

Umwelthygienische Mikrobiologie

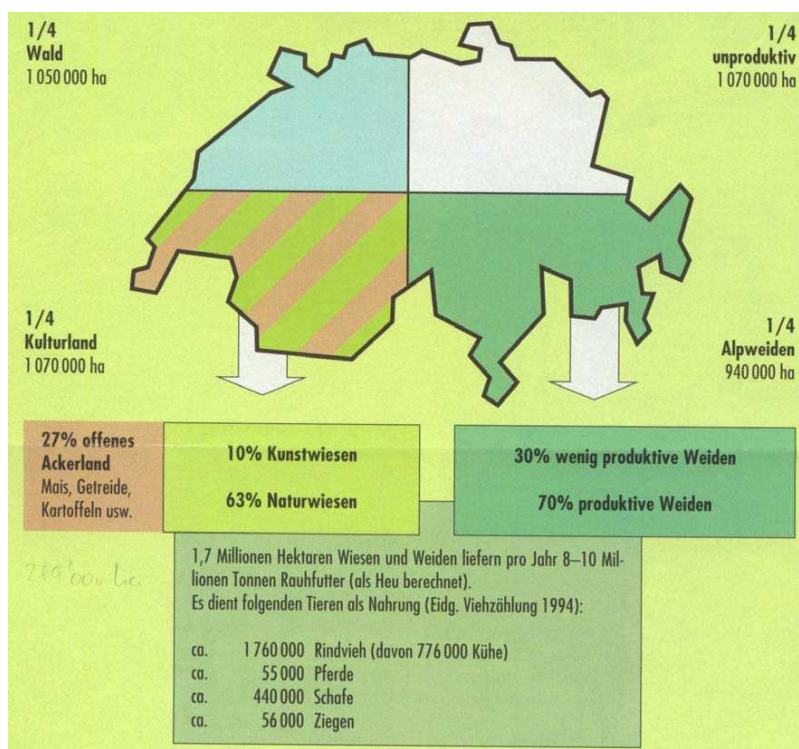
Landwirtschaftliche Ökologie und Infektionskrankheiten

Tierhaltung im Spannungsfeld der öffentlichen Gesundheit

1. Einleitung, Landwirtschaftliche Ökologie, Labortechniken
2. Geflügelgrippe und Entstehung von Pandemien
3. Globale Eradikation der Poliomyelitis auf der Zielgeraden
4. Tollwut erfolgreich bekämpft
5. SARS-CoV und Globalisierung
6. Anthrax und Bioterror
7. A la carte

Alfred Metzler
Virologisches Institut
Vetsuisse Fakultät
Universität Zürich

Die Schweiz – ein Grasland



Nutztierhaltung in der Schweiz:

3'000'000 ha LN

davon
300'000 ha Ackerland.

Rest
Wiesen und Weiden.

Das Grasland Schweiz ist besonders für die Haltung von Wiederkäuern geeignet, da diese zur Veredelung pflanzlicher Nährstoffe befähigt sind.

Die Landwirtschaft in der Kritik

Überdüngung der Gewässer mit Phosphat und Nitrat

Lachgas und Methan aus der Landwirtschaft sind klimawirksam

Salmonellen und Campylobacter in von Tieren stammenden Lebensmitteln

Tierische Abfälle im Tierfutter

Rinderwahnsinn aus der Metzgerei

Kontamination von Trinkwasserressourcen mit Pathogenen

- Fall 1: Norwalk-like Viren im Mineralwasser
- Fall 3: Enteroviren im Quellwasser einer Gemeinde in voralpiner Zone
- Fall 2: Cryptosporidien im Grundwasser einer mittelländischen Gemeinde

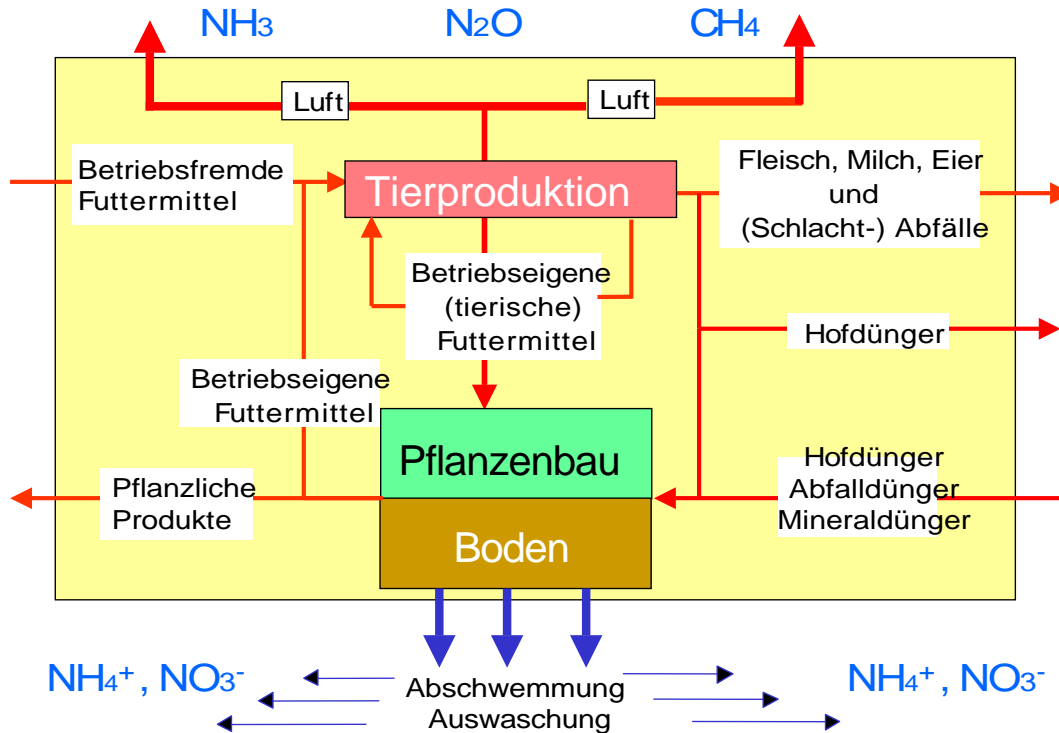
Landwirtschaft **ist** Senke und Quelle

Umgang mit erneuerbaren Ressourcen

Landwirtschaft wohin ???

- | | |
|---------------------|------------|
| • Tierische Abfälle | verbrennen |
| • Klärschlamm | verbrennen |
| • Kompost | verbrennen |
| • (Gen-) Futter | verbrennen |
| • Hofdünger | verbrennen |

Landwirtschaftliche Ökologie, Düngerhygiene



1995: > 1 Mio. t Milch und Getreide sowie 300'000 t Fleisch

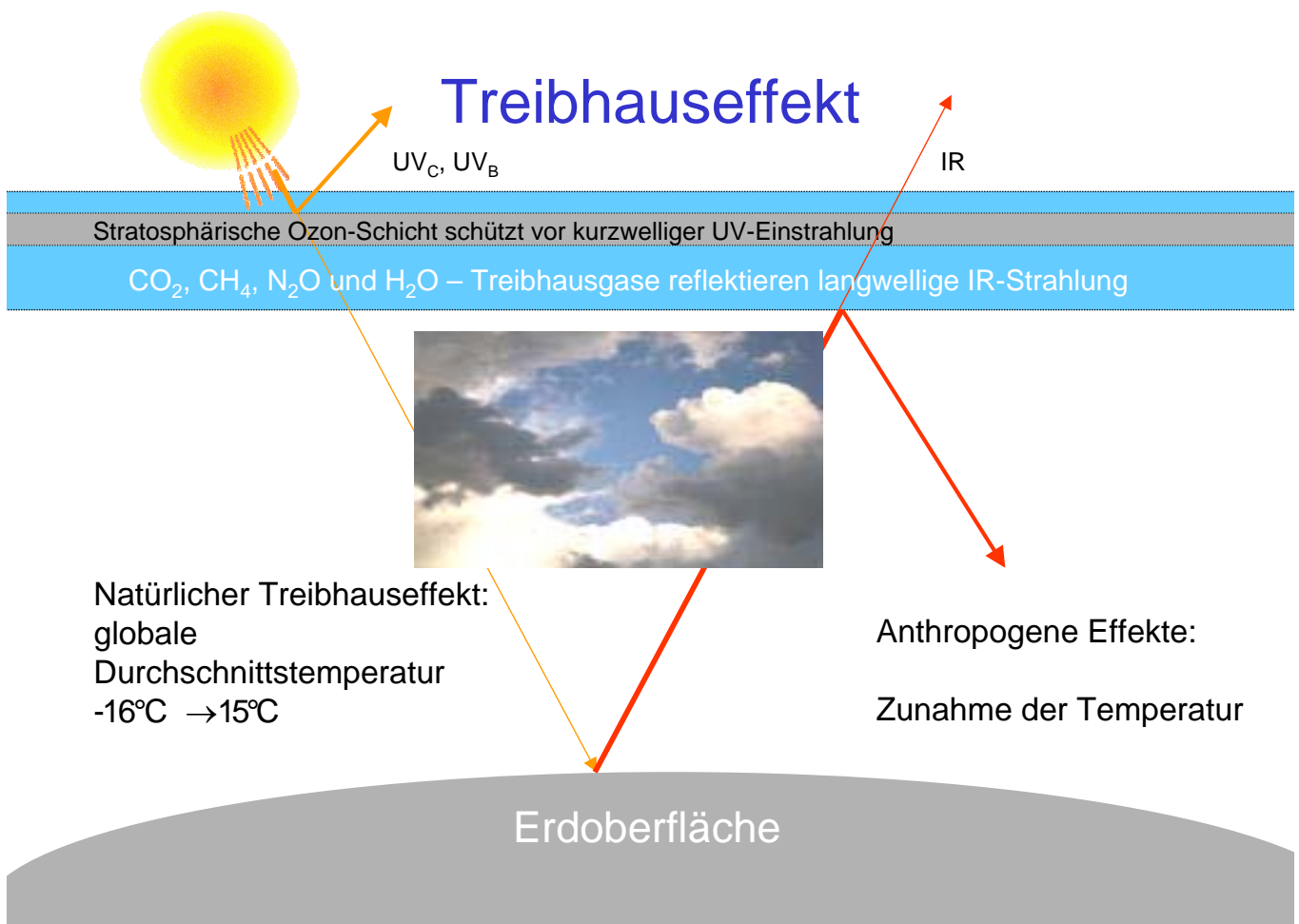
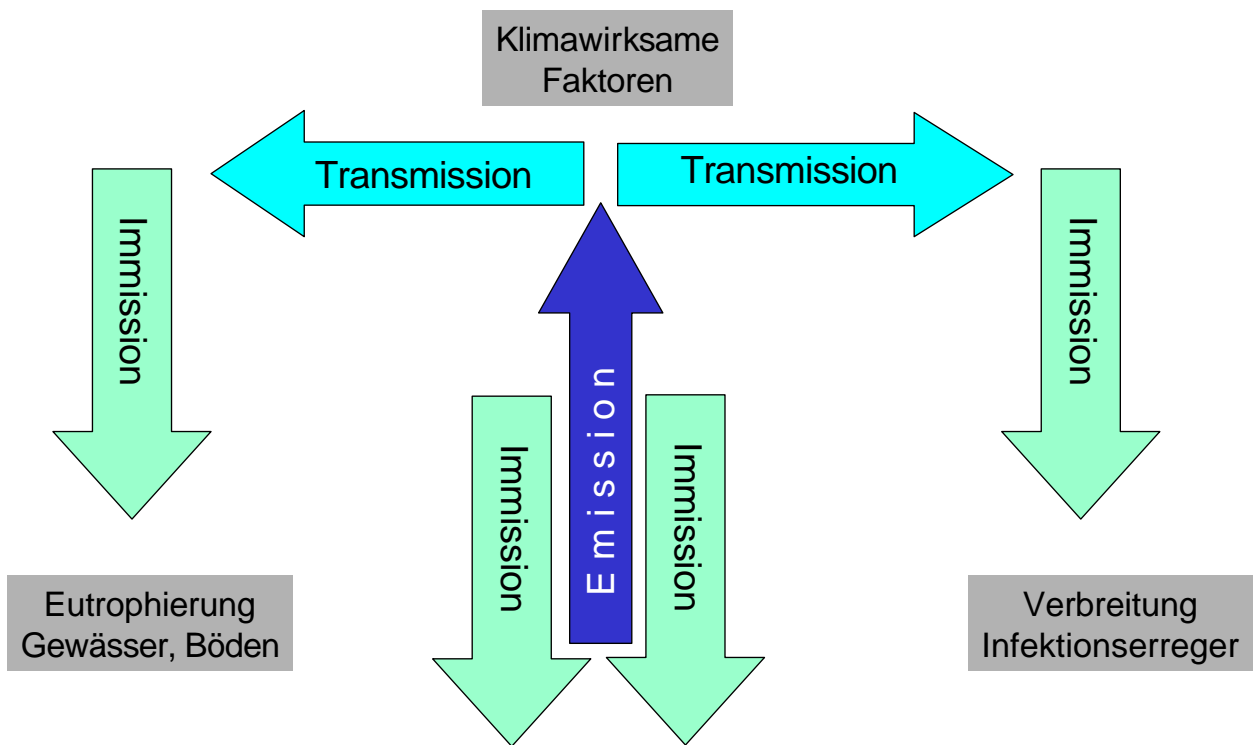


Zusammensetzung der Erdatmosphäre

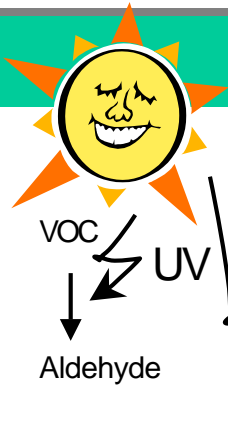
| Gas | Chemische Formel | Vorkommen (Volumen) |
|---------------|----------------------|---------------------|
| Stickstoff | N_2 | 78.08% |
| Sauerstoff | O_2 | 20.95% |
| Argon | Ar | 0.93 ppm |
| Wasserdampf | H_2O | Variabel ↑ |
| Kohlendioxid | CO_2 | 350 ppm ↑ |
| Neon | Ne | 18 ppm |
| Helium | He | 5 ppm |
| Ozon | O_3 | 0.03-10 ppm |
| Methan | CH_4 | 2 ppm ↑ |
| Krypton | Kr | 1 ppm |
| Wasserstoff | H_2 | 0.5 ppm |
| Lachgas | N_2O | 0.3 ppm ↑ |
| Kohlenmonoxid | CO | 0.05-0.2 ppm |
| Schwefelgase | SO_2 | < 0.01 ppm |

ppm, parts per million, mg/kg oder ml/m³

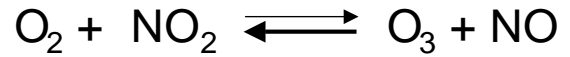
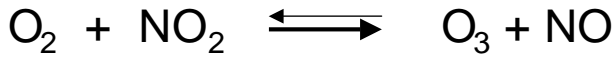
Landwirtschaftliche Ökologie



Ozon in bodennahen Luftschichten



VOC
↓
Aldehyde



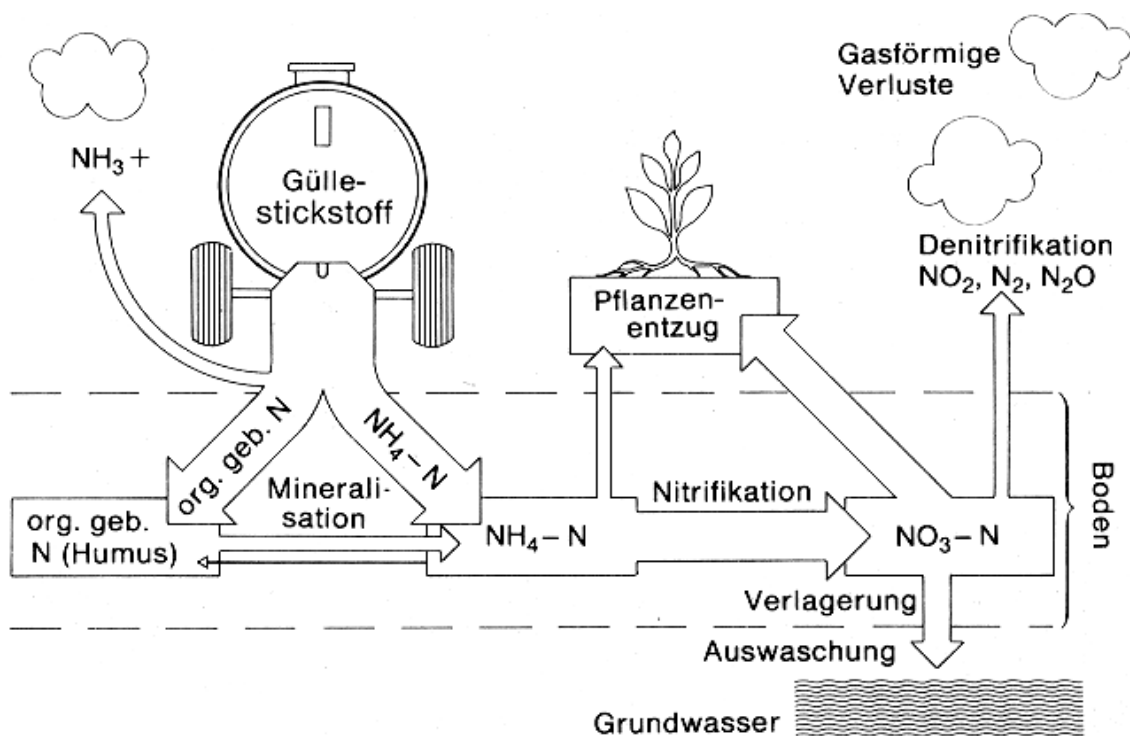
Auswirkungen von Ozon:

- Pflanzenkrankheiten (u.a. Pilzbefall)
- menschliche Gesundheit
- Tiergesundheit ?

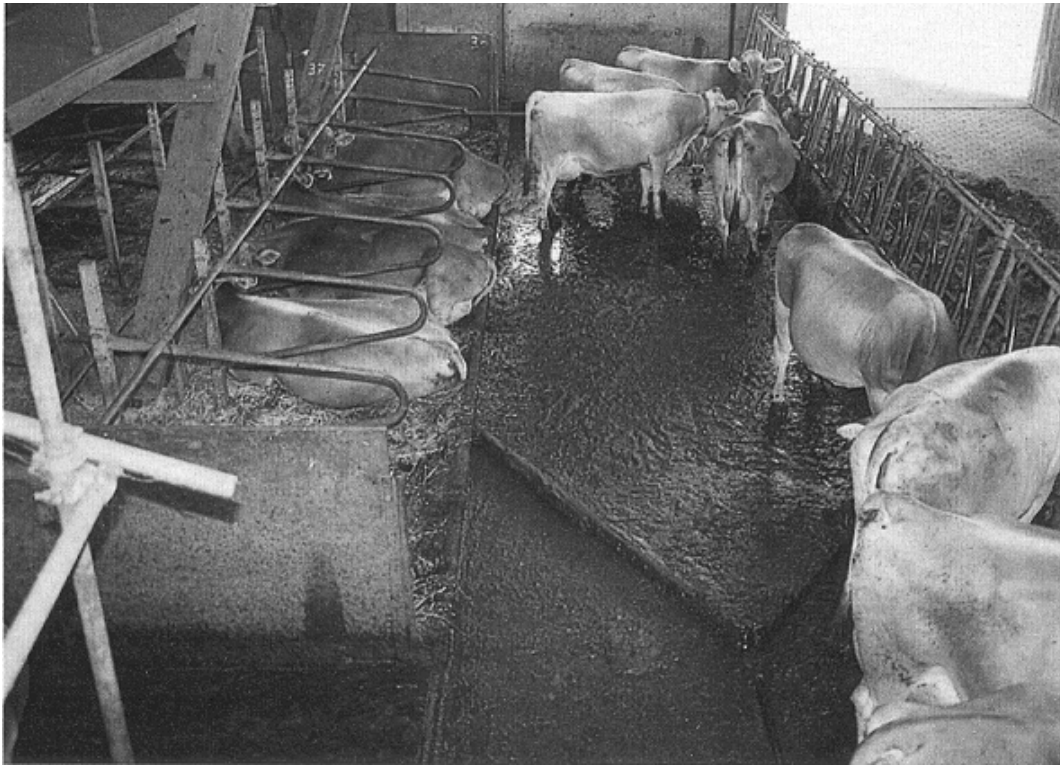
Photochemie



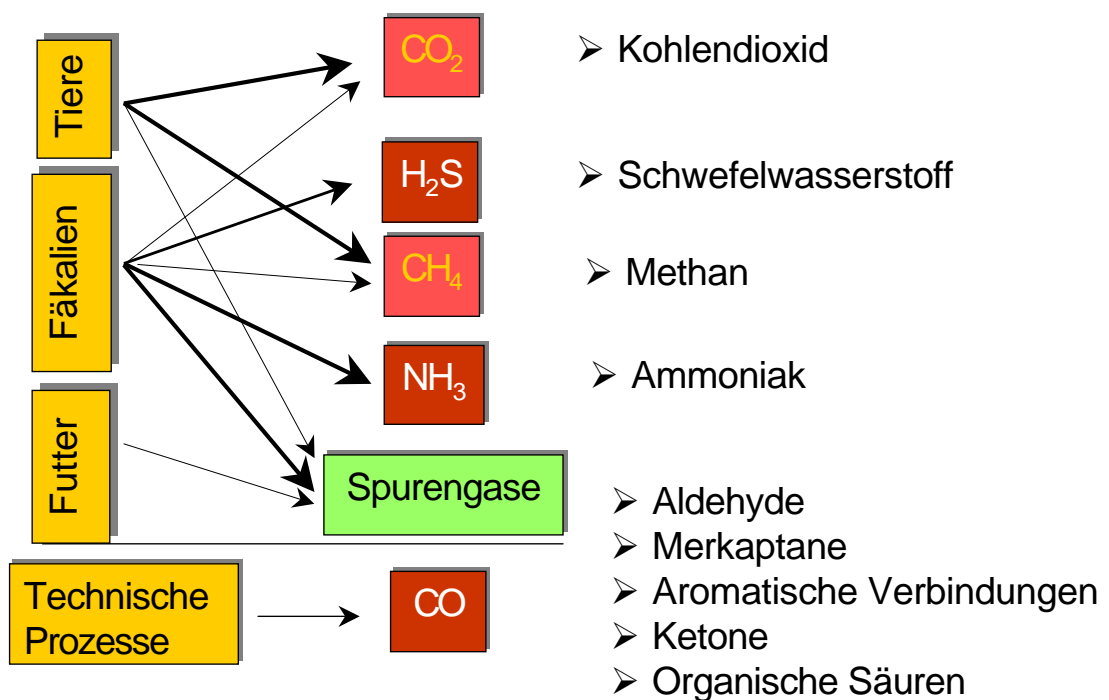
N-Kreislauf



Entmistung im Boxenlaufstall (Faltschieber)



Wichtige Schadgase in Stallluft



Schweinebestand in der Schweiz: Ballungszentren

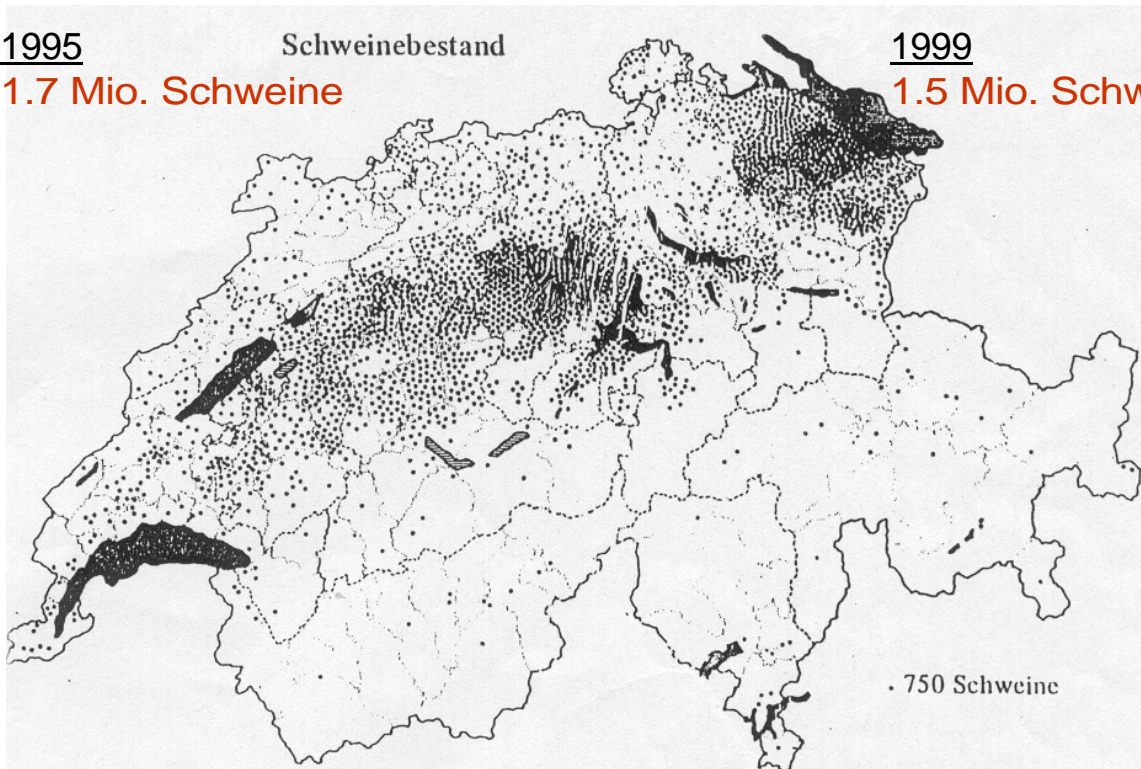
1995

1.7 Mio. Schweine

Schweinebestand

1999

1.5 Mio. Schweine



Rinderbestand in der Schweiz: Ballungsgebiete

1995

1.7 Mio. Rinder

0.4 Mio. Schafe

0.06 Mio. Ziegen

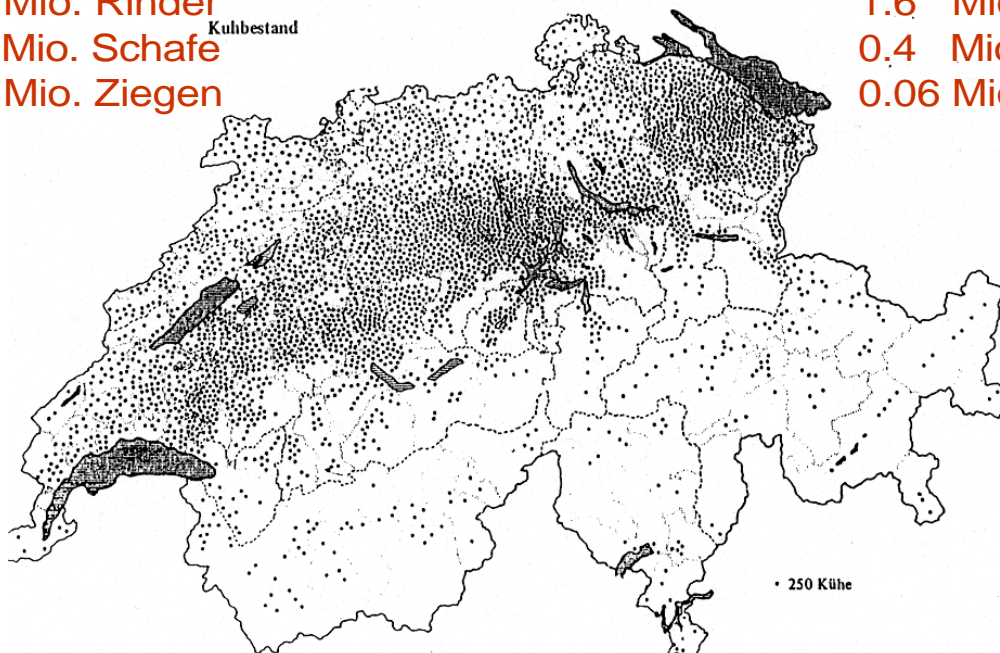
Kuhbestand

1999

1.6 Mio. Rinder

0.4 Mio. Schafe

0.06 Mio. Ziegen



Güllelagerung, Güllebehandlung

Vor- und Nachteile der anaeroben und aeroben Güllelagerung und Vergleich mit der Biogasproduktion

| Parameter | Anaerob (pH 6.2-6.6) | Aerob (pH 7.5-8.4) | Biogasproduktion (pH 7.2-7.9) |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Geruchsemission | erheblich | gering | fehlt |
| Schadgasemission | erheblich | gering | fehlt |
| Wasserverlust | 2% | 10% | >20% |
| TS-Verlust* | <5% | 10-15% | 30-40% |
| N-Verlust | 5-90% | 5-70% | 5-25% |
| Investitions- und Betriebskosten | gering | hoch | hoch, jedoch Biogas |
| Hygienisierung | nein | (nein) | nur sofern thermophil** |

* Ausmass der Mineralisation

**Thermophil, >55°C; mesophil, 35-45°C; psychrophil, 15-25°C

Sanierung Nährstoffbilanz

- Pflanzen- und umweltgerechter Einsatz
- Landzupacht, Düngerabnahmeverträge
- Phasenfütterung, Ökofutter (Phytase, Aminosäuren)
- Güllebehandlung: verdünnen, separieren
- Reduktion des Tierbestandes (<3 DGVE/ha LN)

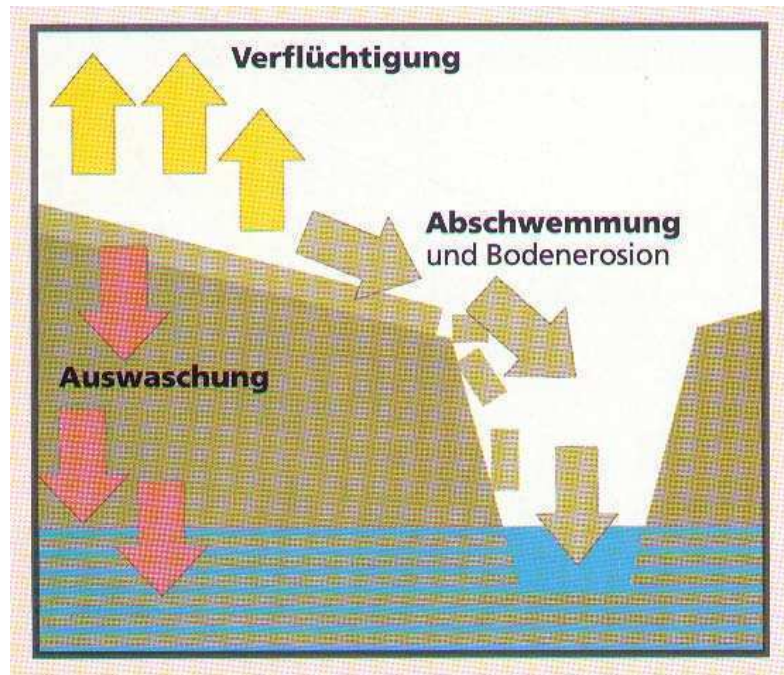
Maximaler Tierbesatz (GSchG)

| Produktionskataster | DGVE/ha LN (aktuell) | Richtwert für das Jahr 2006 |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Ackerbau und Übergangszone | 3.0 | 2.5 |
| Voralpine Hügellzone | 2.5 | 2.1 |
| Bergzone 1 | 2.1 | 1.8 |
| Bergzone 2 | 1.8 | 1.4 |
| Bergzone 3 | 1.6 | 1.2 |
| Bergzone 4 | 1.4 | 1.1 |

Düngerichtlinien

Keine Düngung
wenn Nutzfläche

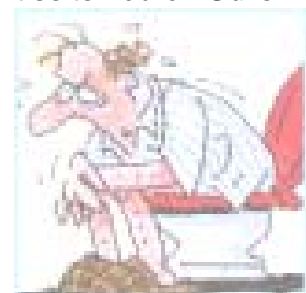
- gefroren
 - schneebedeckt
 - durchnässt
 - ausgetrocknet
 - unbewachsen
 - verdichtet
 - in Hanglagen
- bei
- starkem Regen
 - Schneeschmelze
 - heissem Wetter
 - starkem Wind



Trinkwasserunfälle in Industrieländern

| Jahr | Ort | Krankheit, Erreger (Ursache) | Erkrankungs-Fälle (Todesfälle) |
|------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 2001 | Murcia, SP | Legionellose | 315 (2) |
| 2000 | Walkerton, CAN | EHEC (Rindergülle) | 2'000 |
| 1998 | La Neuveville, CH | Shigellose, NLV (Abwasser) | 1'600 |
| 1993 | Milwaukee, USA | Cryptosporidium parvum (Abwasser) | 403'000 (>100) |
| 1980 | Ismaning, DE | Shigellose (Abwasser) | 2'450 |
| 1963 | Zermatt, CH | Typhus (Abwasser) | 437 |

In ländlichen Gegenden der Schweiz werden Trinkwassernetze nicht selten durch Gülle verunreinigt.



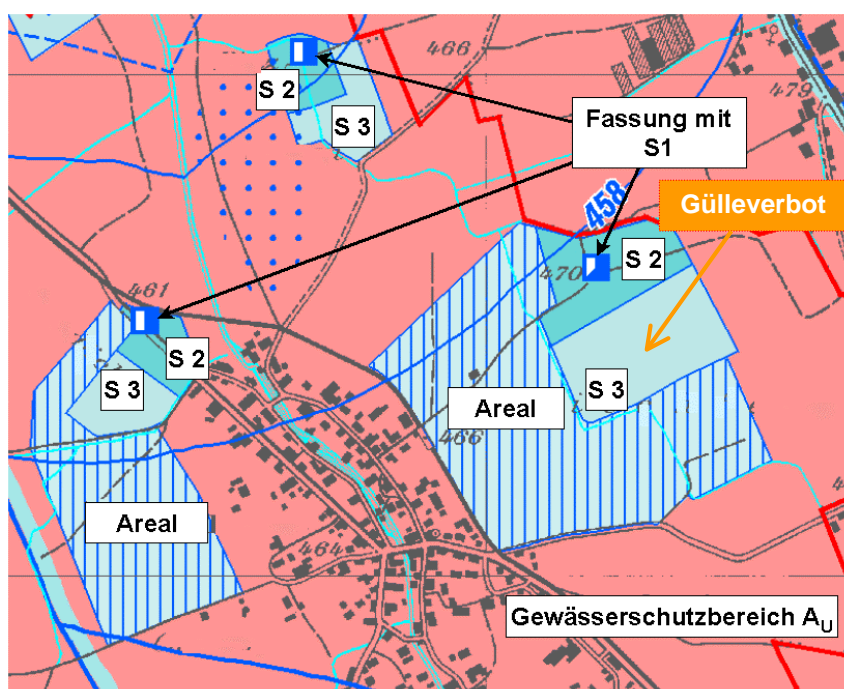
Mikrobiologische Befunde bei Trink- und Rohwasser: Jahresbericht Kant. Labor BL, 2001

| Probenart | Anzahl Proben | Beanstandungen | in % |
|--------------|---------------|----------------|-----------|
| Trinkwasser | 2562 | 213 | 8.3 |
| Rohwasser | 938 | (444) | (47.3) |
| Total | 3500 | 657 | -- |

| Probenart | Anzahl Proben | Beanstandungen | in % |
|--------------|---------------|----------------|------------|
| Quellwasser | 464 | 73 | 15.7 |
| Grundwasser | 979 | 34 | 3.5 |
| Netzwasser | 1119 | 106 | 9.5 |
| Total | 2562 | 213 | 8.3 |

Salmonellen im Trinkwasser

Keine Fiktion



Einem Tierhalter wird ein Gülleverbot in der Gewässerschutzzone 3 (S3) in Aussicht gestellt. Der Tierhalter wendet sich an das zuständige Veterinäramt und bittet um Unterstützung bei der Abwehr dieses Verbotes.

Sie sind KT und sollen den Tierhalter beraten.

Vorgehen: Erarbeiten eines sachdienlichen Fragenkatalogs, Studium von Fachinformationen und ausarbeiten eines Gutachtens zuhanden der Behörden.

Kann das Verbot abgewendet und das Problem gegebenenfalls längerfristig gelöst werden?

Verwertung biogener Abfälle bis 2000

Abfälle aus der Lebensmittelindustrie und deren Verwertung in der Schweineproduktion (Angaben in 1'000 t)

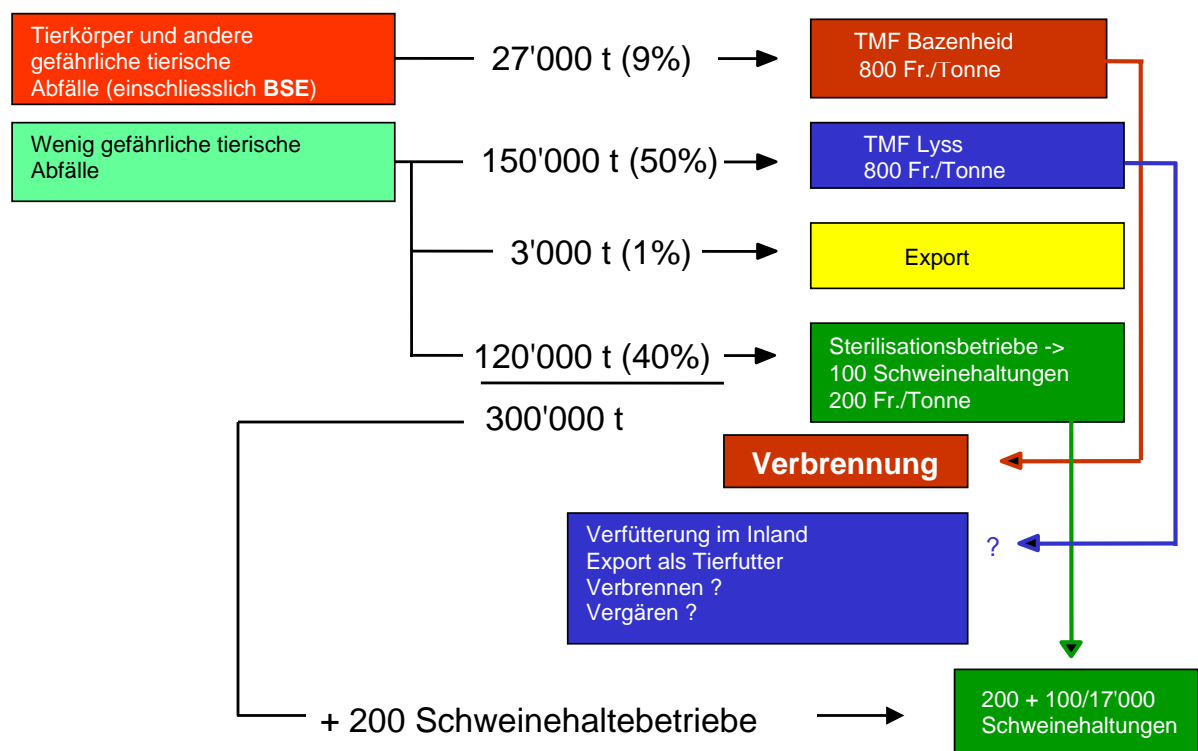
| Bioabfall | Jährliche Menge | An Schweine verfüttert |
|-------------------------|---------------------|------------------------|
| Milchnebenprodukte | 1'685 | 1'509 |
| Ölkuchen/Schrote | 100 | 66 |
| Schlachtabfälle* | 273 | 129 ↓ |
| Müllereiprodukte | 175 | - |
| Teigwarenabfälle | 4 | 4 |
| Bäckereiabfälle | 10 | 10 |
| Biskuitabfälle | 1 | 1 |
| Küchenabfälle | 175 | 130 |
| Schokoladefabrikation | 3 | 0.3 |
| Kaffeenebenprodukte | 2 | - |
| Brauereien | 88 | 44 |
| Zuckerherstellung | 260 | 70 |
| Obstverarbeitung | 60 | 10 |
| Kartoffelverarbeitung | 350 | 25 |
| Gemüseabfälle | 30 | 30 |
| T o t a l | 3'243 (100%) | 1'962.3 (60.5%) |

*Im Wesentlichen handelt es sich um Fleischabfälle, in geringem Umfang um Schlachtnebenprodukte und punktuell um Stoffwechselprodukte.

↓ Prionen in Risikoorgane von Schlachttieren

Verwertungswege tierischer Abfälle bis 2000

Entsorgung vs. Verwertung tierischer Abfälle: 300'000 t/a



Landwirtschaftliche Ökologie

Zusammenfassung

Positiv: Wertvoller Pflanzennährstoff

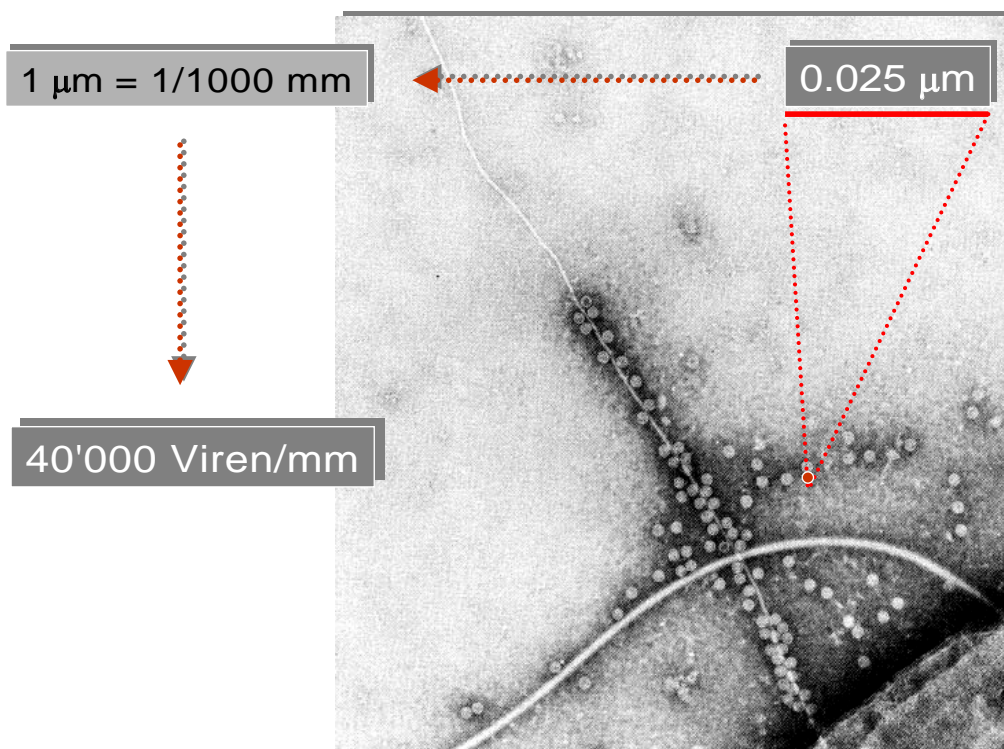
Negativ: ökologisch unliebsame Emissionen in Oberflächen und Grundwasser sowie in die Atmosphäre

ökonomische Konsequenzen in Form von Lagerkapazität und technischen Einrichtungen

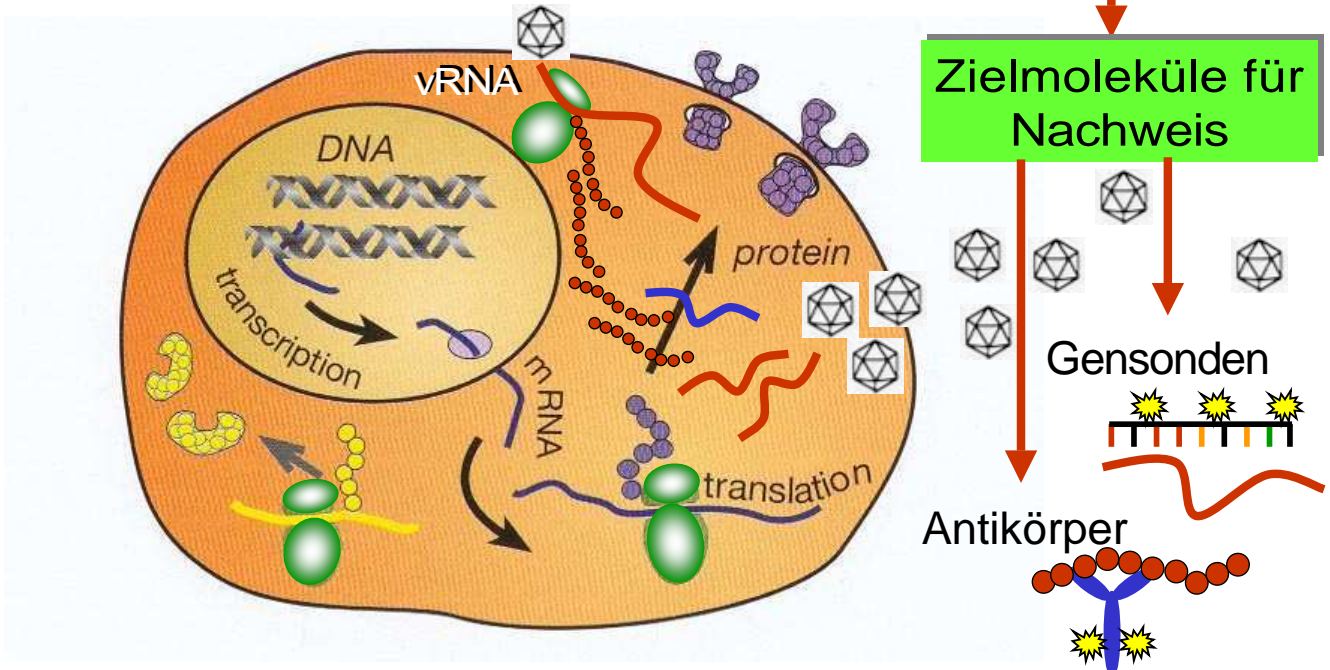
seuchenhygienische Bedenken*

* Auch in der Schweiz werden immer wieder Pathogene in Trinkwasser-Ressourcen festgestellt: Entero-, Rota- und Norwalk-like Viren, Cryptosporidien, Giardia, *E. coli* und Salmonellen. Häufig sieht sich die Landwirtschaft als Verursacher bezichtigt.

Bakteriophage M2 von *E. coli*



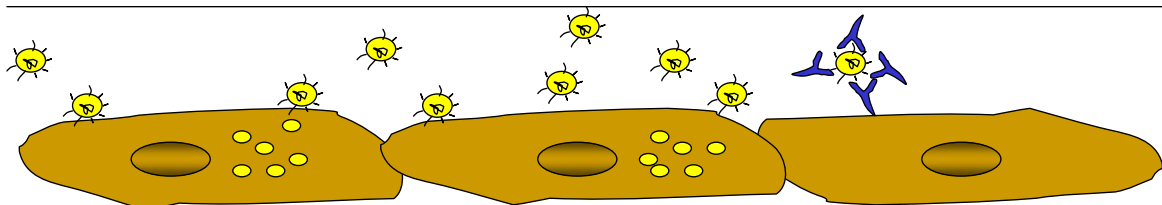
Zellen und Viren: Eiweisse und Nukleinsäuren



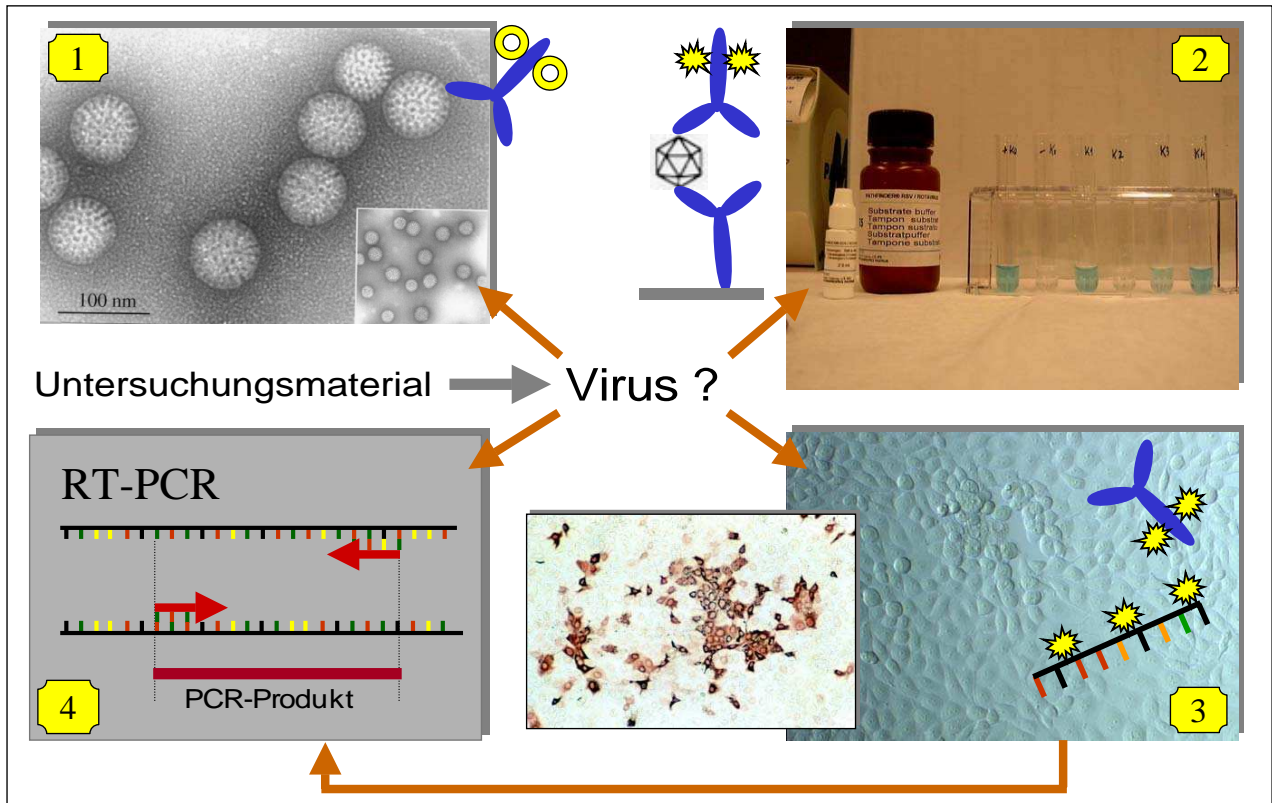
Direkter Virusnachweis

Grundlegende Viruseigenschaften, die für den direkten Virusnachweis geeignet sind

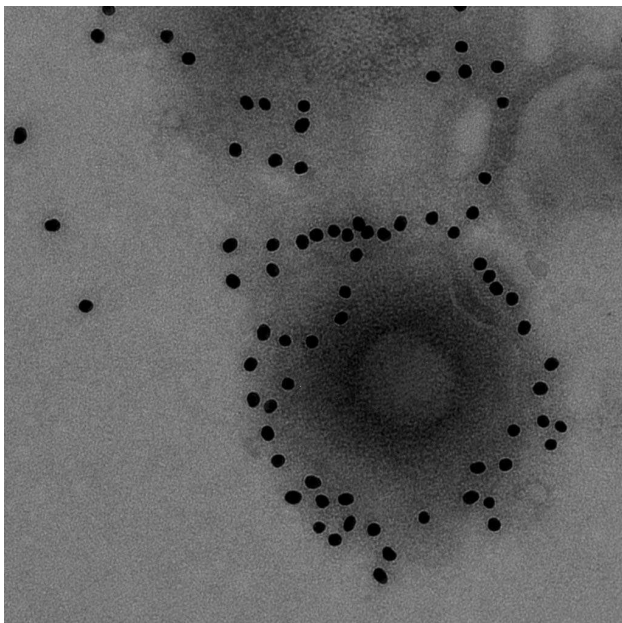
| Eigenschaft | Nachweisverfahren |
|------------------------------------|--|
| 1. Struktur, Form und Grösse | Elektronenmikroskop |
| 2. Infektiosität (Rezeptorbindung) | Zellkultur (Hämagglutination) |
| 3. Antigenität | Serologie |
| 4. Genomaufbau, Gensequenzen | Restriktionsenzyme, Gensonden, (RT-) PCR |



Virale Kardinaleigenschaften



Antigen-Markierung mit "vergoldeten" Antikörpern



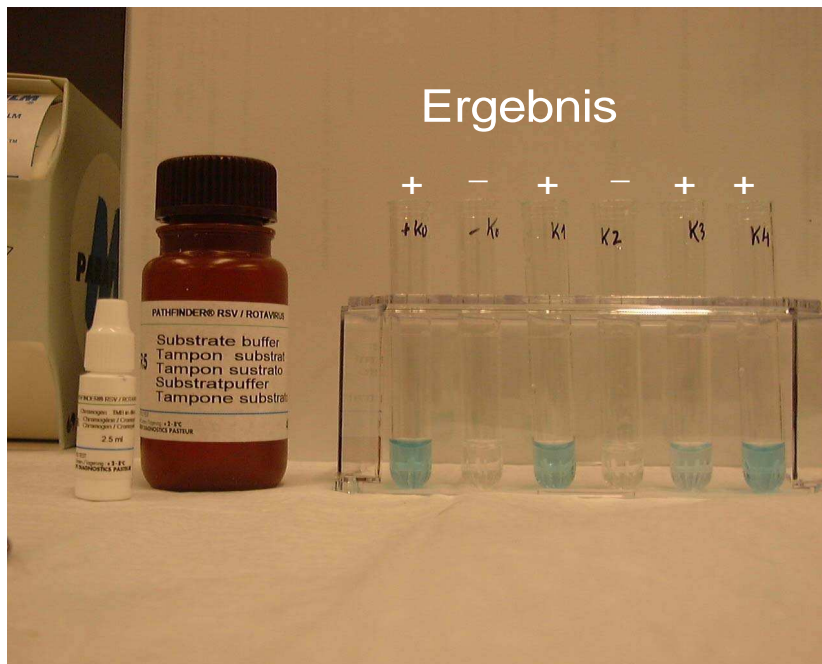
Virus

BHV1 = Bovines Herpesvirus 1:
Erreger der IBR und der IPV
(Infektiöse bovine Rhinotracheitis,
Infektiöse pustulöse Vulvovaginitis)

Vorgehen:

- Virus-spezifische Ak (Rind)
- Goldmarkiertes Kaninchen-anti-Rind IgG
- Zusätzlich Negativkontrastierung.

Rotavirusnachweis mit kommerziellem Testkit: ELISA

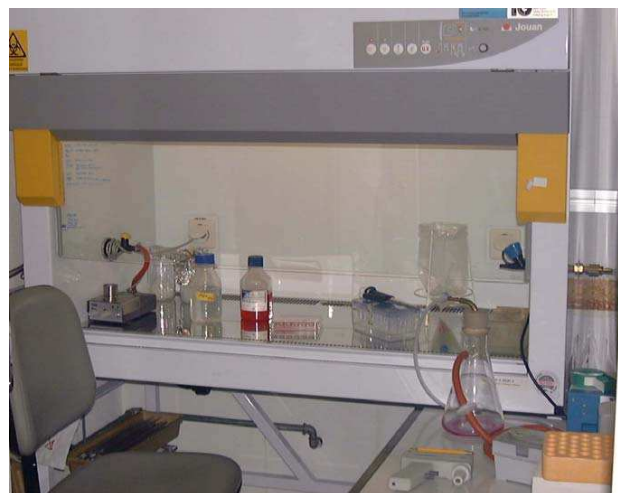


Teströhrchen werden mit polyklonalen Virus-spezifischen Ak beschichtet geliefert. Weiteres Vorgehen:

- + Ko: Kontrollantigen
- - Ko: Puffer
- Kotproben 1-4: Puffer und zusätzlich eine geringe Kotmenge
- Peroxidase-markierter mAk; mischen
- 1 Stunde inkubieren
- 5 x waschen (dH₂O)
- Substrat zugeben

8

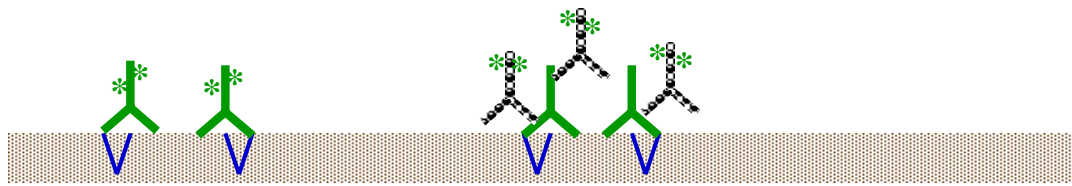
Zellkulturen ?



Eine erfolgreiche Virusisolierung in Zellkulturen bietet gute Grundlage für die weitergehende Charakterisierung von Pathogenen.

9

Immunhistochemie (IF, EIA)

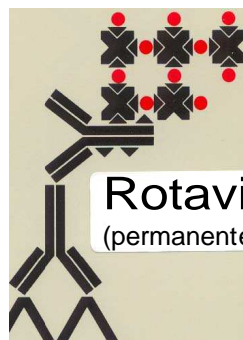
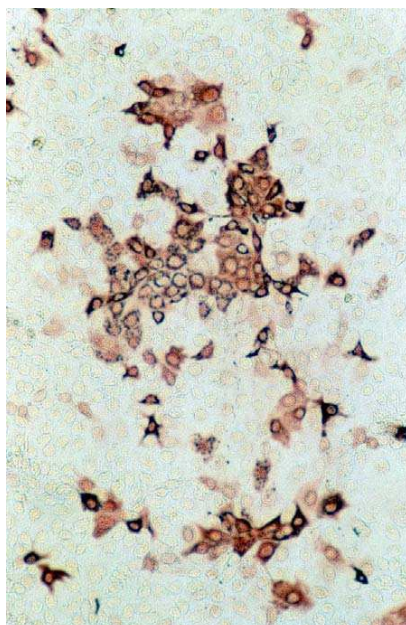


direkt <- Test -> indirekt

| | | |
|--------------------|--|--|
| | | Gewebeschnitt, Abklatschpräparat, Zellkultur |
| | | Virusantigen |
| Primärantikörper | | markierter, antigenspezifischer Antikörper |
| Primärantikörper | | nicht-markierter, antigenspezifischer Antikörper |
| Sekundärantikörper | | markierter Antispeziesantikörper |

16

Immunhistochemischer Virusnachweis



Merke: **Präzipitat** ausschliesslich intrazytoplasmatisch

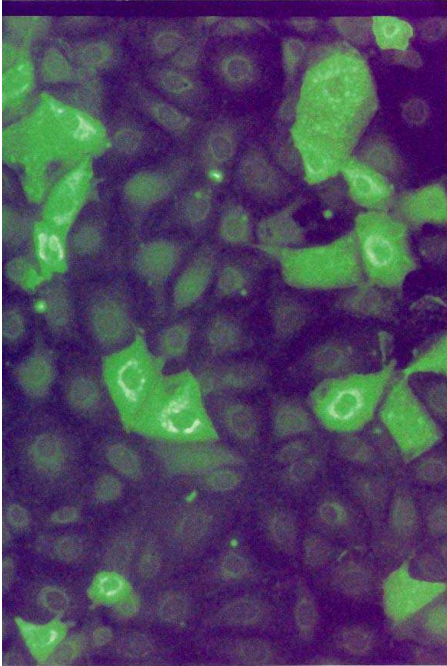
Rotavirus in MA104-Zellen (permanente Affenieren-Zelllinie)

Fixation der Zellen mit Methanol/Azeton

- Inkubation mit 1% Gelatine in PBS
- Inkubation mit viruspezifischem Primärantikörper (hier Kaninchenimmenserum)
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Antispeziesantikörper, hier Ziege-anti-Kaninchen)
- Inkubation mit Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplex
- Inkubation mit Chloronaphthol-Substrat -> Präzipitat.

18

Fluoreszenzserologischer Virusnachweis



- Fixation der Zellkultur mit Methanol/ Azeton
- Inkubation mit Primärantikörper (hier Kaninchenimmenserum)
- Inkubation mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (hier Ziege-anti-Kaninchen)
- Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop.

Beachte intrazytoplasmatische und intranukleäre Fluoreszenz mit Betonung im Kernwandbereich (charakteristisch bei Herpesviren).

17

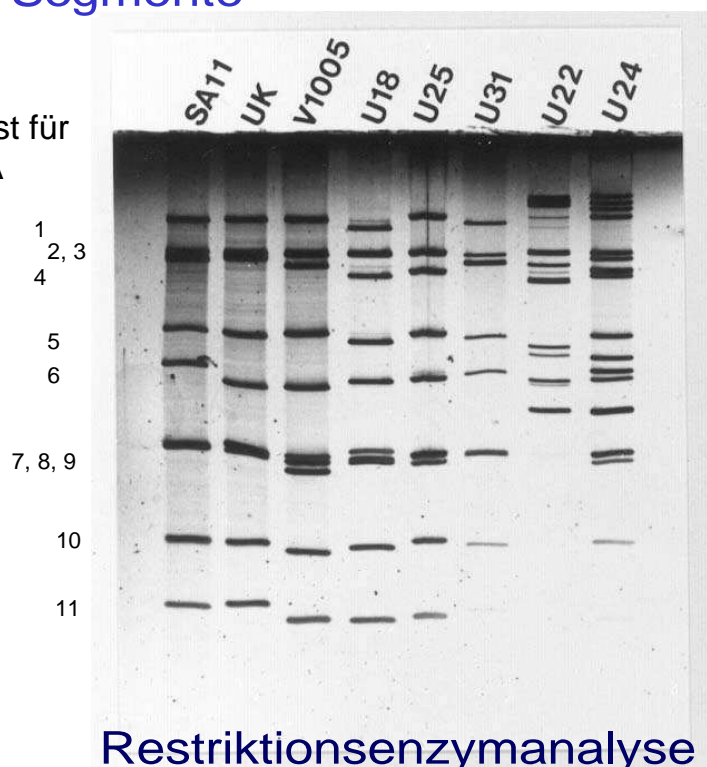
Genomanalyse

Rotaviren: 11 dsRNS-Segmente

Das Bandenmuster 4, 2, 3, 2 ist für Rotaviren der Antigengruppe A charakteristisch

Frage:
Was ist bei U22 und U24 los?

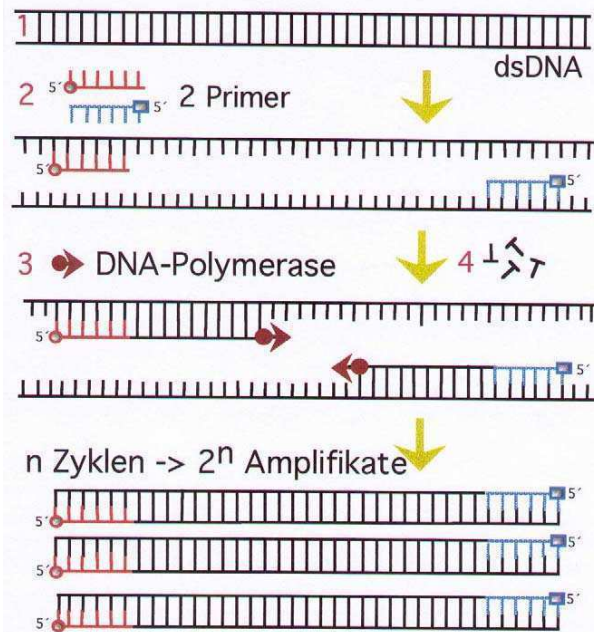
Antwort:
Findet sich auf nächstem Bild



27

(RT-) PCR

Polymerase-Kettenreaktion, PCR



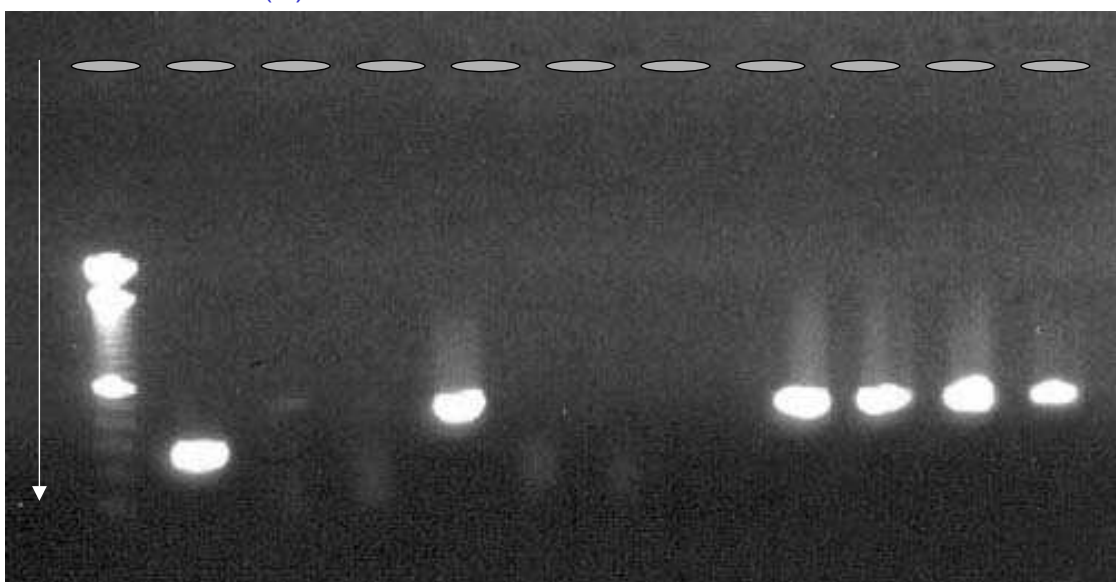
- Target DNA (oder RNA)
- RT-Primer (antisense, random, polyT)
- Reverse Transkriptase = RNA-abhängige DNA-Polymerase
- dNTP's
- Puffer, einschliesslich MgCl₂
- PCR-Primer (sense und antisense)
- DNA Polymerase

23

Rotavirus RT-PCR aus Kotproben

RT-PCR mit Gemisch von G6-, G8- und G10-spezifischen Primern und einem gemeinsamen Primer: → ← ← ← Virus-RNA

| | +Ko | K1 | K2 | K3 | K4 | K5 | K6 | K7 | K8 | K9 | K10 |
|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | G8 | G6 | | G6 | | | | G6 | G6 | G6 | G6 |
| MWM | ++ | (+) | - | ++ | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ |

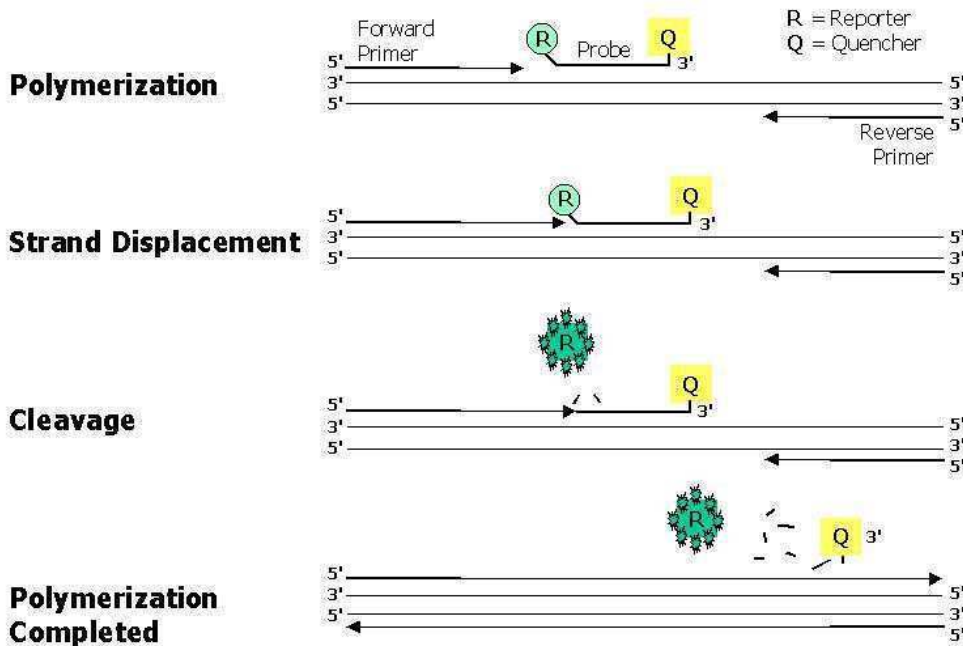


Sample Wells

24

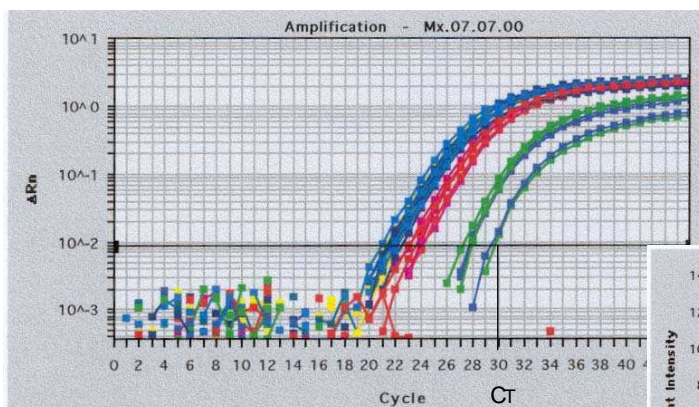
Quantitative Real-Time PCR

Fluorogenic 5' to 3' Nuclease Chemistry



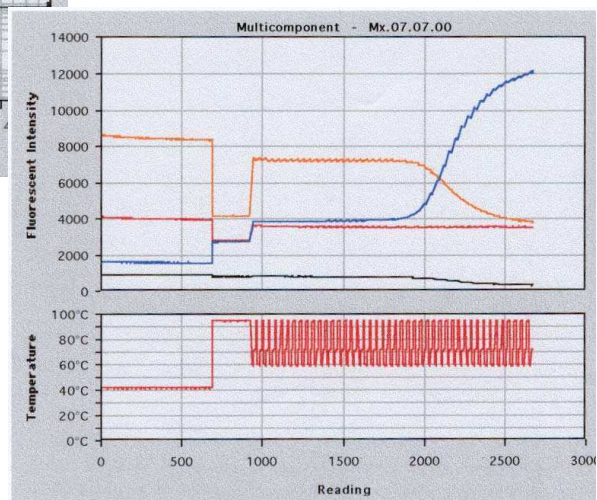
25

Praxis der quant. (RT-) PCR



CT-Wert = Mass für die Anzahl Templates: (RNA) DNA-Kopien

Temperaturprofil in einem Thermocycler für RT und PCR:
 42°C → RT (AMV-RT)
 94°C → Denaturierung RT und Aktivierung Taq Polymerase
 45x (59°C, 72°C, 94°C) während je 30 sec → Annealing/Extension/Denaturierung.



26