom Standpunkte der Gesundheitspflege aus, also in erster Linie in Bezug auf ihre Aetiologie, zum Gegenstand von Forschungsarbeiten zu machen, so erschien es als eine dringende Pflicht, vor Allem über die Tuberculose eingehende Untersuchungen anzustellen.

Die Wesen der Tuberculose zu ergründen, ist schon wiederholt versucht, aber bis jetzt ohne Erfolg. Die zum Nachweis der pathogenen Mikroorganismen so vielfach bewährten Färbemethoden haben dieser Krankheit gegenüber im Stich gelassen.

Wenn man sich, ohne vorhergehende ausschliessliche Reinigung des Objectes, versucht, ungehindert und erhalten dass unter wiederholtem Schütteln nach einem Zusatz von 0.2 Ccm. einer 10% Kalilauge. Diese Mischung darf selbst nach tagelangen Stehen keinen Niederschlag geben. Die zu färbenden Objecte bleiben in derselben 20 bis 24 Stunden. Durch Erwärmen der Färbung auf 40° C. im Wasserbade kann diese Zeit auf 1/2 bis 1 Stunde abgekürzt werden. Die Deckgläschen werden hierauf mit einer concentrirten wässrigen Lösung von Yessin, welche vor jedesmaligen Gebrauch zu Strichen zu übergossen und nach ein bis zwei Minuten mit destillirtem Wasser abgewaschen. Wenn die Deckgläschen aus dem Wässerschlamm kommen, sieht die ihnen anhaftende Schicht dunkelblau aus und ist stark

Mycobacterium tuberculosis complex

- Closely related species
 - House keeping genes: almost identical
- Causative agents of tuberculosis in mammals



World Organization of Animal Health Listed diseases

Multiple species diseases

Cattle diseases →

Sheep and goat diseases

Equine diseases

Swine diseases

Avian diseases

Lagomorph diseases

Bee diseases

Fish diseases

Mollusc diseases

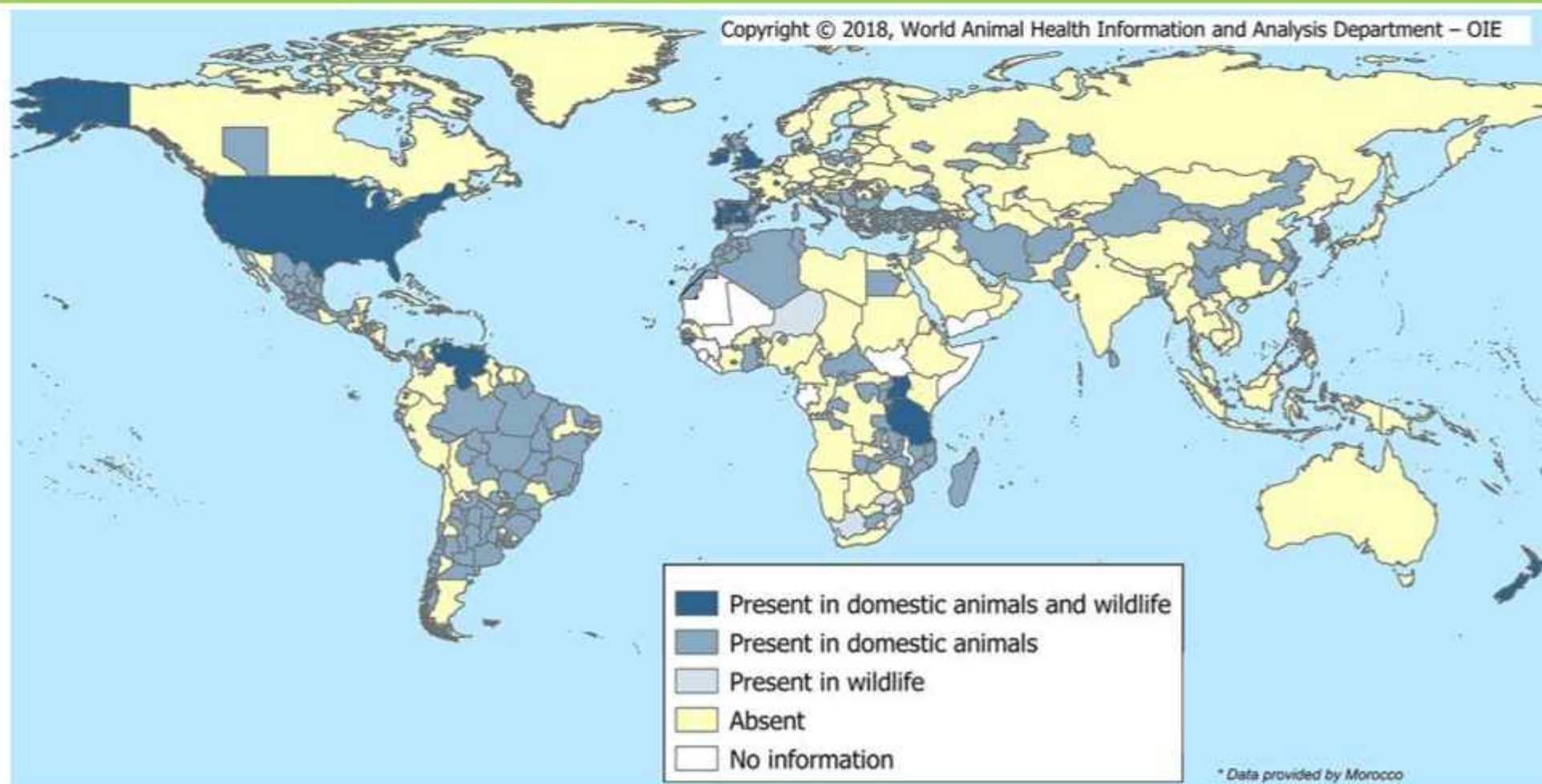
Crustacean diseases

Amphibians

Other diseases

- Bovine anaplasmosis
- Bovine babesiosis
- Bovine genital campylobacteriosis
- Bovine spongiform encephalopathy
- **Bovine tuberculosis**
- Bovine viral diarrhoea
- Contagious bovine pleuropneumonia
- Enzootic bovine leukosis
- Haemorrhagic septicaemia
- Infectious bovine
rhinotracheitis/infectious pustular vul
vovaginitis
- Lumpy skin disease
- Theileriosis
- Trichomonosis
- Trypanosomosis (tsetse-transmitted)

World wide spread of animal TB



Affected countries: **82**

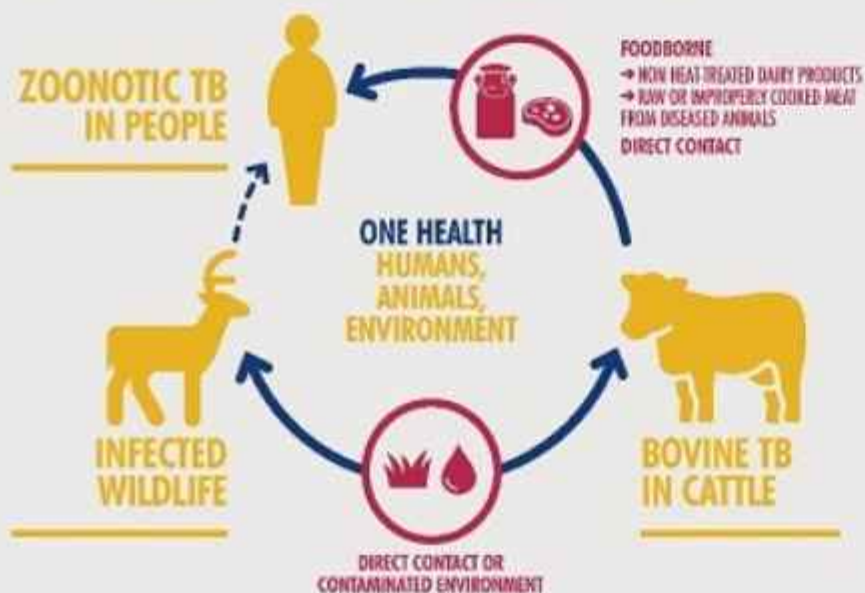
In livestock and wildlife: **29**

Only in livestock: **51**

Only in wildlife: **2**

Impacts of zoonotic TB

BREAKING THE CHAIN OF TRANSMISSION STOPPING ZOOONOTIC AND BOVINE TUBERCULOSIS IN THEIR TRACKS



ACT NOW TO SAVE LIVES AND SECURE LIVELIHOODS

ZOOONOTIC TUBERCULOSIS IS A MAJOR PUBLIC HEALTH THREAT

In 2019



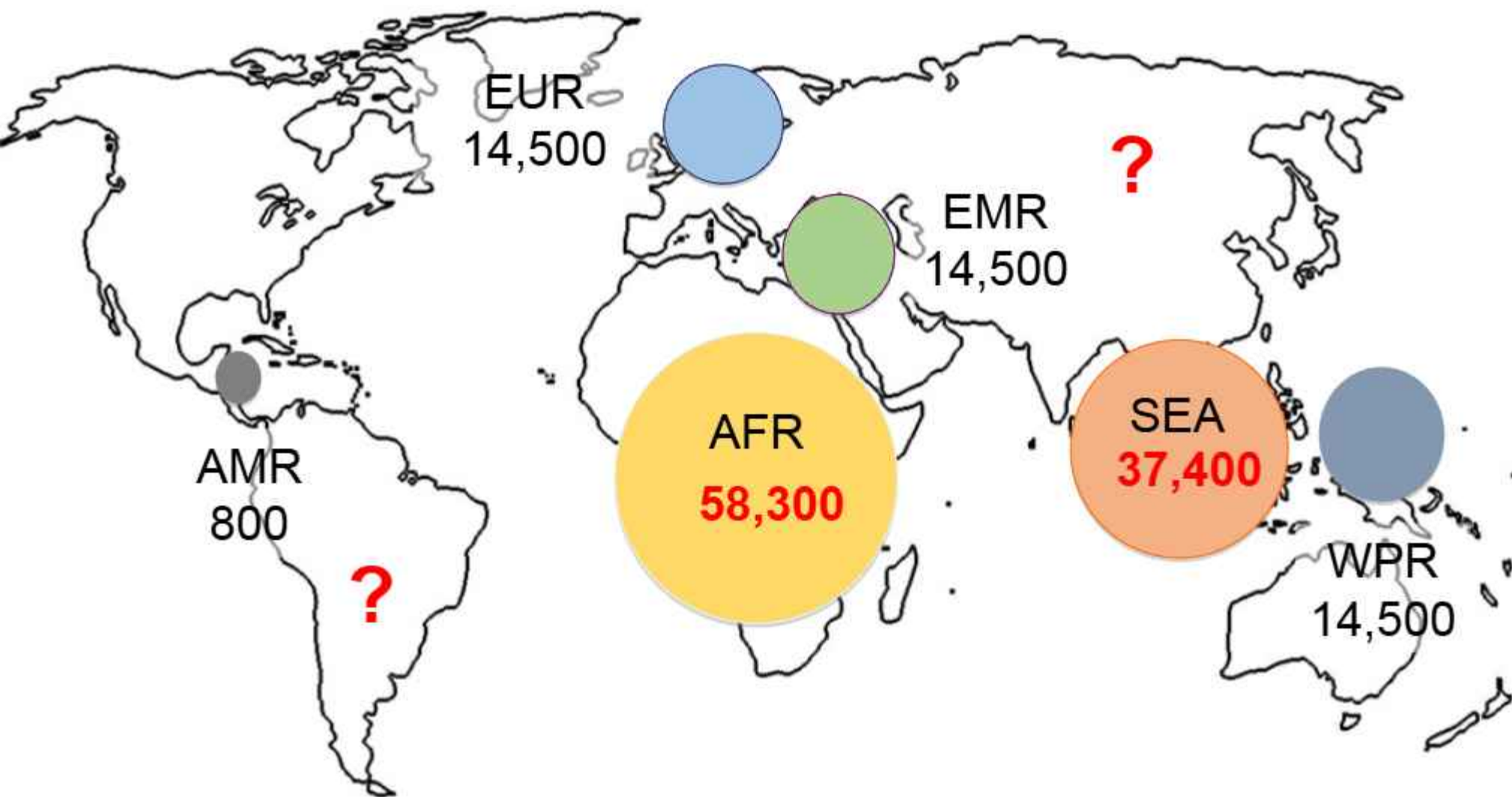
**POOR
HEALTH
AND
WELFARE**



**REDUCED
ECONOMIC
PRODUCTIVITY
OF LIVESTOCK**

ACT NOW TO SAVE LIVES AND SECURE LIVELIHOODS

Zoonotic *M. bovis* infection in human



Introduction

- Status of *M. bovis* infection in domestic animals and livestock is not clear
- Status of zoonotic tuberculosis is not clear
- Identification of *M. bovis* infection in humans is necessary for the proper treatment

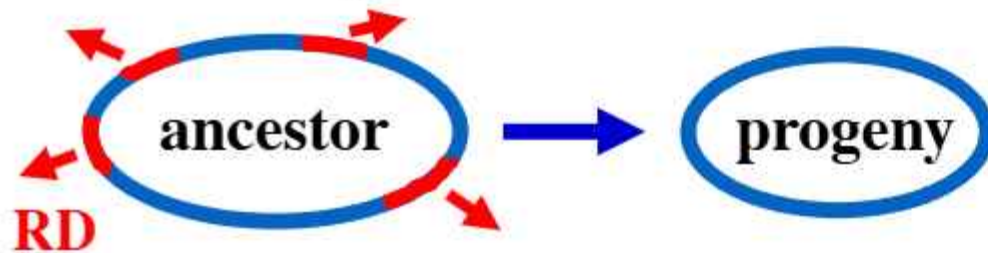
 **Rapid, simple, highly sensitive and low-cost methods for the differentiation of *M. bovis* and *M. tuberculosis* are crucial**

How to differentiate MTC members

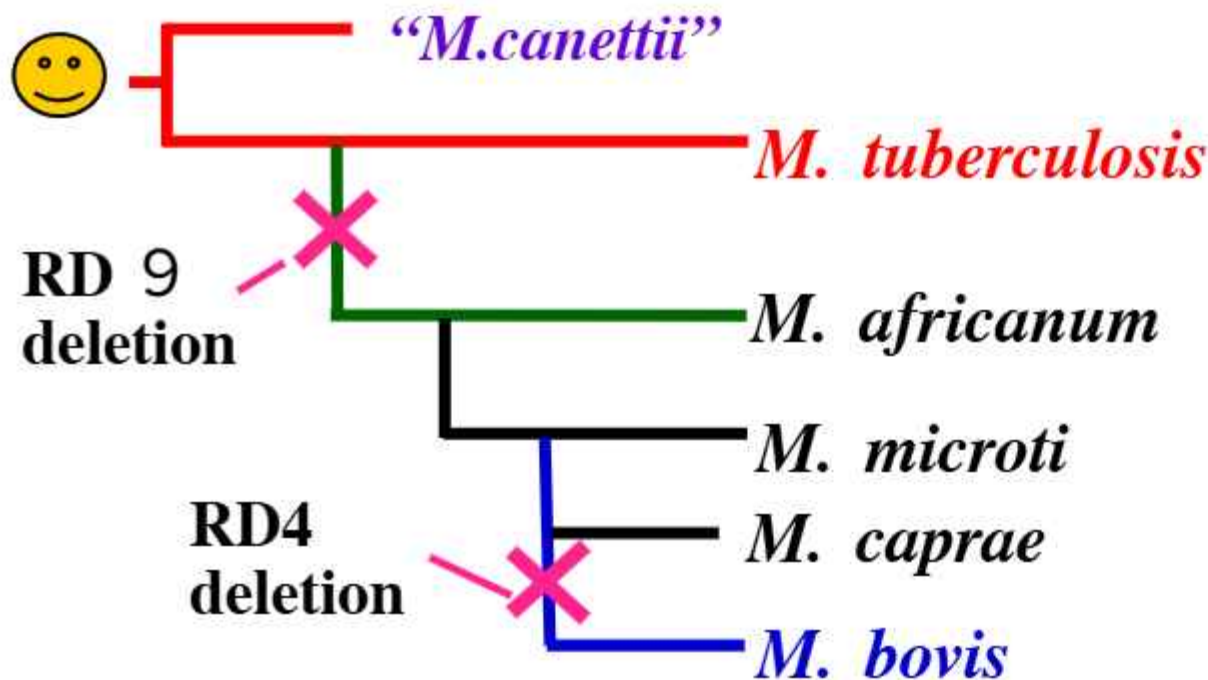
RD (Region of Difference)

No horizontal gene transfer between MTCs

→ Changes occurred in an ancestral cell fixed in progeny cells

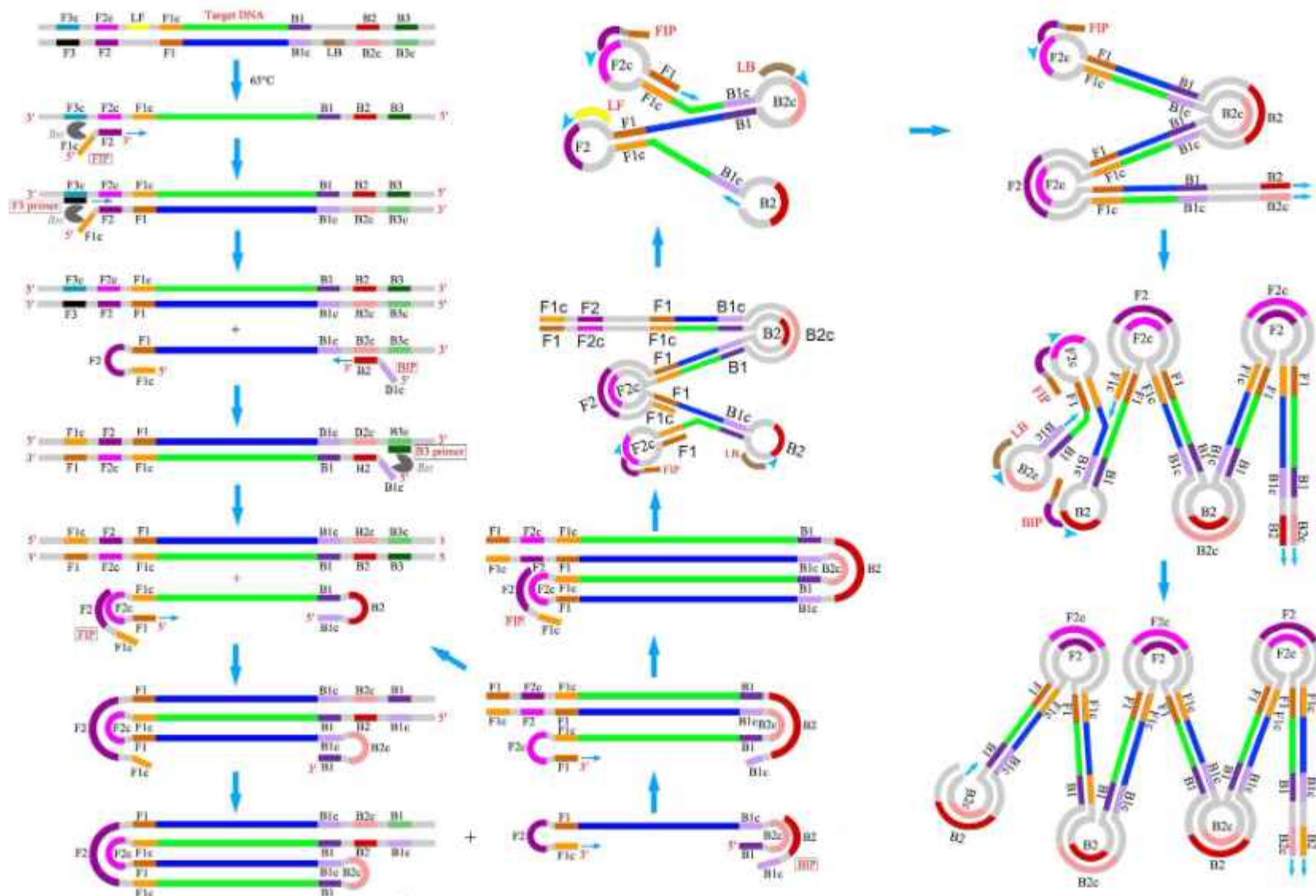


MTC phylogenetic tree and RDs



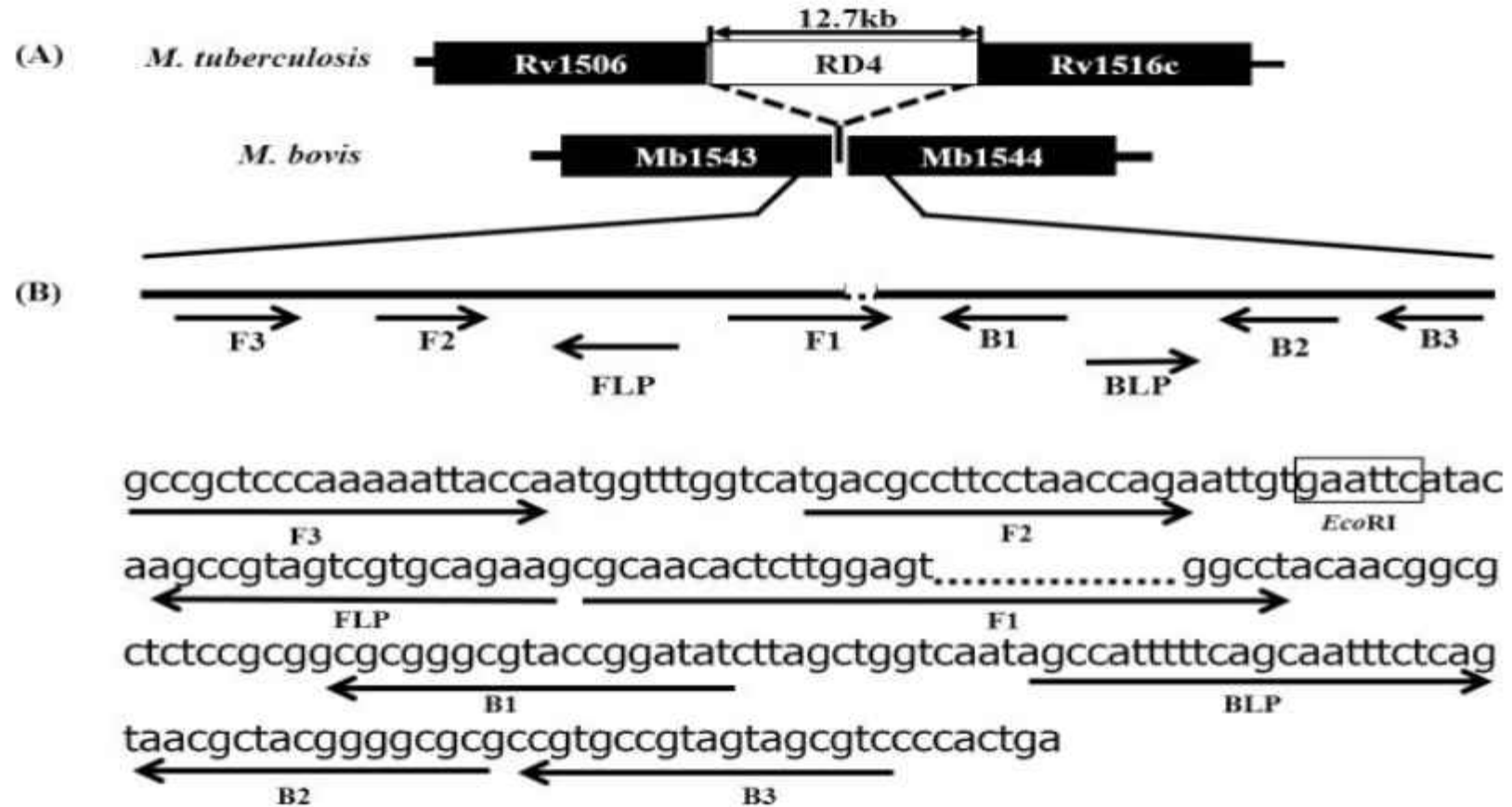
RD 9	RD4
+	+
—	+
—	+
—	—

Loop mediated isothermal amplification (LAMP)



Development of LAMP for *M. bovis*

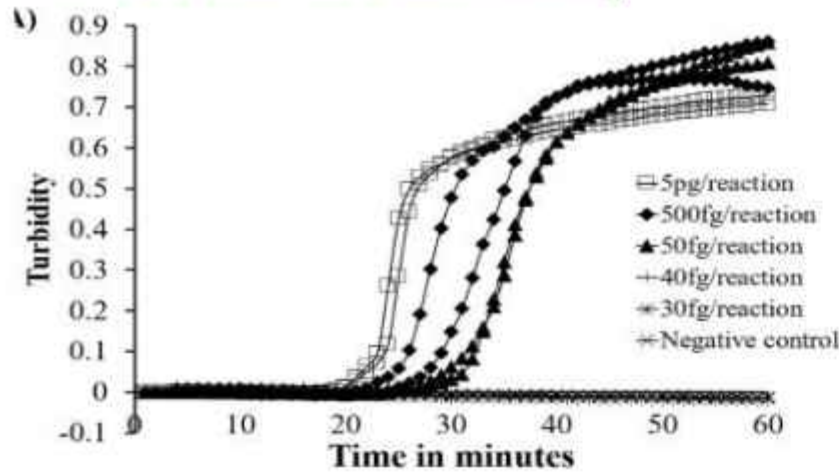
Primers used for LAMP



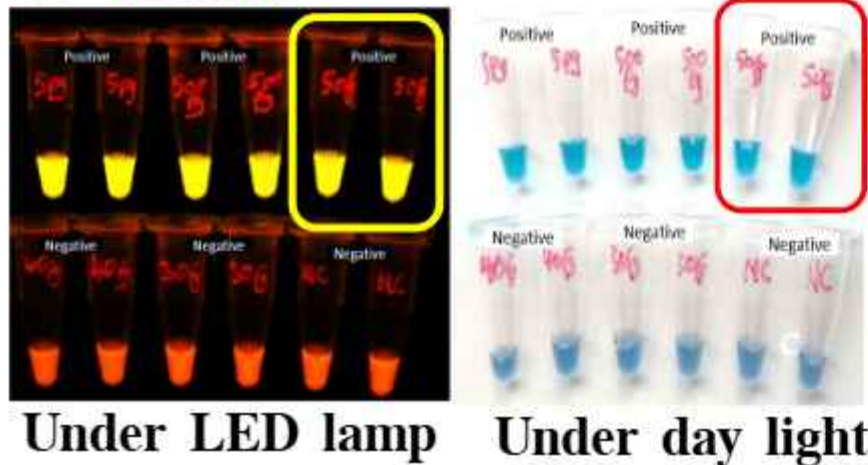
→ Primer sets were designed targeting Region of Difference 4 which is specifically deleted in *M. bovis*

Performance of LAMP for *M. bovis* detection

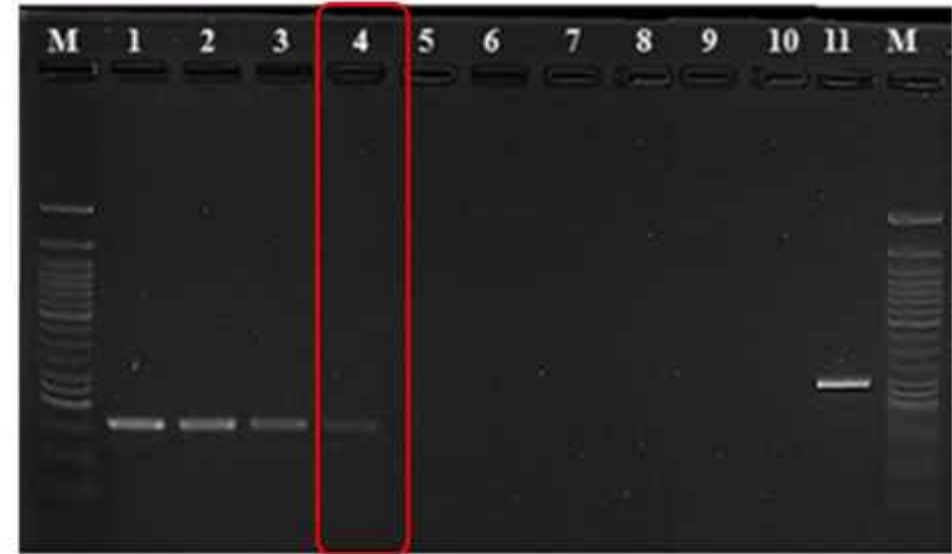
A. Trend of turbidity



B Results



C. PCR



Lane M, 50bp DNA marker; lanes 1 – 9, *M. bovis* BCG Tokyo 172 genomic DNA 500pg, 50pg, 20pg, 5pg, 500fg, 50fg, 40fg, 30fg, 20fg/reaction; lane 10, Negative Control; lane 11, *M. tuberculosis* H37Rv. (Bakshi et al., 2005)

→ This method can detect up to 50 fg of DNA (equivalent to 10 *M. bovis*), which is about 100 times more sensitive than the conventional method (PCR).

Development of dry LAMP kit for *M. bovis*

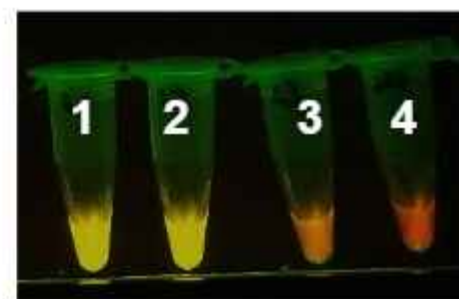
Hand made



Automated

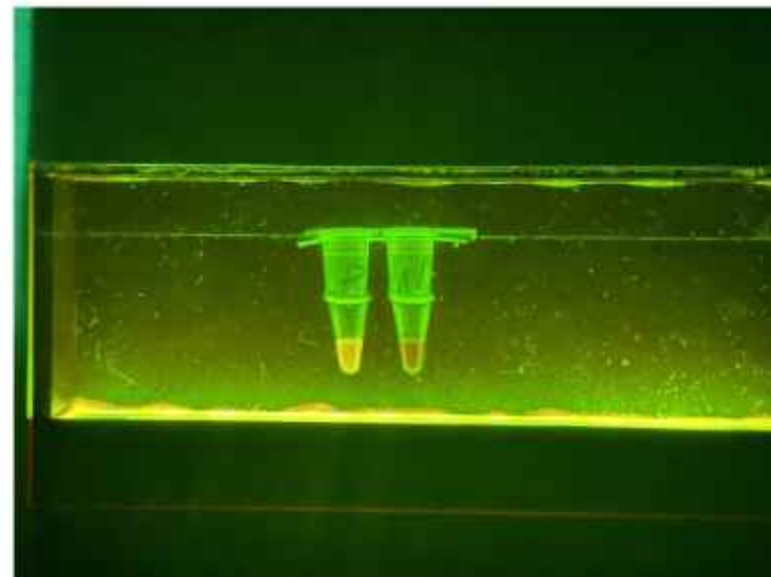


Technique for automated production of dried LAMP kit for *M. bovis* detection was transferred to two trainee from IVM at IIZC (Dec, 2023).



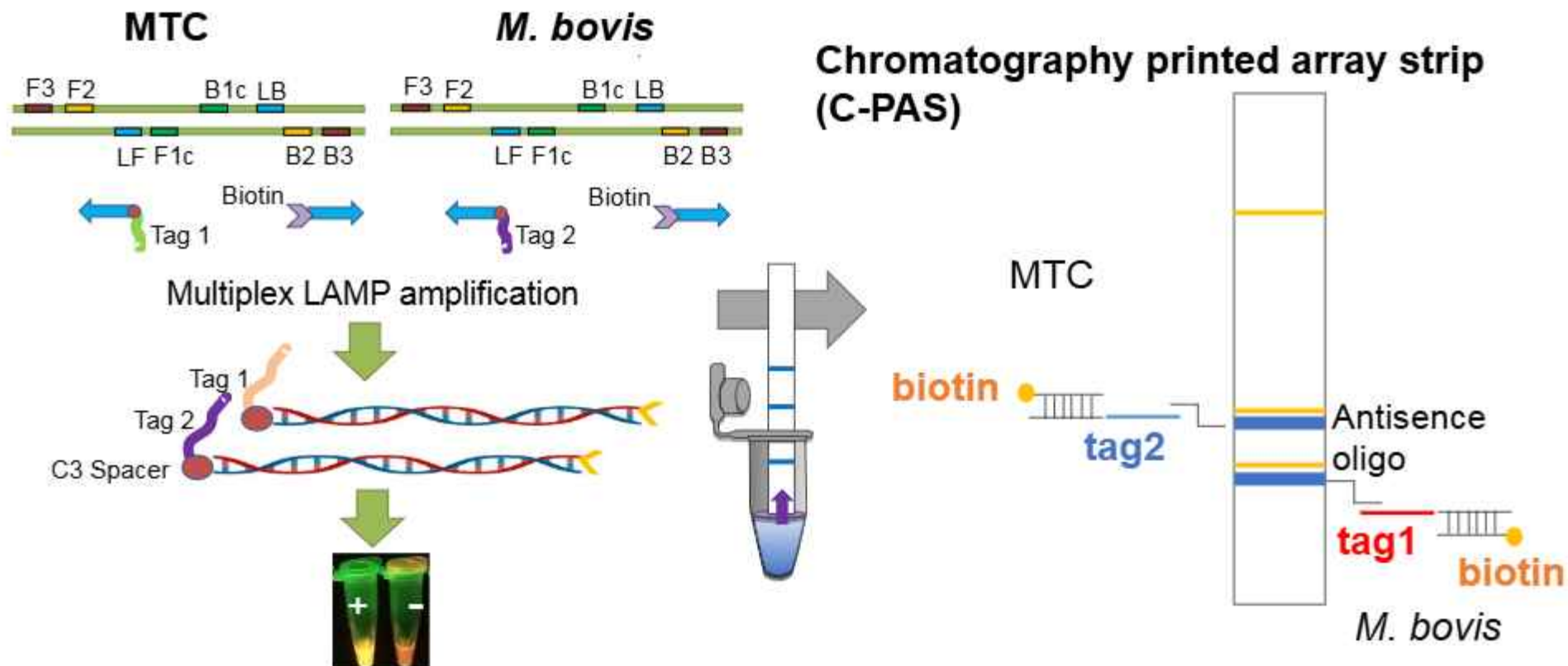
1, 2: Pos 、 3, 4: Neg

Training of *M. bovis* by dry LAMP kit



Training for the detection of *M. bovis* by dry LAMP method was held at IVM (August 8, 2023)

Development of a LAMP and dipstick-based method



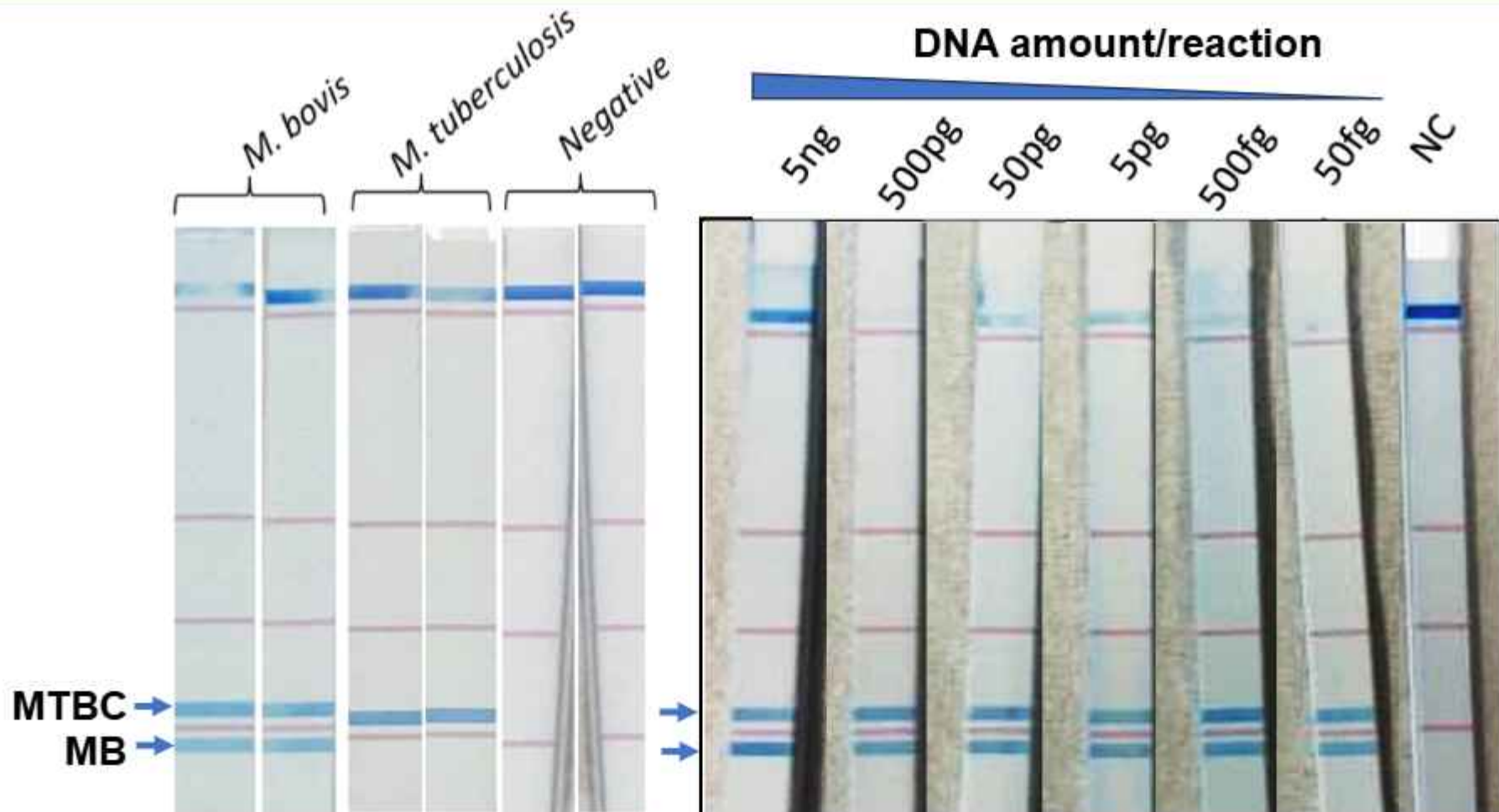
➤ Multiplex amplicons **indistinguishable by fluorescence**

➤ **Simultaneous identification** of multiplexed amplicons

➤ Simple with limited materials

→ **Method for the differentiation of *M. bovis* from other MTC by LAMP-DNA chromatography was designed.**

High sensitivity of LAMP and dipstick-based method



Dipstick method for *M. bovis* detection to detect 10 bacilli/reaction was successfully established and packed into contamination safe cassette.

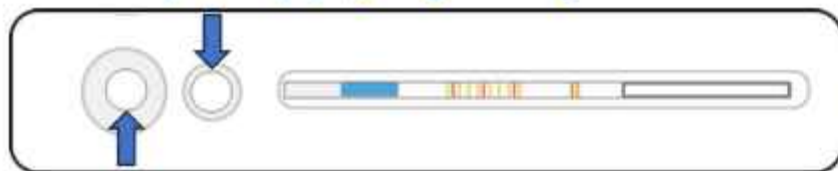
High sensitivity of LAMP and dipstick-based method



Step1: Preparing samples

Step2: Mixing samples with dry LAMP kit

Step3: Applying samples



developing solution



Step4: 65°C, 30-45 min for LAMP reaction

Step5: Results within 15 min

By squeezed the tank of developing solution, the LAMP reaction solution is spread over the nucleic acid chromatograph.



High sensitivity of LAMP and dipstick-based method



Step1: Preparing samples

Step2: Mixing samples with dry LAMP kit

Step3: Applying samples



developing solution



Step4: 65°C, 30-45 min for LAMP reaction

Step5: Results within 15 min

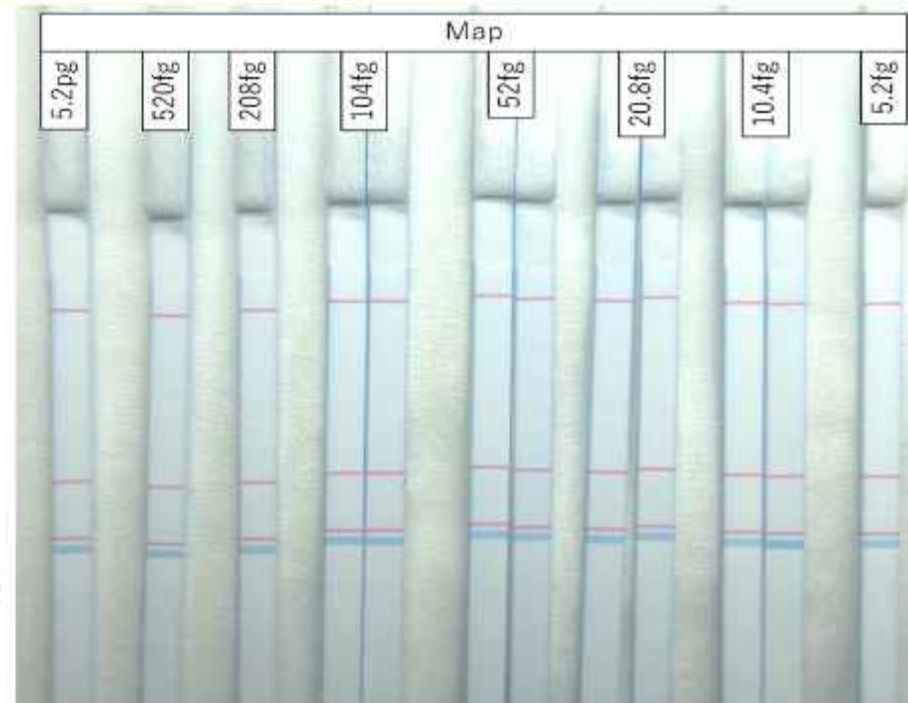
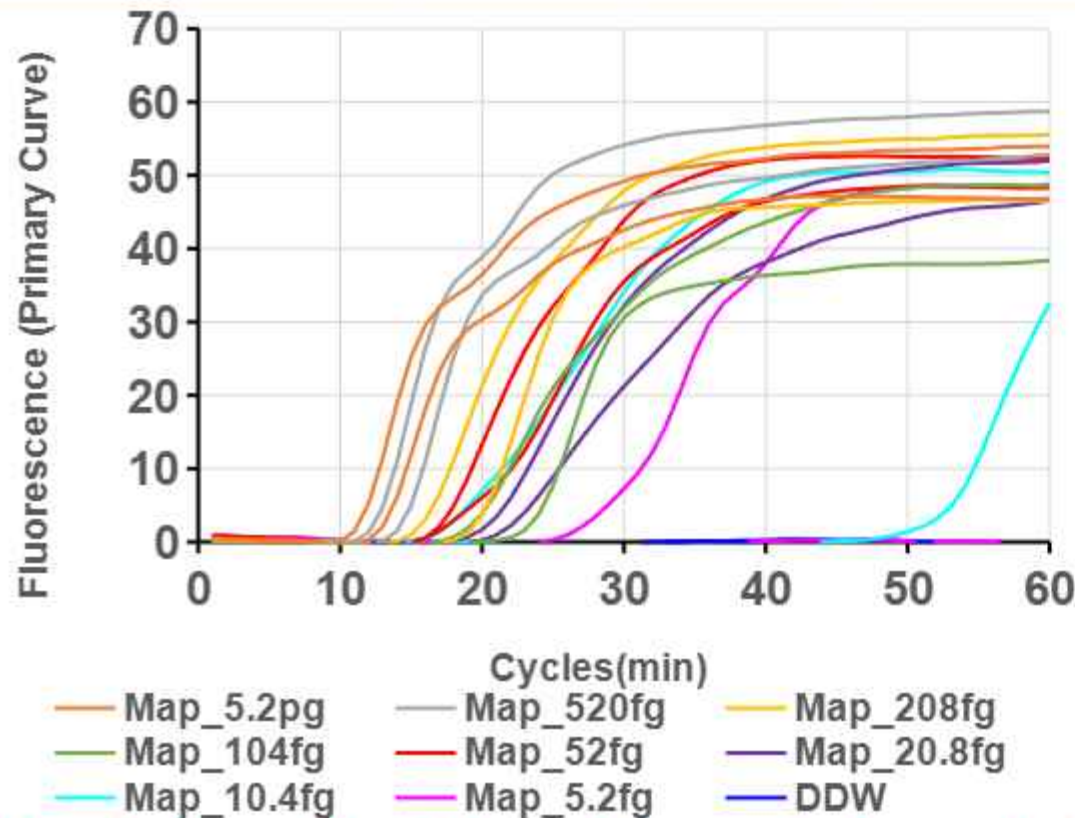
By squeezed the tank of developing solution, the LAMP reaction solution is spread over the nucleic acid chromatograph.



LAMP dipstick-based method for *M. paratuberculosis*

Target: IS900

5.2pg	520fg	208fg	104fg	52fg	20.8fg	10.4fg	5.2fg	DDW
13:23	12:42	19:54	19:49	18:19	22:42	18:16	00:00	00:00
11:37	14:38	16:08	23:52	17:31	21:01	52:16	27:57	00:00



Dipstick method for *M. paratuberculosis* detection to detect 2 bacilli/reaction was successfully established.

Conclusion

- LAMP for *M. bovis* was successfully developed by targeting *M. bovis* specific genetic deletion
- The detection limit was 10 bacilli/reaction with 100 % specificity
- Dry LAMP kit was successfully developed by utilizing an inkjet printer
- In-cassette dipstick method was combined with dry LAMP to avoid false positive reaction
- LAMP & dipstick-based method for detecting 2 bacilli of *M. paratuberculosis* was successfully developed

Thank you very much