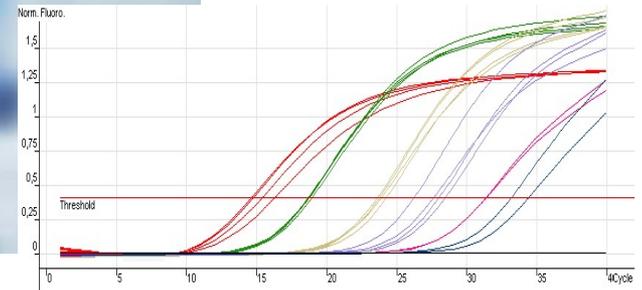




Einsatz der *Realtime PCR* zum Nachweis von Salmonellen in Bioaerosolen



K. Fallschissel, U. Jäckel, P. Kämpfer

Bioaerosole in landwirtschaftlichen Tierställen

- **Aerosole in Tierställen bestehen aus komplexen Stäuben von Futter, Einstreu, Fäkalbestandteilen und Haut- bzw. Federpartikeln**
- **Daher sind auch biologische Arbeitsstoffe in hohen Konzentrationen zu finden**
- **In Abhängigkeit von Tierart, Stallaufbau und Klima kann die Mikroorganismen Konzentration sowie ihre Arten-Zusammensetzung stark schwanken**
- **Dabei wurden Konzentrationen von bis zu 10^{10} Zellen pro m^3 Luft gefunden** (Radon *et al.*, 2002)

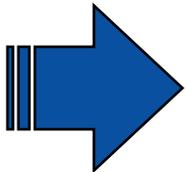
Bioaerosole in landwirtschaftlichen Tierställen

- **Vorherrschende Gruppen sind Staphylokokken und Streptokokken**
(Hartung, 1994)
- **Aber auch weitere für den Menschen pathogene und allergieauslösende Mikroorganismen wurden gefunden**
z. B. *Listeria monocytogenes*, Aktinomyzeten, *Pantoea agglomerans*,
Salmonella typhimurium, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*
- **Solche Organismen können zu Infektionen der Atemwege, Allergien oder toxischen Effekten (Endotoxine!) gerade an hoch belasteten Arbeitsplätzen führen**

Bioaerosole in landwirtschaftlichen Tierställen

- **Vorherrschende Arten sind Staphylokokken und Streptokokken**
(Hartung, 1994)
- **Aber auch für den Menschen pathogene und allergieauslösende Mikroorganismen wurden gefunden**
z. B. *Listeria monocytogenes*, Aktinomyzeten, *Pantoea agglomerans*,
Salmonella typhimurium, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*
- **Solche Organismen können zu Infektionen der Atemwege, Allergien oder toxischen Effekten (Endotoxine!) gerade an hoch belasteten Arbeitsplätzen führen**

Zur Gefährdungsbeurteilung ist nicht nur die Mikroorganismen Gesamtkonzentration, sondern auch die Bestimmung der vorkommenden Arten von Bedeutung!



Untersuchung von Bioaerosolen

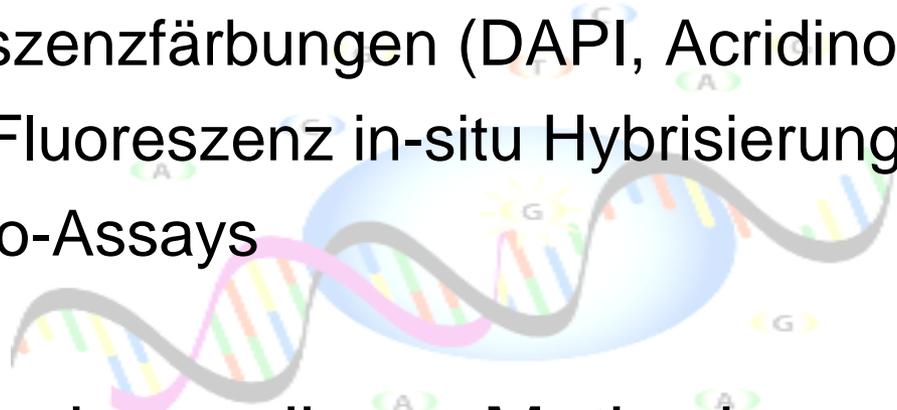
Klassische Methoden

- **Die Untersuchung von Mikroorganismen aus Bioaerosolen wird meist anhand kultivierungsbasierter Ansätze durchgeführt**
- **Diese erfassen nur die zu den gewählten Bedingungen kultivierbaren Organismen**
- **Durch die Sammelmethode kann es zu einer Beeinflussung der Kultivierbarkeit kommen**
- **Tote Organismen mit allergenem Potential werden nicht erfasst**
- **Entsprechend ist das Erfassungsspektrum durch diese Methoden begrenzt**
- **Zudem ist der Labor- und Zeitaufwand relativ hoch**

Untersuchung von Bioaerosolen

Molekularbiologische Methoden

- Neuere, kultivierungsunabhängige Methoden wurden ebenfalls an Bioaerosolen erprobt:
 - Fluoreszenzfärbungen (DAPI, Acridinorange)
 - FISH (Fluoreszenz in-situ Hybrisierung)
 - Immuno-Assays
 - PCR
- Eine Erprobung dieser Methoden erfolgte bislang nur zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen
- Bislang sind diese Methoden nicht standardisiert



Molekularbiologische Methoden



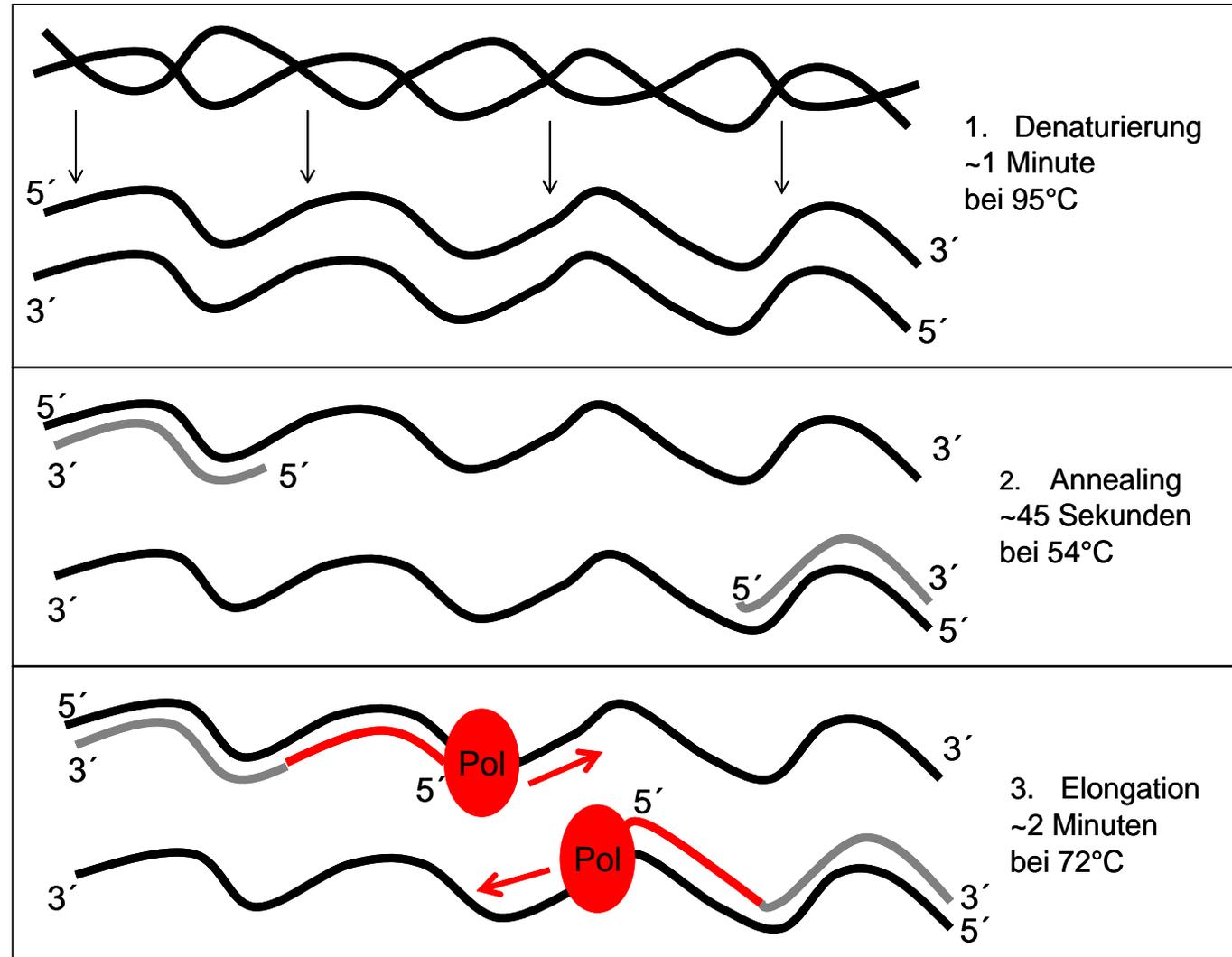
- **Ausgangsbasis der Untersuchungen ist die DNA**
→ Detektion unabhängig vom Lebenszustand der Zellen!
- **Grundlegende Methode zur Untersuchung ist die PCR**
(„*polymerase chain reaction*“)
- **Die Untersuchung ist prinzipiell in folgende Schritte eingeteilt:**
 - Gewinnung der Bioaerosol-Probe
 - DNA-Extraktion
 - *PCR/Realtime PCR*
 - (Gelelektrophorese)
 - Auswertung/Quantifizierung



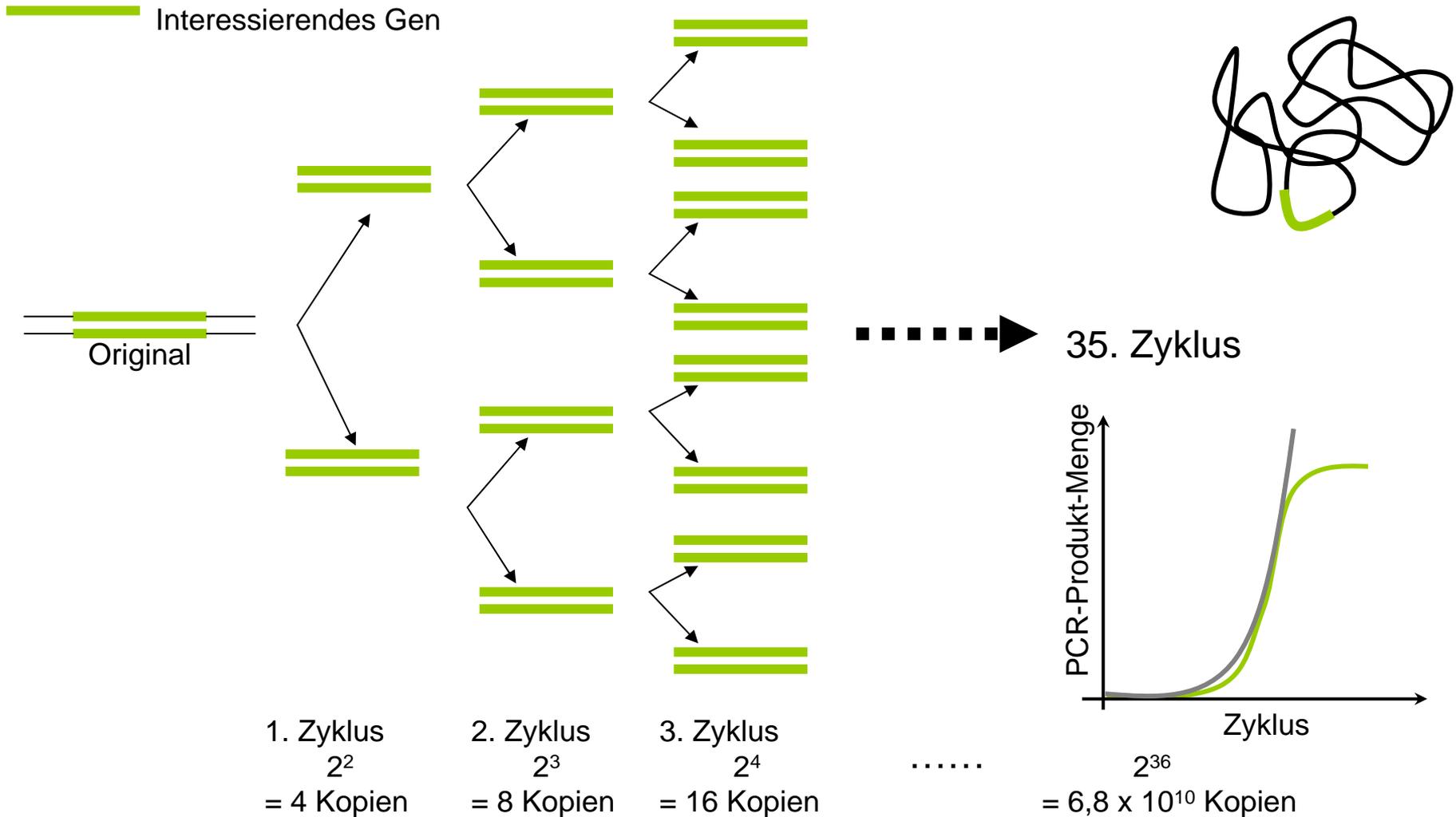
Molekularbiologische Methoden - PCR

Primer
= „Starter“, kurze Sequenzabschnitte, die als Anknüpfungspunkt für die Polymerase dienen

Polymerase
= Enzym zur Synthese eines neuen komplementären DNS-Doppelstranges

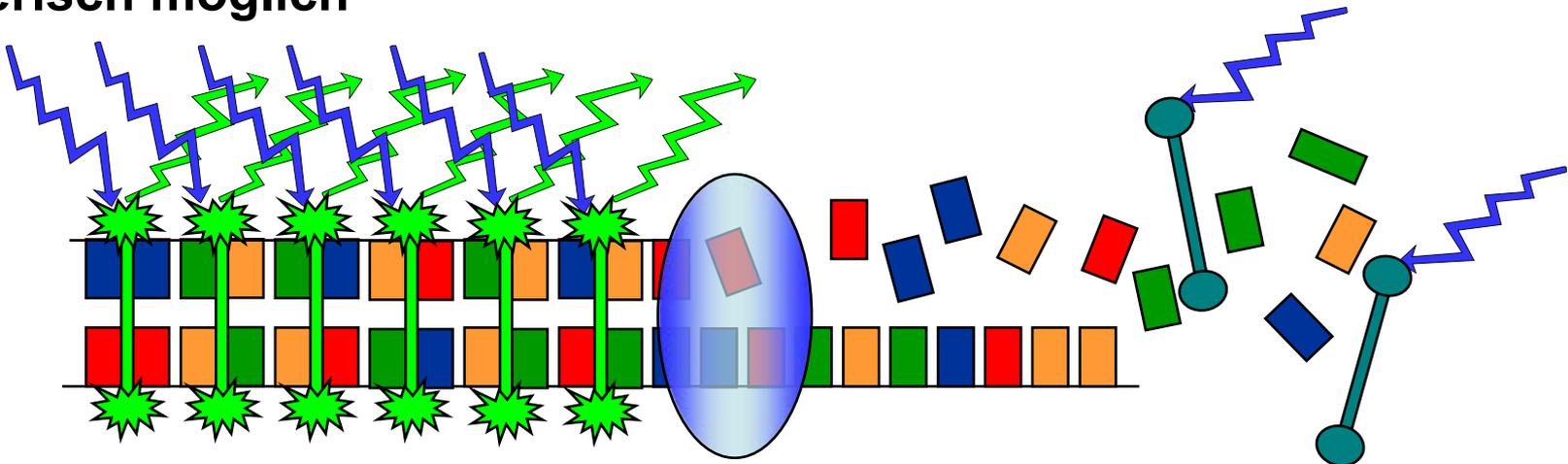


Molekularbiologische Methoden - PCR



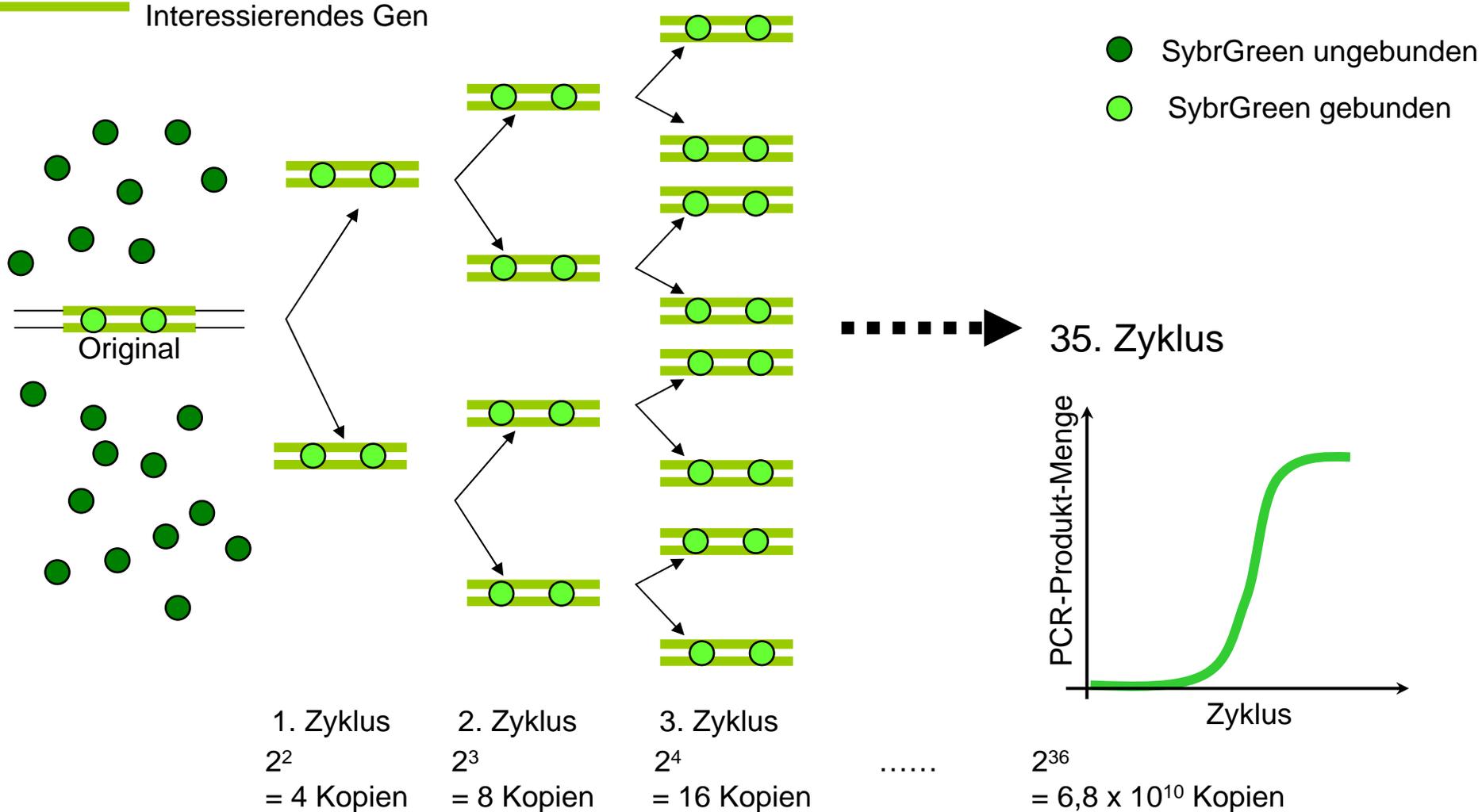
„Realtime PCR“

- Ablauf ist analog zur „normalen“ PCR
- Zugabe eines dsDNS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes zum PCR-Ansatz (Sybr[®]Green)
- Bei Bindung an dsDNS wird die Fluoreszenz um das 1000fache erhöht
- Die Messung der Zunahme der Fluoreszenzintensität erfolgt während der Amplifikation („Realtime“)
- Die Fluoreszenzzunahme ist proportional zur Produktzunahme
- Dadurch ist die Quantifizierung der Ausgangskonzentration rechnerisch möglich

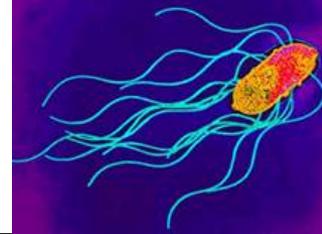


Molekularbiologische Methoden - PCR

Interessierendes Gen

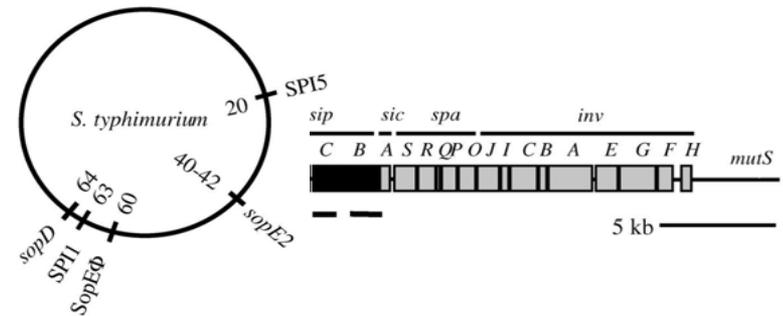


Zielorganismengruppe *Salmonella*

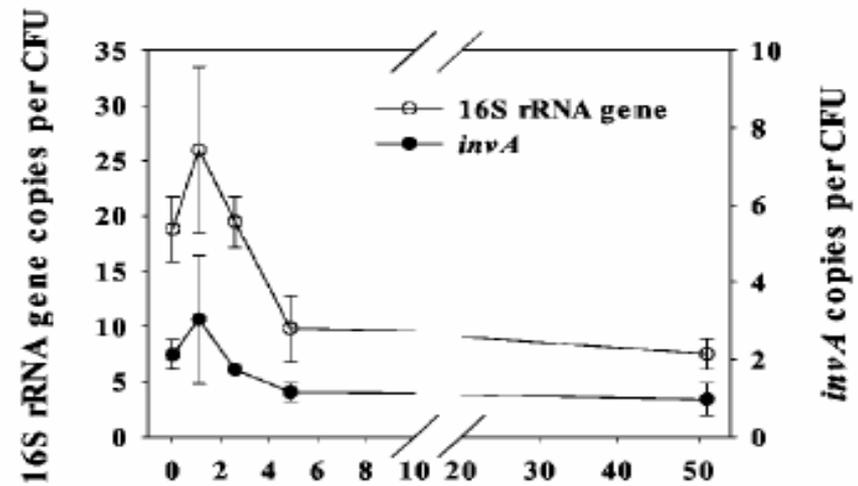


- Spezifischer Abschnitt auf dem Genom (*invA*-Gen) = 248 bp
- Dies Gen ist weit verbreitet und spezifisch für die Gattung *Salmonella* (Galan *et al.*, 1991)
- In der stationären Phase ist nur eine Kopie des *invA*-Gens vorhanden (Fey und Eichler, 2004)

➔ Ein *target* = eine Zelle



Aus: Miroid *et al.* (2001)



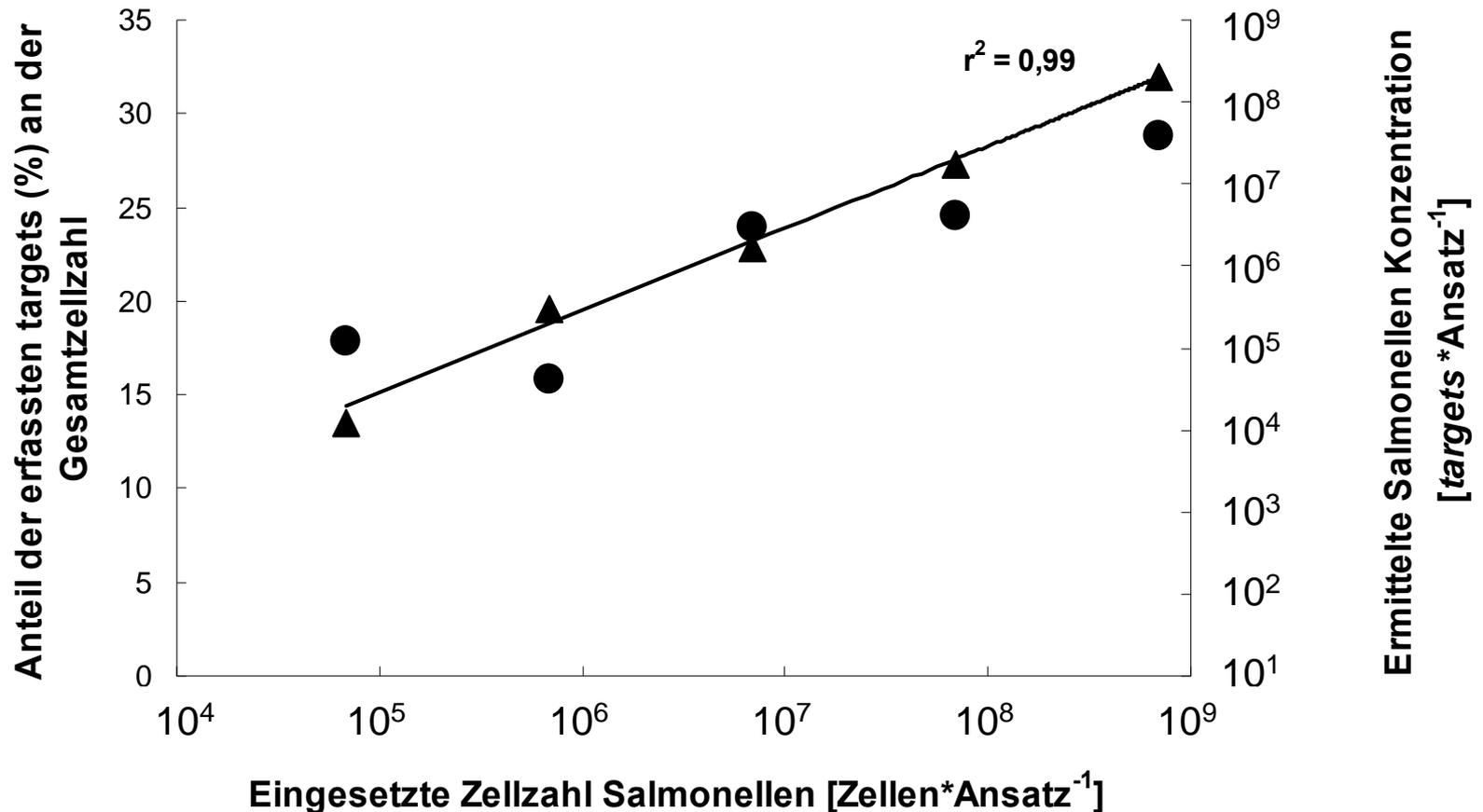
Aus: Fey und Eichler (2004)

Untersuchung potentieller Hemmstoffe

- **Bioaerosole sind in ihrer Zusammensetzung sehr variabel**
 - **Verschiedenartigste Bestandteile können zu Hemmungen der darauf folgenden molekularbiologischen Analyse führen**
 - **Pollen, Huminsäuren, Nicht-Ziel-DNS, Cellulose, Schwermetalle, Proteine ...**
 - **Untersuchungen zur Abschätzung dieser Einflüsse:**
 1. **Mischen definierter Salmonellen-Zellzahlen mit konstanter Zellzahl eines Nicht-Ziel Organismus (*Escherichia coli*)**
 2. **Zugabe definierter *Salmonella* DNS-Mengen zu DNS-Extrakten extrahiert aus Kuhstall-Bioaerosolproben**
 3. **Zugabe definierter Salmonellen-Zellzahlen zu Bioaerosolproben eines Putenstalles**
- **Anschließende Aufarbeitung und Konzentrationsbestimmung der Salmonellen anhand des entwickelten Realtime PCR Protokolls**

Untersuchung potentieller Hemmstoffe

Mischen definierter Salmonellen-Zellzahlen mit konstanter Zellzahl eines Nicht-Ziel Organismus (*Escherichia coli*)

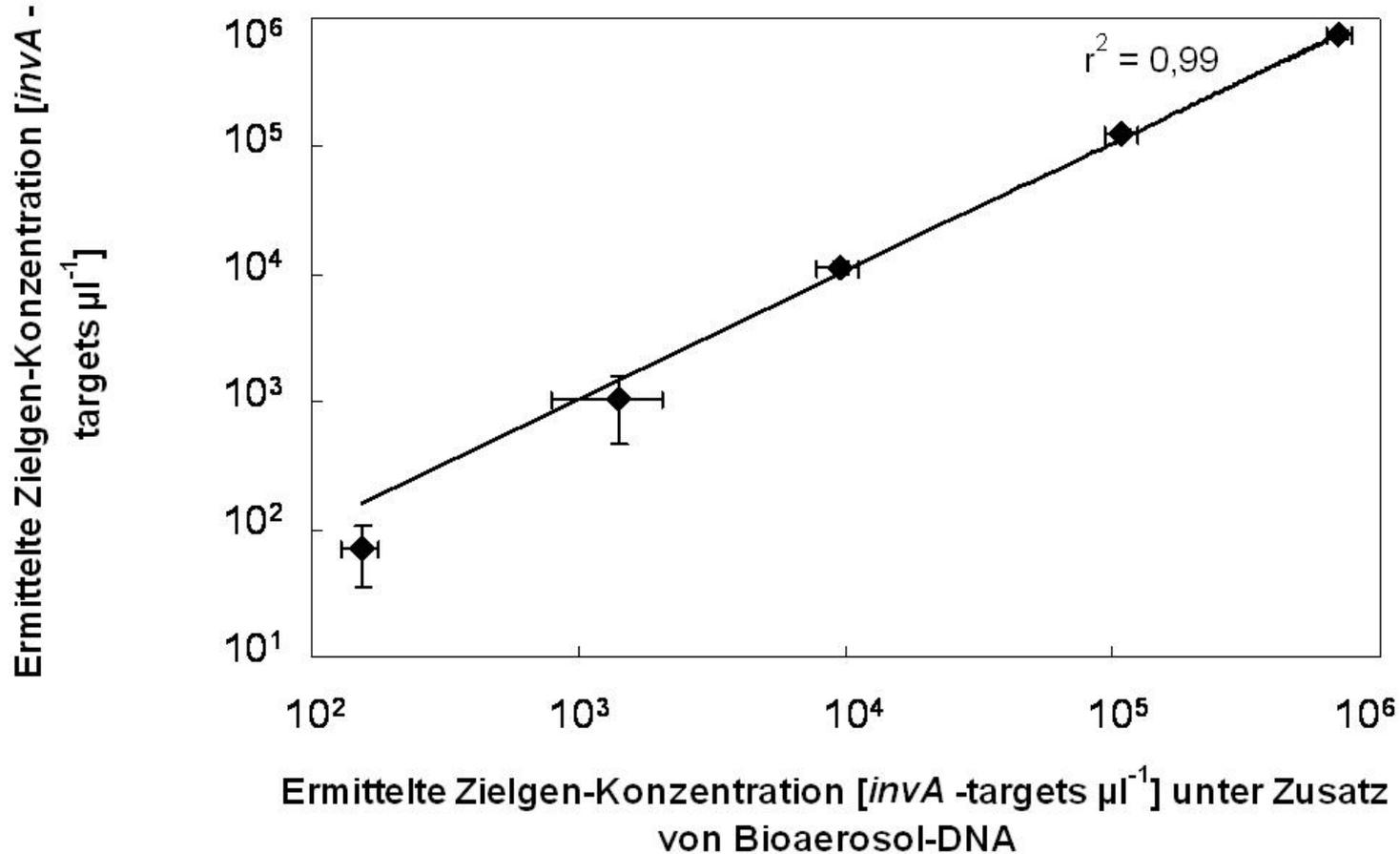


● Effizienz (%) mit E. coli ▲ InvA-Gene absolut mit E. coli

Wiederfindung im Mittel 22,3% ±4,8% SA, entspricht der DNA-Extraktionseffizienz

Untersuchung potentieller Hemmstoffe

Zugabe definierter *Salmonella* DNS-Mengen zu DNS-Extrakten aus Kuhstall Bioaerosolproben



Darstellung der Korrelation von *Salmonella* Quantifizierungsstandards amplifiziert anhand der *Realtime PCR* unter (y-Achse) und ohne Zugabe (x-Achse) von DNS extrahiert aus Kuhstall-Bioaerosolen. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=4 ±SA.

Erprobung des entwickelten Protokolls

Methodik:

- Sammlungen mittels Impingement (30 min) und Filtration auf Polycarbonatfilter (20 min)
- Lösen der Zellen vom Filter mittels Labormixer (Stomacher)
- Kultivierung auf CASO und Wismut-Sulfit-Agar
- DNA-Extraktion nach Pitcher et al., 1989



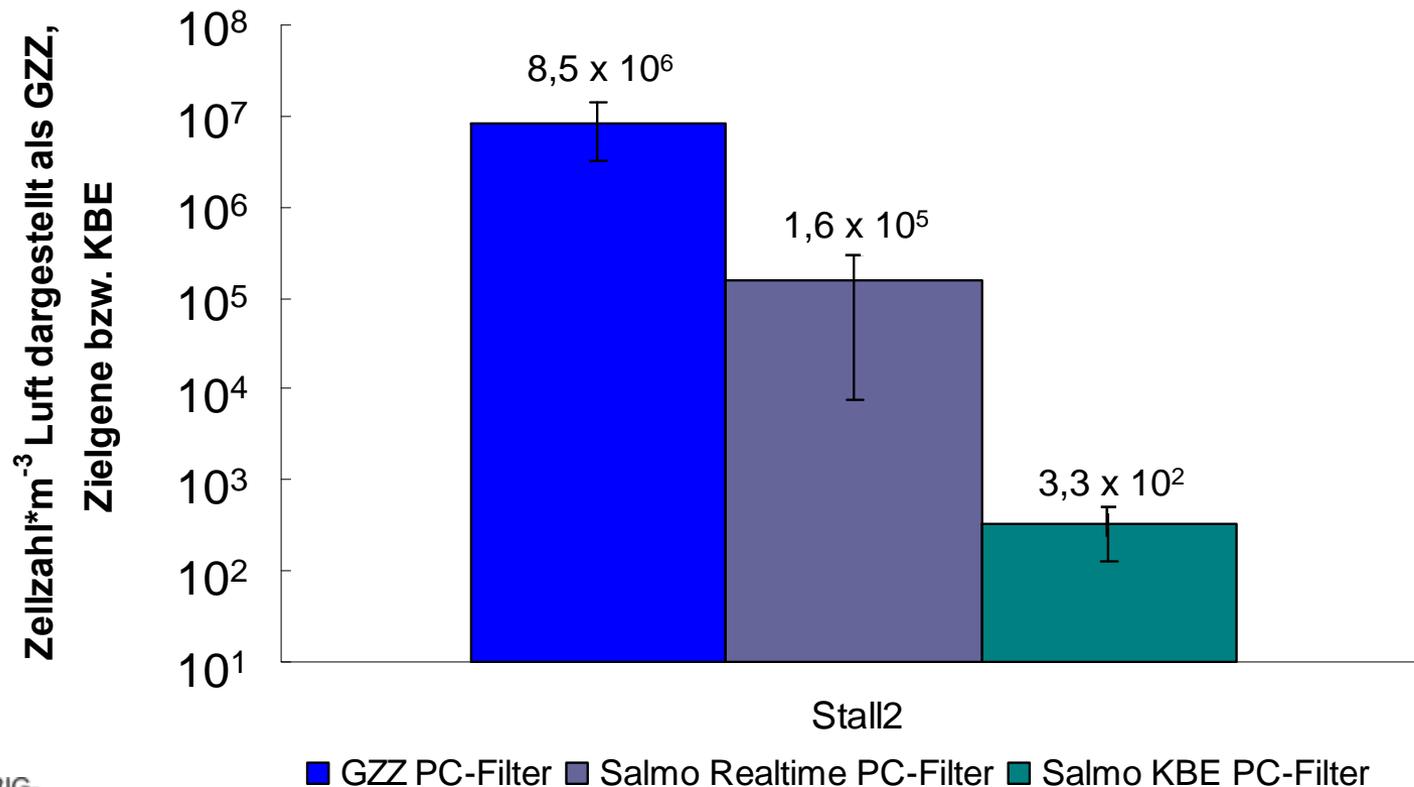
Masthähnchenstall:

- Je ~ 26.000 Tiere in zwei Ställen
- Zum Probenahmezeitpunkt Tiere 29 Tage alt
- Ein Stall laut Schlachthofvoruntersuchung *Salmonella* positiv, der andere nicht
- Nebelungsanlage in einem Stallabteil installiert, die in 15minütigem Abstand bakterizide ätherische Öle versprüht



Erprobung des entwickelten Protokolls

- Die GZZ lag je nach Sammelmethode bei 10^5 bis 10^7 Zellen m^{-3} Luft
- Sowohl mittels Kultivierung auf Wismut-Sulfit-Agar als auch mittels *Realtime PCR* wurden Salmonellen nachgewiesen



Zusammenfassung

- Verwendung des *Realtime PCR Kits* bietet Zeitersparnis bei guter Reproduzierbarkeit
- Untersuchungen zu Hemmeffekten zeigten einen geringen Einfluss
- Solche Einflüsse können aber von Stall zu Stall unterschiedlich sein und sind bei der Auswertung entsprechend zu beachten
- Die Spezifität des Systems konnte anhand der Klonierungsergebnisse auch für komplexe Proben nachgewiesen werden
- Nach Etablierung der Methodik können Ergebnisse in kurzer Zeit erhalten werden (im Idealfall nach einem Tag)
- Generell zeigen die Ergebnisse die Eignung des Verfahrens zur Detektion von Salmonellen in Bioaerosolen
- Damit bietet die *Realtime PCR* prinzipiell das Potential zur Analyse von Mikroorganismen in Bioaerosolen



Danksagung!



Das Projekt wird gefördert durch die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA), Berlin

baua:
Bundesanstalt für Arbeitsschutz
und Arbeitsmedizin