

Mikrobiologische Methoden zur Gewinnung von Expositionsdaten bei berufsbedingtem Kontakt mit biologischen Arbeitsstoffen an hoch belasteten Arbeitsplätzen

Teil 3: Spezies- oder gattungsspezifische Quantifizierung von Mikroorganismen in Bioaerosolen an Arbeitsplätzen

J. Schäfer, K. Fallschissel, E. Martin, U. Jäckel

Zusammenfassung Durch die Quantifizierung spezifischer Mikroorganismenarten oder -gruppen, z. B. von Humanpathogenen, die Infektionen oder Allergien auslösen können, kann das Risikopotenzial am Arbeitsplatz besser abgeschätzt werden. Daher bedarf es der Etablierung und Standardisierung kostengünstiger und schneller molekularbiologischer Nachweisverfahren wie der Methode der real time PCR. Untersuchungen der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) belegen, dass diese Methodik für Expositionsmessungen an Arbeitsplätzen geeignet ist. Die Erfahrungen der letzten Jahre sowie detaillierte Vorschläge für die Etablierung und Standardisierung werden zusammenfassend dargestellt.

Microbiological methods for exposure analyses at work-related contact with biological agents at highly contaminated workplaces – Part 3: Species or genera specific quantification of microorganisms in bioaerosols at workplaces

Abstract Quantification of specific microorganisms e.g. human pathogens which cause infections or allergies helps to estimate the risk potential at workplaces. Therefore, the establishment and standardization of faster and competitive molecular methods, like quantitative real time PCR (qPCR), are necessary. In studies performed at the Federal Institute for Occupational Safety and Health it was shown that the quantitative real time PCR is suitable for exposure measurements at different workplaces. Here, experiences while establishing the qPCR detection systems including critical points of their development as well as detailed processing steps are shown. These experiences should form the basis to apply molecular methods for standardized bioaerosol analysis.

1 Derzeit angewandte Methoden

Ist für Arbeitsplätze bekannt, dass spezielle, aus gesundheitlicher Sicht relevante Mikroorganismengattungen und/oder -arten vorkommen (z. B. aus Diversitätsanalysen unter Verwendung von Klonierungsanalysen [1]), kann ein gezielter Nachweis z. B. von humanpathogenen Mikroorganismen erfolgen. Die derzeit angewandten Methoden basieren auf kultivierungsabhängigen Analysen [2], wobei kein Medium nur für eine Art bzw. eine Gruppe selektiv ist [3] und eine zeit-

intensive Isolierung notwendig ist. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass tote Mikroorganismen mit weiterhin sensibilisierendem oder toxischem Potenzial mit diesen Methoden nicht erfasst werden können. Über eine gezielte Quantifizierung spezifischer Mikroorganismenarten oder -gruppen, z. B. von Humanpathogenen, könnte jedoch ein Risikopotenzial am Arbeitsplatz besser abgeschätzt werden. Daher bedarf es der Etablierung und Standardisierung relativ kostengünstiger und schneller molekularbiologischer Verfahren zum quantitativen Nachweis von Mikroorganismen(-gruppen). Der Einsatz der real time PCR (PCR = polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion) wird in der mikrobiellen Ökologie schon über einen bestimmten Zeitraum erfolgreich eingesetzt [4]. Auch für die Analyse von Bioaerosolproben gibt es erste Veröffentlichungen [5]. Der Einsatz dieser Methodik kann auch wesentliche Erkenntnisse zur Belastungssituation von Beschäftigten an Arbeitsplätzen liefern. Vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass diese Methoden in Zukunft häufiger Einsatz für Arbeitsplatz- und Bioaerosolmessungen finden werden, werden hier die kritischen Punkte, die bei der Entwicklung von neuen Nachweissystemen und bei der quantitativen Analyse zu berücksichtigen sind, zusammengefasst – auch als Grundlage für die zukünftige Standardisierungsarbeit für molekularbiologische Methoden bei der Bioaerosolanalyse.

2 Exkurs: Real time PCR

Die real time PCR ist vom Prinzip her vergleichbar mit einer Standard-PCR, bei der ein interessierender Abschnitt doppelsträngiger DNS gezielt *in vitro* vervielfältigt werden kann. In der real time PCR wird – im Vergleich zur konventionellen PCR – dem Reaktionsansatz neben den spezifischen Primern z. B. ein Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR®Green) zugesetzt, der an doppelsträngige DNS bindet. Durch diese Bindung wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs um etwa das Tausendfache erhöht. Während der Amplifikation durch die PCR bindet der Farbstoff an das entstandene PCR-Produkt. Die Fluoreszenz steigt somit proportional zur Produktmenge an. Neben der direkten Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen werden auch andere fluoreszenzbasierte Methoden nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET-Sonden wie Taqman-Sonden oder Molecular Beacons) angewandt. Allen Prinzipien gemein ist die Messung der Fluoreszenzzunahme während der Vervielfältigung der DNS. Da diese fluormetrische Messung in Echtzeit während der Reaktion erfolgt, wird dieses Verfahren als „real time“ PCR bezeichnet.

Dr. Jenny Schäfer, Dipl.-Ing. agr. Kerstin Fallschissel,
Dr. Elena Martin, Dr. Udo Jäckel,

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
(BAuA), Berlin.

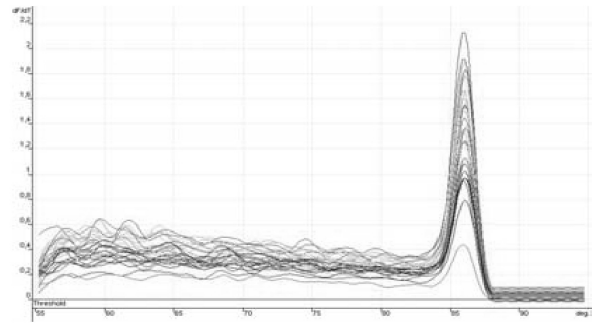
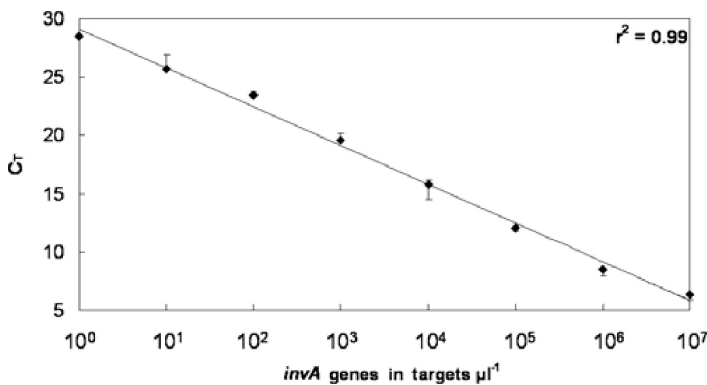


Bild 1. Lineare Korrelation der Salmonella-*invA*-Genkonzentration von 10 bis 10^7 Zielgenen, amplifiziert mittels quantitativer real time PCR und zugehöriger Ct-Werte. Werte sind Mittelwerte aus $n = 4$, einschließlich zugehöriger Schmelzkurvenanstellung.

Die Amplifikationseffizienz, also die Rate der Zunahme des zu vervielfältigenden DNS-Abschnitts pro Zyklus der PCR, ist zu Beginn der PCR-Zyklen konstant und im Idealfall mit jedem PCR-Zyklus näherungsweise gleich zwei. In der real time PCR nutzt man den anfänglichen exponentiellen Anstieg aus, um die Quantifizierung in Bezug auf die Anfangskonzentration rein mathematisch vorzunehmen. Ist das Detektionslimit des Fluoreszenzdetektors (Grundrauschen) überschritten, wird durch die Echtzeitmessung für jede Reaktion die exponentielle Produktzunahme beobachtet und bestimmt, bis zu welchem Amplifikationszyklus die Produktzunahme noch exponentiell verläuft. In Abhängigkeit von der ursprünglichen Anzahl der Ziel-DNS-Abschnitte wird das Detektionslimit des Fluoreszenzdetektors früher oder später durchlaufen. Das bedeutet: Wenn in der originären Probe viele Ziel-DNS-Abschnitte vorhanden sind, erfolgt eine Detektion schon nach wenigen Zyklen. Sind wenige vorhanden, müssen viele Zyklen durchlaufen werden. Für die Quantifizierung muss in der exponentiellen Phase der Produktzunahme dann ein Signalschwellenwert festgelegt werden, d. h. eine Signalstärke, bei der sich alle zu vergleichenden Reaktionsansätze in der exponentiellen Phase befinden. Den PCR-Zyklus, bei dem der Signalschwellenwert in einer Probe erreicht wird, bezeichnet man als Schwellenwertzyklus („Ct-Wert“, engl.: threshold cycle) dieser Probe. Diese Werte werden zur Errechnung der Ausgangskonzentration des jeweiligen Genfragments verwendet. Um Mikroorganismen bzw. Kopienanzahlen der Ziel-DNS quantifizieren zu können, bedarf es der Mitführung von Standards. Mithilfe dieser Standards, die eine bekannte aufsteigende Konzentration der Genfragmente/target-Zahl haben (z. B. 10^0 bis 10^8 DNS-Fragmente), erfolgt die Erstellung einer Kalibriergeraden. Nach Festlegung des oben genannten Signalschwellenwerts wird für die Standards und die Umweltproben der Ct-Wert berechnet. Aus den Ct-Werten der Standards wird die Kalibriergerade erstellt und anhand dieser werden die unbekannt Konzentrationen in der Umweltprobe bestimmt. Hierbei sollte ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen Genfragment/target-Zahl und dem Ct-Wert beobachtet werden ($R^2 = 1$) (Bild 1).

3 Erfassung luftgetragener Bakterien durch eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

In der BAuA wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Projekte durchgeführt, die belegen, dass diese Methoden auch erfolgreich für Expositionsmessungen an verschiede-

nen Arbeitsplätzen angewandt werden können. So wurden real-time-PCR-Systeme entwickelt und etabliert, die als Modellsysteme für die Bereiche „Infektion und Allergien“ entwickelt wurden. So konnte 2009 ein Nachweissystem für Salmonellen [6] und 2011 ein Nachweissystem für *Saccharopolyspora rectivirgula*, einen Auslöser der exogen allergischen Alveolitis [7], erfolgreich etabliert werden. Weiterhin wurde 2010 ein real-time-PCR-System für den gezielten Nachweis von *Jeotgalicoccus*-Spezies (zugehörig zur Familie der *Staphylococcaceae*) etabliert [8], das als Modellsystem für die Messung der Verbreitung von Mikroorganismen aus z. B. Geflügelmastanlagen angewandt werden kann.

4 Etablierung und Standardisierung einer quantitativen real time PCR

Für die Etablierung und Standardisierung eines quantitativen Nachweises von Mikroorganismen(-gruppen) ist zunächst die Etablierung geeigneter DNS-Extraktionsverfahren, einschließlich der Festlegung von Negativkontrollen, von entscheidender Bedeutung. Hierbei besteht die Möglichkeit, kommerziell erhältliche DNS-Extraktionskits oder aber (etablierte) Labormethoden, wie z. B. eine Chloroform/Phenol-Fällung, anzuwenden. Nur bei entsprechend guter DNS-Extraktionsfähigkeit ist später auch ein optimaler Nachweis der Zielmikroorganismen gewährleistet.

Da für den gezielten Nachweis von Mikroorganismen ein spezifisches Primersystem benötigt wird, sollte zunächst mithilfe einer Literaturrecherche ermittelt werden, ob für den (die) Zielmikroorganismus(-gruppe) bereits ein spezifisches PCR-System beschrieben und etabliert ist. So konnte beispielsweise für den Nachweis von Salmonellen ein bereits aus der Lebensmittelanalytik bekanntes Verfahren gefunden und erfolgreich eingesetzt werden. Für den Nachweis von *S. rectivirgula* und *Jeotgalicoccus* sp. musste hingegen ein neues spezifisches Primersystem für die PCR entwickelt werden. Hierfür können die Primer so gewählt werden, dass sie entweder Abschnitte auf spezifischen Genen, die nur in den (der) Zielmikroorganismen(-gruppe) vorkommen (sog. „Housekeeping-Gene“), flankieren oder aber spezifische Gene erfassen, die in allen Organismen vorhanden sind, aber gruppen- oder speziesspezifische Nukleinsäureabschnitte enthalten. So wurde beispielsweise für die Gattung *Salmonella* ein Abschnitt des Invasionsgens (*invA*) als Ziel gewählt, da es nur in dieser Bakteriengattung vorhanden ist, während für *S. rectivirgula* und *Jeotgalicoccus* sp. das 16S-rRNA-Gen als Zielmolekül gewählt wurde.

Unabhängig vom Zielgen muss die Anwendbarkeit der neu entwickelten Primer für jedes System zunächst *in silico* anhand entsprechender Datenbanken erprobt werden. Zeigt sich hierbei die Spezifität des Primersystems, können die Primer anschließend *in vitro* eingesetzt werden.

Zunächst erfolgt die Prüfung des PCR-Systems anhand ausgewählter Kontrollspezies. Für diese Prüfung werden sowohl verschiedene Spezies der Zielmikroorganismen (-gruppe) als sog. Positivkontrollen als auch artverwandte Nicht-Zielmikroorganismen, die mit dem System nicht erfasst werden sollen, als sog. Negativkontrollen eingesetzt (Erstellung von Standards: vgl. DIN EN ISO 20837 und DIN EN ISO 22118).

So wurden bei der Spezifitätsprüfung des Primersystems für den Nachweis von *S. rectivirgula* sieben verschiedene *S. rectivirgula*-Stämme und zwölf Nicht-Ziel-Saccharopolyspora-Spezies, die alle bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) hinterlegt sind, geprüft. Für den Spezifitätsnachweis zur Detektion von Salmonellen wurden verschiedene *Salmonella* sp. als Positivkontrollen und *Escherichia coli* als Negativkontrolle eingesetzt. Für die anschließende Etablierung der real time PCR wurden bei allen drei hier erwähnten real-time-PCR-Systemen kommerziell erhältliche „real time PCR-Kits“ verwendet. Diese enthalten alle für die PCR benötigten Komponenten (einschließlich des Fluoreszenzfarbstoffs), außer den spezifischen Primern.

4.1 Spezifitätsprüfung

Prinzipiell ist die Spezifität der PCR bzw. real time PCR durch die Auswahl der Primer und der Amplifikationsbedingungen (z. B. Annealingtemperatur und Elongationszeit) gegeben. Zur Qualitätssicherung gerade für Analysen in komplexen Proben ist es jedoch unerlässlich, die Spezifität während der Etablierungsphase und auch später während der Messungen zu testen. Die erste Spezifitätsprüfung der real time PCR erfolgt über die Analyse der Schmelzkurve der erzeugten PCR-Produkte. Die Schmelzkurve gibt dabei Aufschluss über die Temperatur, bei der das amplifizierte doppelsträngige DNS-Fragment denaturiert wird, da hier der gesamte in der DNS gebundene Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green) freigesetzt wird. Eine Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten kann durch den Unterschied in der Schmelztemperatur getroffen werden. Erfolgt das Aufschmelzen der PCR-Produkte bei einer spezifischen Temperatur, kann prinzipiell von einer spezifischen Amplifikation durch die eingesetzten Primer ausgegangen werden (Bild 1).

Im zweiten Schritt sollten die real-time-PCR-Produkte noch auf ein Agarosegel aufgetragen werden und über eine Gelelektrophorese mit Größenstandards auf die spezifische Fragmentlänge geprüft werden.

Die abschließende Überprüfung der Spezifität des entwickelten real-time-PCR-Systems erfolgt durch dessen Anwendung für Umweltproben. Hierzu werden z. B. Bioaerosolproben an verschiedenen Standorten gesammelt und/oder Materialproben gewonnen, in denen die interessierenden Mikroorganismen(-gruppen) vermutet werden. Da in Umweltproben auch bislang unbekannte Organismen bzw. deren DNS vorhanden sind, die nicht in den Datenbanken vorkommen bzw. gelistet sind, kann eine unspezifische Primerbindung im Vorfeld (nur durch einen Datenbankabgleich) nicht ausgeschlossen werden. Somit ist eine Spezifi-

tätsprüfung der PCR-Produkte, die aus Umweltproben gewonnen wurden, zur Etablierung des Primersystems unumgänglich. Hierzu sollten Klonbibliotheken [1] aus den real-time-PCR-Produkten der Bioaerosol-Umweltproben angelegt werden. Von jeder Probe sollten anschließend mindestens 15 Kloninserts sequenziert und analysiert werden. Für die Auswertung erfolgt zunächst eine BLAST-Suche¹⁾, um die erhaltene Gensequenz einzuordnen. Die detaillierte Berechnung der Sequenzähnlichkeit der zu analysierenden Sequenz zu den Typstammsequenzen der jeweiligen Zielmikroorganismen(-gruppen) gibt dann Aufschluss über die Spezifität des eingesetzten Systems (für eine detaillierte Angabe der Analyseverfahren siehe [1]). Hierbei sollten alle analysierten Kloninsertsequenzen eine sehr hohe (idealerweise 100%ige) Sequenzübereinstimmung mit der Typstammsequenz des(r) Zielmikroorganismus(-gruppe) aufweisen (Bild 2).

4.2 Analyse möglicher Einfluss- und Störgrößen auf die Quantifizierung

Bei der Anwendung der real time PCR gibt es verschiedene Faktoren, die beachtet werden sollten, besonders um eine (qualitätsgesicherte) Quantifizierung zu ermöglichen. So müssen Hemmeffekte auf die real time PCR ausgeschlossen und das Auftreten methodisch bedingter DNS-Verluste bei der DNS-Extraktion und deren Größenordnung untersucht werden. Der DNS-Extraktionsmethode, deren Effizienz und der Qualität der extrahierten DNS aus dem Zielorganismus kommt damit eine ausschlaggebende Rolle für die nachfolgenden Genquantifizierungen zu. Durch Kenntnisse und Einbeziehen dieser Verlustquellen kann dies bei einer Expositionsabschätzung berücksichtigt werden.

4.2.1 Hemmeffekte

Im Gegensatz zu DNS-Extrakten aus Reinkulturen können solche aus Umweltproben Substanzen enthalten, die z. B. die taq-Polymerase hemmen und somit die Amplifikationseffizienz während der PCR herabsetzen. Auch aus Bioaerosolen könnten solche hemmenden Substanzen mit extrahiert werden [10; 11]. Bioaerosole z. B. in Tierställen bestehen aus sehr komplexen Stäuben, die Anteile von Futtermittel, Einstreu, Fäkalbestandteile, aber auch Hautpartikel, Haare, Hautschuppen oder Federn enthalten können [12]. Neben den in den Umweltproben enthaltenen Inhibitoren kann auch DNS anderer Organismen (Nicht-Ziel-DNS) zu einer Beeinflussung der spezifischen PCR-Reaktion führen [13], da auch sie die Effektivität der taq-Polymerase einschränken.

Da die real time PCR auf der Ermittlung des Ct-Werts in der exponentiellen Phase und einer anschließenden mathematischen Berechnung der Konzentration der nachzuweisenden Mikroorganismen in der Umweltprobe beruht, ist es somit äußerst wichtig, die Amplifikationseffizienzen der eingesetzten Standards mit denen der zu untersuchenden Probe zu überprüfen und zu vergleichen. Unterschiede bei den Amplifikationseffizienzen der Standards zu der analysierten Umweltprobe würden sonst zu Fehlberechnungen führen. Somit ist eine Berechnung der Einzelamplifikationseffizienzen der einzelnen analysierten Standards und Proben für eine korrekte Quantifizierung zwingend notwendig. Die

¹⁾ www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

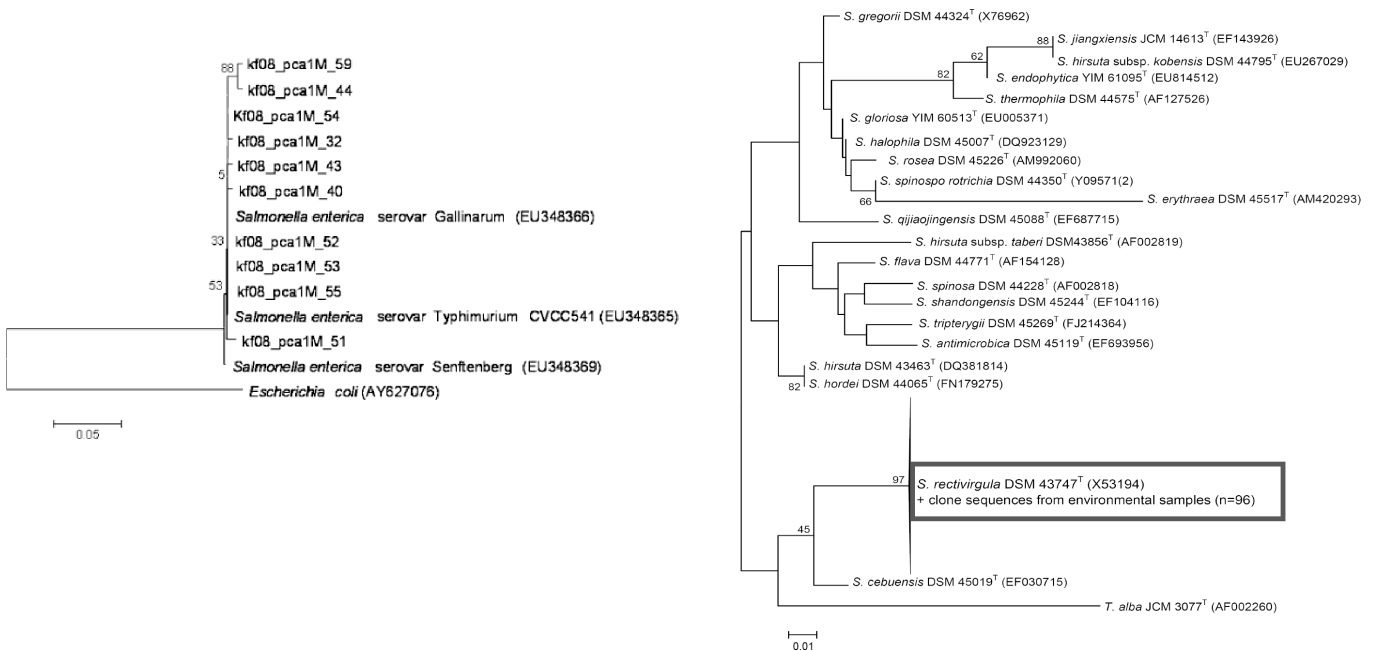


Bild 2. Dendrogramme (Neighbour joining) der ermittelten operational taxonomic units (OTU) aus Bioaerosolproben eines Hähnchenmaststalls nach erfolgten Klonierungsanalysen für den Spezifitätsnachweis für Salmonella-Spezies und aus Bioaerosolproben eines Entenstalls sowie einer Kompostierungsanlage für den Spezifitätsnachweis von *S. rectivirgula*. Dendrogramme und Distanzen wurden unter Verwendung der Software MEGA 4.0-5.3 [9] ermittelt und erstellt.

Einzelamplifikationseffizienzen müssen bei den Standards und den unbekanntenen Proben gleich sein, wobei eine Effizienz zwischen 90 und 100 % anzustreben ist.

4.2.2 Extraktionsverluste

Umweltproben können weiterhin Substanzen enthalten, die einen Einfluss auf die DNS-Extraktionseffizienz haben. Die Mikroorganismen können aber auch so in der Probenmatrix vorliegen, dass die DNS nicht vollständig extrahiert werden kann und nach der DNS-Extraktion nur ein Teil der originär in der Probe vorhandenen DNS aus den Zielmikroorganismen für den Einsatz in der real time PCR vorliegt. Dies kann zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Konzentration von Mikroorganismen führen.

Zur Etablierung eines neuen Nachweissystems sollte daher die Ermittlung der DNS-Extraktionseffizienzen aus den Reinkulturen sowie aus den Umweltproben erfolgen. Um zu ermitteln, ob die gesamte genomische DNS sowohl aus den Reinkulturen der Zielmikroorganismen als auch die Zielmikroorganismen-DNS aus den Umweltproben mit dem angewandten DNS-Extraktionsverfahren extrahiert wird, sollten „Spiking-Experimente“ durchgeführt werden. Hierbei werden bekannte Anzahlen von Mikroorganismen verschiedenen Umweltproben zugesetzt und nach der DNS-Extraktion auf die Wiederfindung geprüft.

Hierbei kann jedoch das Auszählen der Zellen, wie im Fall von *S. rectivirgula* zur Bestimmung der einzusetzenden Zellzahl, problematisch sein, da z. B. durch eine fädige Zellmorphologie der Organismen einzelne Zellen nicht eindeutig bestimmt werden können. Die Zellzahl von Salmonellen (stäbchenförmige Bakterien) oder *Jeotgalicoccus*-Zellen (Kokken) in einer Zellsuspension lässt sich z. B. mittels Fluoreszenzfärbung relativ einfach unter einem Mikroskop ermitteln. Bei *Saccharopolyspora rectivirgula*, einem sporenbildenden Bakterium, das sowohl Substrat- als auch Luftmycelien bildet, ist dies jedoch nicht möglich. Daher musste hier eine andere Bezugsgröße, die Zellmasse, zu-

grunde gelegt werden. Die ermittelten DNS-Extraktionseffizienzen beim Nachweis von *S. rectivirgula* bzw. *Salmonella* sp. zeigten, dass die DNS-Extraktionseffizienz bei *Salmonella* sp. zwischen 15 und 35 % (ermittelt über eine definiert eingesetzte Zellzahl) und bei *S. rectivirgula* zwischen 7 und 55 % (ermittelt über das geschätzte Gewicht einer Zelle) liegt.

4.2.3 Anzahl an Zielgenen im Zielorganismus

Für die Quantifizierung der Zielmikroorganismen(-gruppen) über die real time PCR ist ebenfalls die Ermittlung der Anzahl der vorliegenden Genkopien der Zielgene/Gen-Fragmente in einem Organismus von großer Bedeutung. So können die Zielgene in unterschiedlicher Kopienzahl im Genom der Mikroorganismen vorliegen. Im hier dargestellten Beispiel für den Nachweis von *Salmonella* sp. wurden Primer gewählt, die innerhalb des InvA-Gens binden, das spezifisch für die Gattung *Salmonella* ist. Dieses Gen ist in der stationären Wachstumsphase nur einmal pro Genom vorhanden. So kann von einer detektierten Genkopie auf eine Zelle zurückgeschlossen werden. Anders ist es beim Nachweis von *S. rectivirgula* oder *Jeotgalicoccus* sp., bei denen das 16S-rRNA-Gen als Zielgen gewählt wurde. Dieses Gen kann zwischen ein- und 15-mal in einem Genom eines Bakteriums vorkommen [14]. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, vor einer Quantifizierung mit der real time PCR die Anzahl der vorliegenden Zielgene, hier der 16S rRNA-Genkopien, zu ermitteln. Eine geeignete Methode hierfür ist die sog. Southern Blot-Analyse [7]. Anhand der vorliegenden Anzahl der Zielgene pro Zelle muss dementsprechend auf die Zellzahl zurückgerechnet werden, da es sonst zu einer Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Mikroorganismenzahl kommt.

4.2.4 Schwierigkeiten

Auch das Vorliegen freier Mikroorganismen-DNS in Umweltproben kann zu einer Überschätzung der tatsächlich

Methoden bei Anwendung der quantitativen real time PCR zum quantitativen Nachweis von Mikroorganismenarten oder -gruppen.

Anzuwendende Methoden nach Literaturrecherche	Etabliertes System vorhanden	Systemetablierung notwendig
„Findung“ eines spezifischen PCR-Systems	ja	nein
Etablierung eines neuen PCR-Systems	nein	ja
Spezifitätsprüfung der Zielmikroorganismen (<i>in silico</i> und <i>in vitro</i>)	empfohlen	ja
DNS-Extraktionseffizienz	ja	ja
qPCR-Amplifikationseffizienz	ja	ja
Spezifitätsnachweis Schmelzkurve, Agarosegel	empfohlen	ja
Spezifitätsnachweis in der Umweltprobe	ja	ja
Ermittlung der Genkopienzahl	ja, wenn nicht bekannt	ja

vorhandenen Mikroorganismenkonzentration in einer Umweltprobe führen. Dieser Punkt sollte grundsätzlich Beachtung finden, allerdings müssen dazu die Zielgenfragmente vollständig erhalten sein, müssen bei der DNS-Extraktion mit erfasst werden und dürfen dabei auch nicht z. B. durch Scherkräfte zerstört werden. Einer Überquantifizierung aufgrund frei vorliegender DNS in Umweltproben kann jedoch durch eine getrennte Extraktion extra- und intrazellulärer DNS (eDNS/iDNS) entgegengewirkt werden.

5 Geeignete Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer Mikroorganismenarten und -gattungen

Trotz aller hier aufgeführten Voraussetzungen ist die real time PCR zur Quantifizierung und Identifizierung von biologischen Arbeitsstoffen in Bioaerosolen ein sehr gut geeignetes Analysenverfahren. Durch die Anwendung dieser Methode können sowohl qualitative (über spezifische Primersysteme) als auch quantitative Ergebnisse innerhalb von zwei Tagen erhalten werden. Vergleichbare Auswertungen mittels kultivierungsbasierter Verfahren nehmen z. T. Wochen in Anspruch; dazu kommt ein hoher Personal- und Zeitaufwand bis zur abschließenden Beurteilung. Anhand der Arbeiten zum Nachweis von Salmonellen als auch von *S. rectivirgula* konnte gezeigt werden, dass es bei der Anwendung kultivierungsabhängiger Methoden vermutlich zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen spezifischen Mikroorganismenkonzentration in Bioaerosol-Umweltproben kommt [6; 15]. Hierbei scheint besonders die Sammlung luftgetragener Mikroorganismen eine große Rolle zu spielen, da Mikroorganismen aufgrund der bei der Sammlung auftretenden physikalischen Stressoren ihre Lebensfähigkeit bzw. ihre Kultivierbarkeit verlieren und somit nicht mehr nachgewiesen werden können.

Bei der Anwendung der quantitativen real time PCR zum Nachweis von Mikroorganismen(-gruppen) kommt der vorherigen Etablierung und Auswertung eine zentrale Bedeutung zu. Diese müssen entsprechend sorgfältig und mit der entsprechenden Fachkompetenz durchgeführt werden, um falsch positiven Ergebnissen bzw. Fehlern der Konzentrationsbestimmung vorzubeugen. Weiterhin müssen mögliche Verluste, wie sie oben beschrieben wurden, mit einbezogen werden. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben kann die real-time-PCR-Methode bei der Risikoabschätzung bzw. der Überprüfung von Schutzmaßnahmen erfolgreich eingesetzt werden.

6 Standardisierung

Die Methode der real time PCR ist geeignet für einen standardisierten Nachweis von Mikroorganismen(-gruppen) an Arbeitsplätzen unter Einhaltung der für die Methodenetablierung geforderten Parameter (**Tabelle**). Zwingend für eine Standardisierung ist jedoch die Bestimmung der verschiedenen Verfahrenskenngrößen. Dazu sollte ein Probenaustausch unter verschiedenen Laboratorien stattfinden, die sich, beginnend mit der Quantifizierung der DNS-Extrakte bis hin zur Ermittlung von Standardabweichungen und Limits bei der Quantifizierung von Mikroorganismen mittels real time PCR, austauschen und gegenseitig prüfen.

Die in der BAuA erhaltenen Erkenntnisse zur Etablierung und Anwendung der quantitativen real time PCR zum Nachweis von Mikroorganismen(-gruppen) sollen zukünftig in einer standardisierten Arbeitsanleitung münden und somit Einzug in Routinelabore halten.

Literatur

- [1] Martin, E.; Schäfer, J.; Jäckel, U.: Mikrobiologische Methoden zur Gewinnung von Expositionsdaten bei berufsbedingtem Kontakt mit biologischen Arbeitsstoffen an hoch belasteten Arbeitsplätzen – Teil 2: Qualitative Analyse von Mikroorganismen in komplexen Bioaerosolen (Genbibliotheken). Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 73 (2013) Nr. 9, S. 361-366.
- [2] Jäckel, U.; Schäfer, J.; Martin, E.: Mikrobiologische Methoden zur Gewinnung von Expositionsdaten bei berufsbedingtem Kontakt mit biologischen Arbeitsstoffen an hoch belasteten Arbeitsplätzen – Teil 1: Methodenauswahl. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 73 (2013) Nr. 9, S. 358-360.
- [3] Gärtner, A.; Gessner, A.; Martin, E.; Schneider, D.; Jäckel, U.: Emissionen aus der Hähnchenmast – Untersuchungen zur Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft und Antibiotikaresistenz – Teil 1: Konzept und methodisches Vorgehen. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 73 (2013) Nr. 9, S. 372-374.
- [4] Kolb, S.; Cabrera, A.; Kammann, C.; Kämpfer, P.; Conrad, R.; Jäckel, U.: Quantitative impact of CO₂ enriched atmosphere on abundances of methanotrophic bacteria in a meadow soil. Biol. Fertil. Soils 41 (2005), S. 337-342.
- [5] Oppliger, A.; Charrie, N.; Droz, P. O.; Rinsoz, T.: Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; Use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. Ann. Occup. Hyg. 52 (2008), S. 405-412.

- [6] Fallschissel, K.; Kämpfer, P.; Jäckel, U.: Direct detection of Salmonella cells in the air of livestock stables by realtime PCR. Ann. Occup. Hyg. 53 (2009) Nr. 8, S. 859-868.
- [7] Schäfer, J.; Kämpfer, P.; Jäckel, U.: Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative Real time PCR. Ann. Occup. Hyg. 55 (2011), S. 612-619.
- [8] Martin, E.; Fallschissel, K.; Kämpfer, P.; Jäckel, U.: Detection of *Jeotgalicoccus* spp. in poultry house air. Syst. Appl. Microbiol. 33 (2010), S. 188-192.
- [9] Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S.: MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28 (2011), S. 2731-2739.
- [10] Tsai, Y. L.; Olson, B. H.: Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) Nr. 2, S. 754-757.
- [11] Roose-Amsaleg, C. L.; Garnier-Sillam, E.; Harry, M.: Extraction and purification of microbial DNS from soil and sediment samples. Appl. Soil Ecol. 18 (2001), S. 47-60.
- [12] Seedorf, J.; Hartung, J.: Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung. Hrsg.: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL). Darmstadt 2002.
- [13] Alvarez, J. A.; Buttner, M. P.; Stetzenbach, L.: Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994), S. 374-376.
- [14] Acinas, S. G.; Marcelino, L. A.; Klepac-Ceraj, V.; Polz, M. F.: Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. Int. J. Syst. Bacteriol. 186 (2004), S. 2629-2635.
- [15] Schäfer, J.; Klug, K.; van Kampen, V.; Jäckel, U.: Quantification of *Saccharopolyspora rectivirgula* in composting plants: Assessment of the relevance of *S. rectivirgula*. Ann. Occup. Hyg. (2013), doi:10.1093/annhyg/met010.