

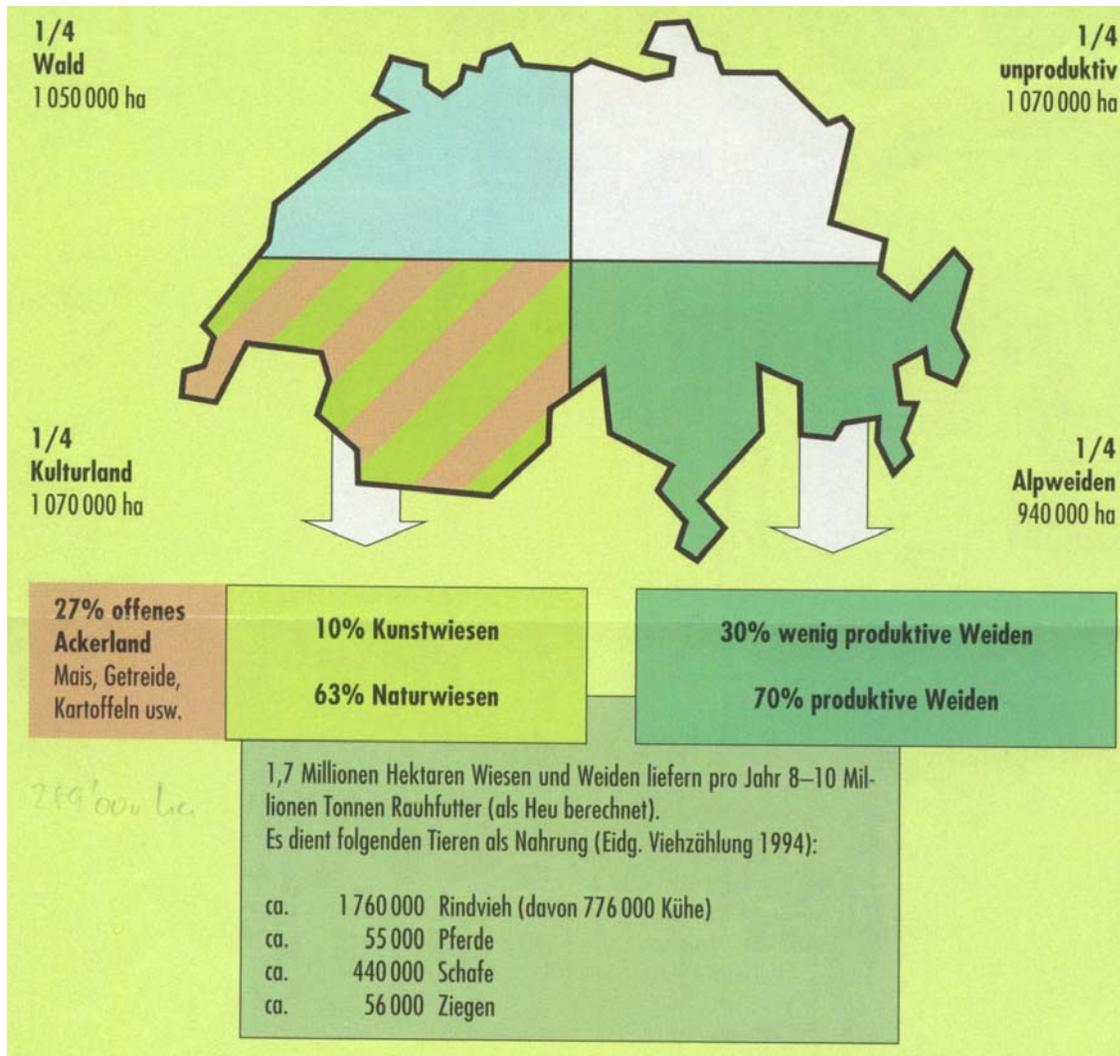
Umwelthygienische Mikrobiologie

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

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

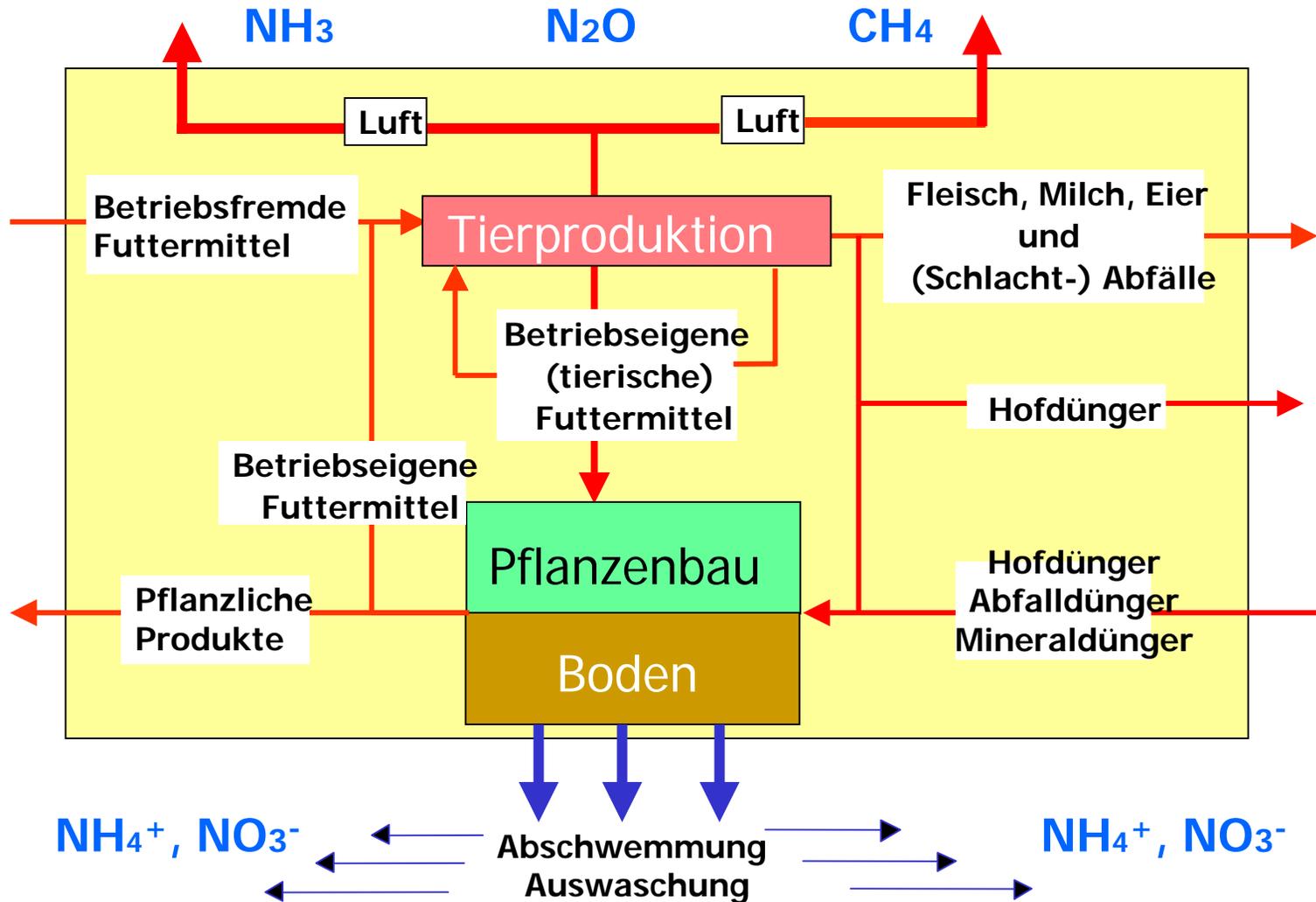
Landwirtschaft **ist** Senke und Quelle

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

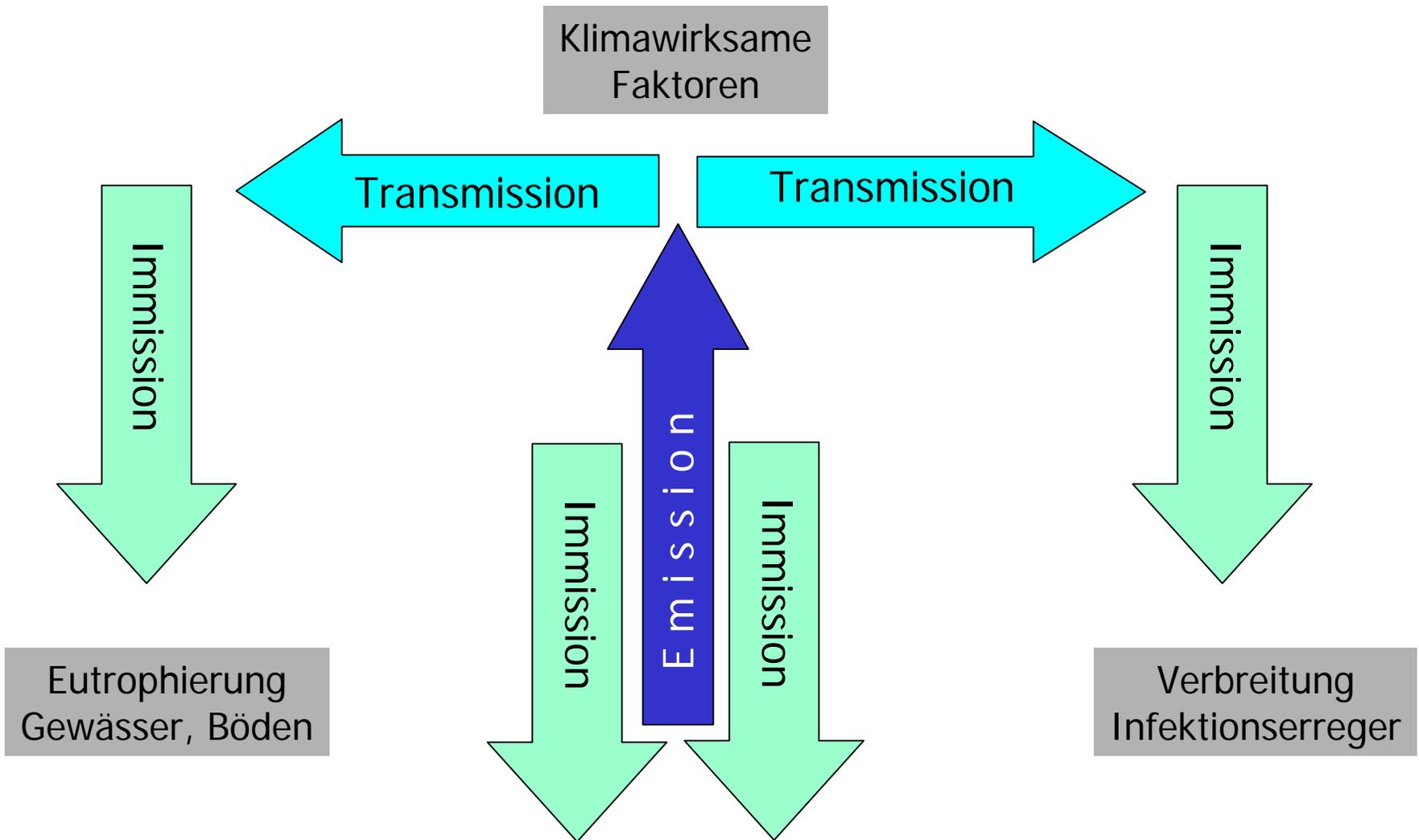


Zusammensetzung der Erdatmosphäre

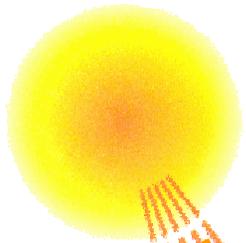
Gas	Chemische Formel	Vorkommen (Volumen)
Stickstoff	N_2	78.08%
Sauerstoff	O_2	20.95%
Argon	Ar	0.93 ppm
<i>Wasserdampf</i>	<i>H_2O</i>	<i>Variabel ↑</i>
<i>Kohlendioxid</i>	<i>CO_2</i>	<i>350 ppm ↑</i>
Neon	Ne	18 ppm
Helium	He	5 ppm
Ozon	O_3	0.03-10 ppm
<i>Methan</i>	<i>CH_4</i>	<i>2 ppm ↑</i>
Krypton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

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

Landwirtschaftliche Ökologie



Treibhauseffekt



UV_C, UV_B

Stratosphärische Ozon-Schicht schützt vor kurzwelliger UV-Einstrahlung

CO₂, CH₄, N₂O und H₂O – Treibhausgase reflektieren langwellige IR-Strahlung

IR



Natürlicher Treibhauseffekt:
globale
Durchschnittstemperatur
-16°C → 15°C

Anthropogene Effekte:
Zunahme der Temperatur

Erdoberfläche

Ozon in bodennahen Luftschichten



VOC
Aldehyde
UV



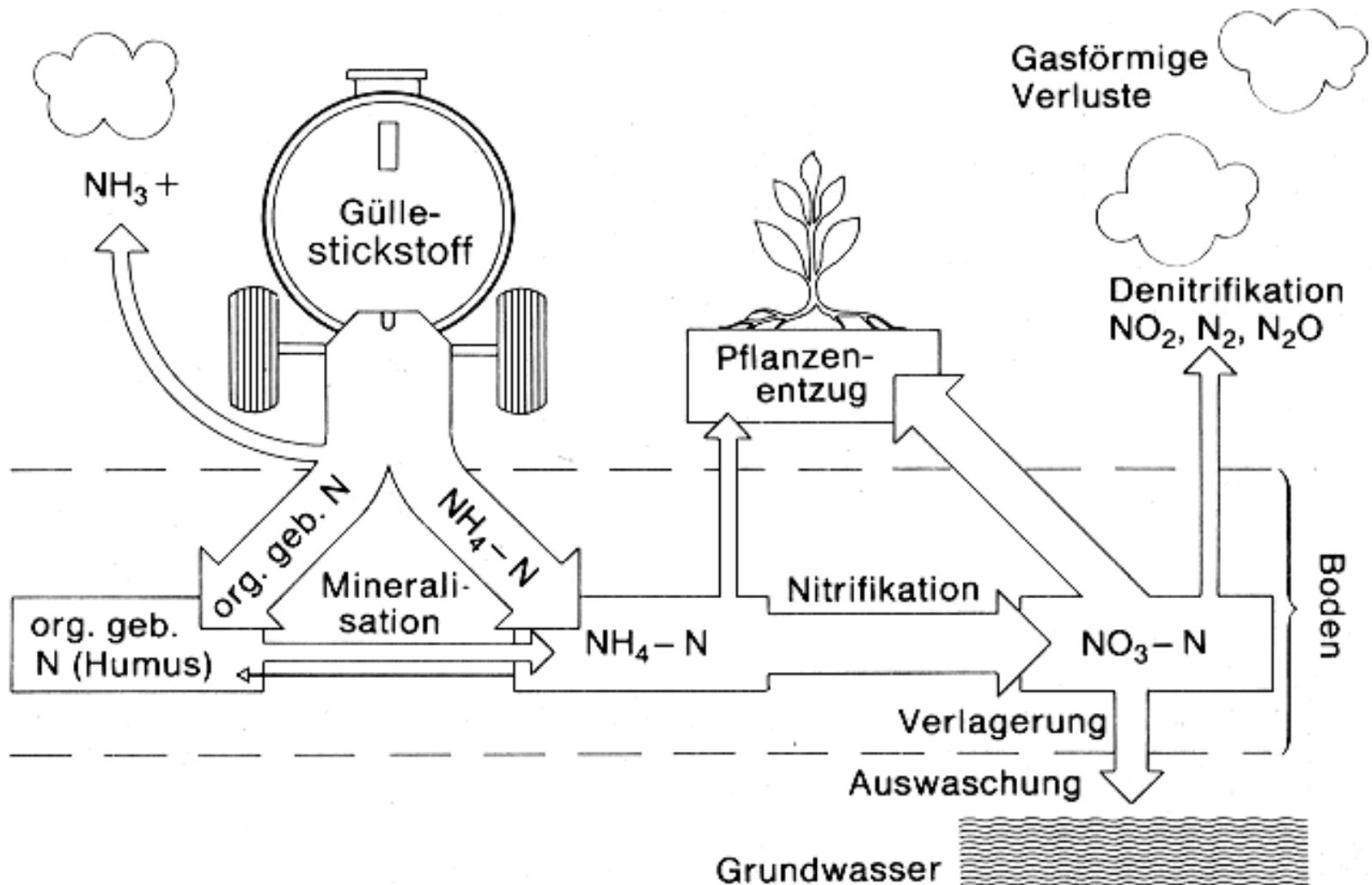
Auswirkungen von Ozon:

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

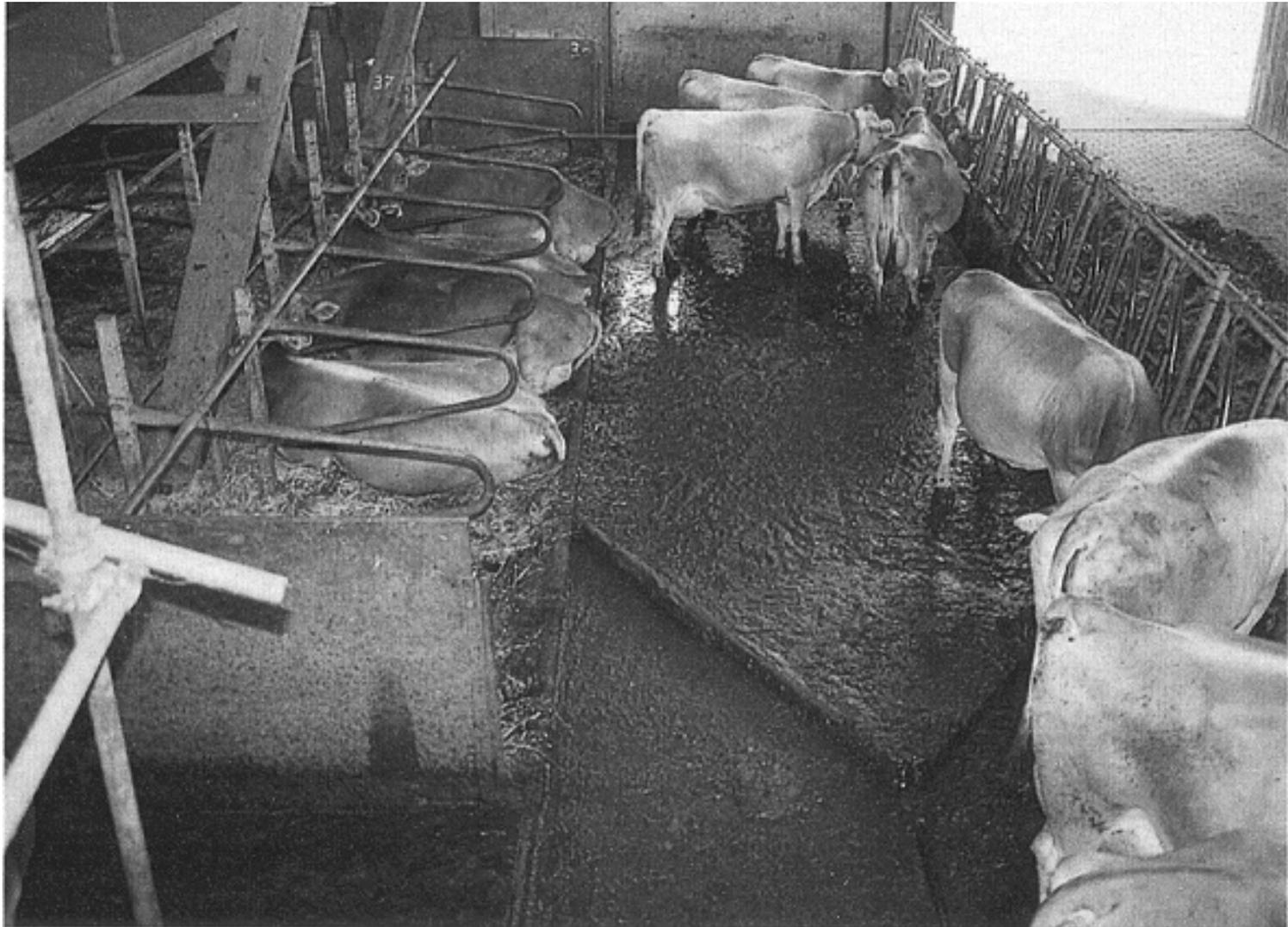
Photochemie



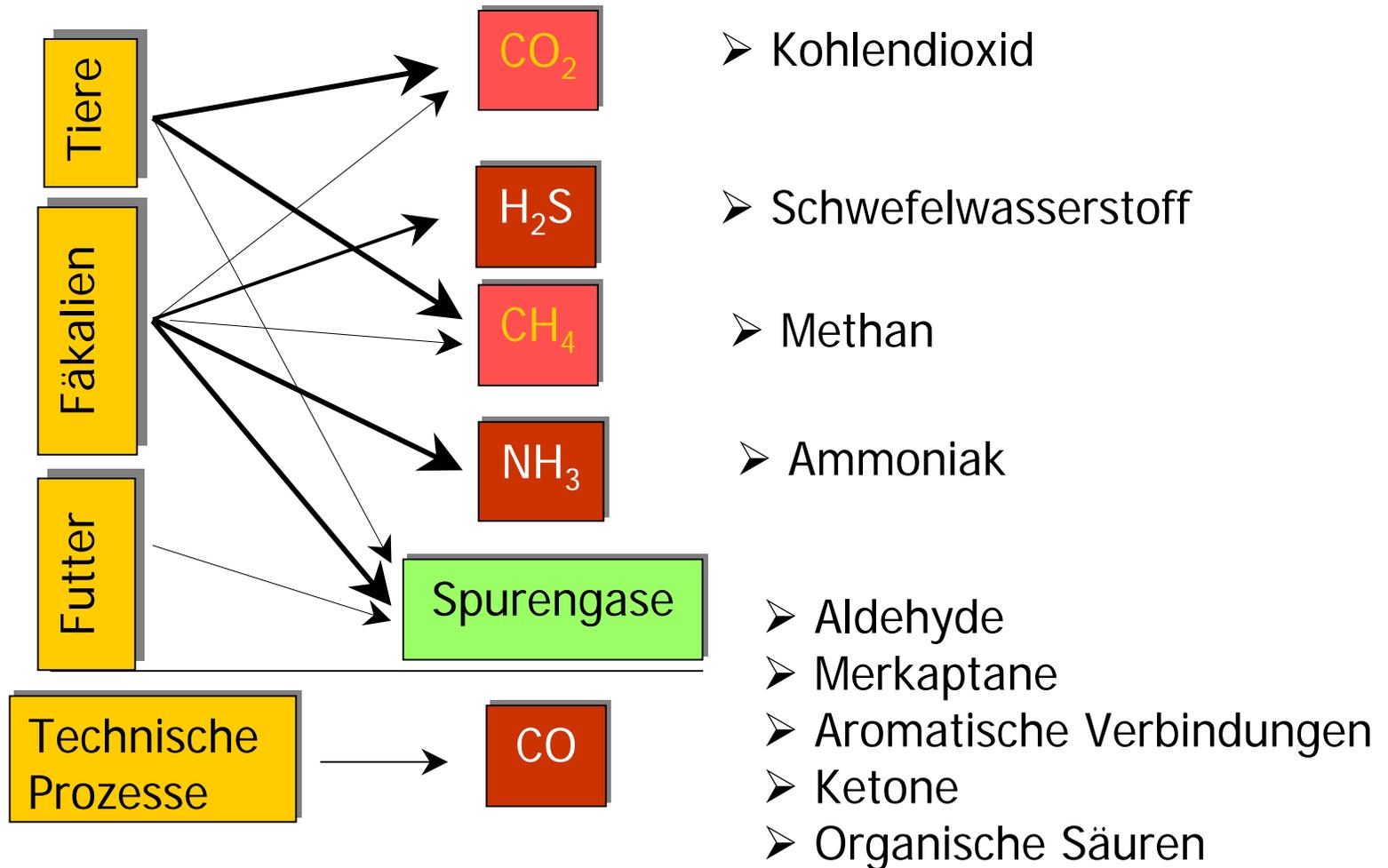
N-Kreislauf



Entmistung im Boxenlaufstall (Faltschieber)



Wichtige Schadgase in Stallluft



Schweinebestand in der Schweiz: Ballungszentren

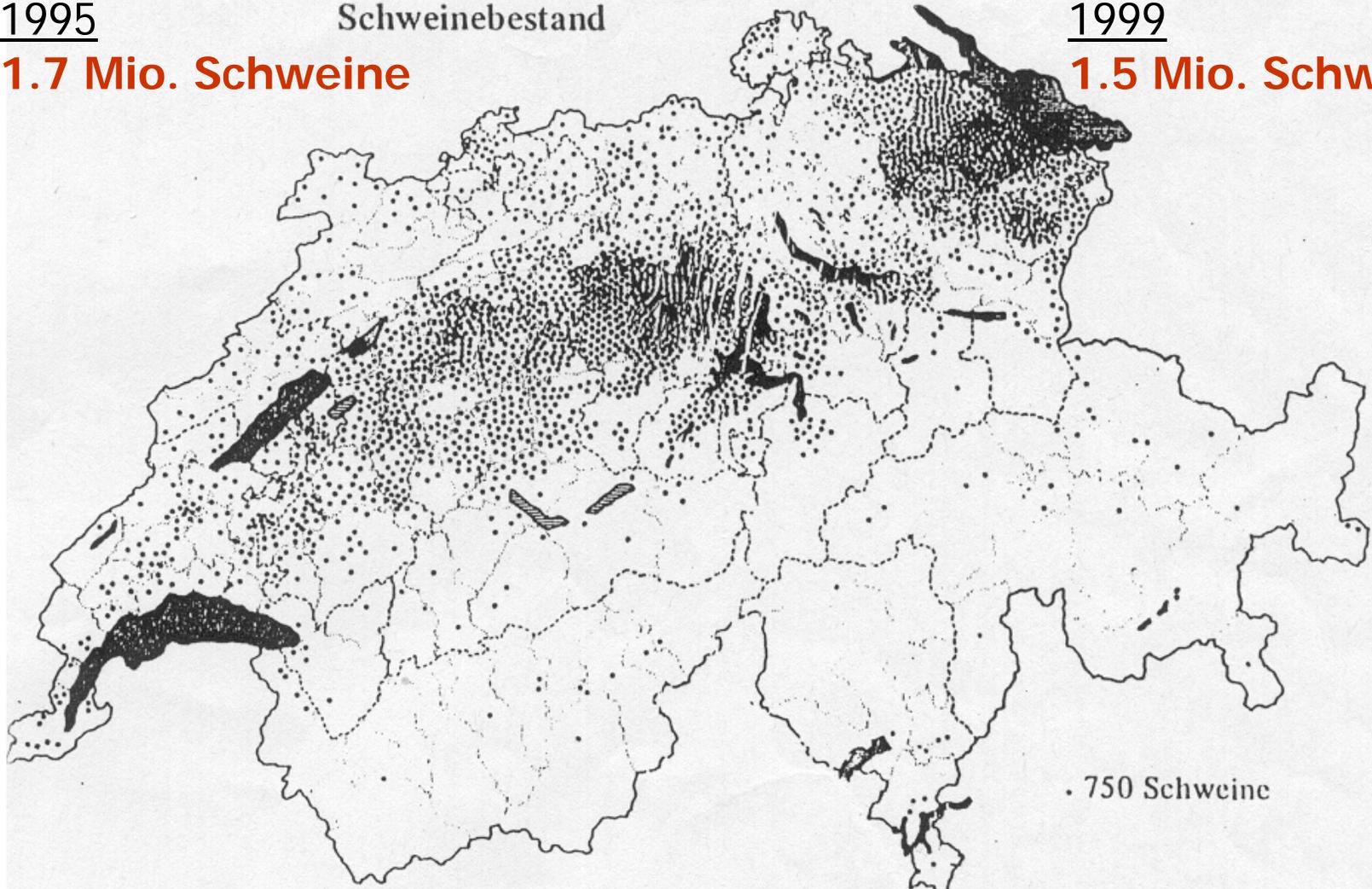
1995

1.7 Mio. Schweine

Schweinebestand

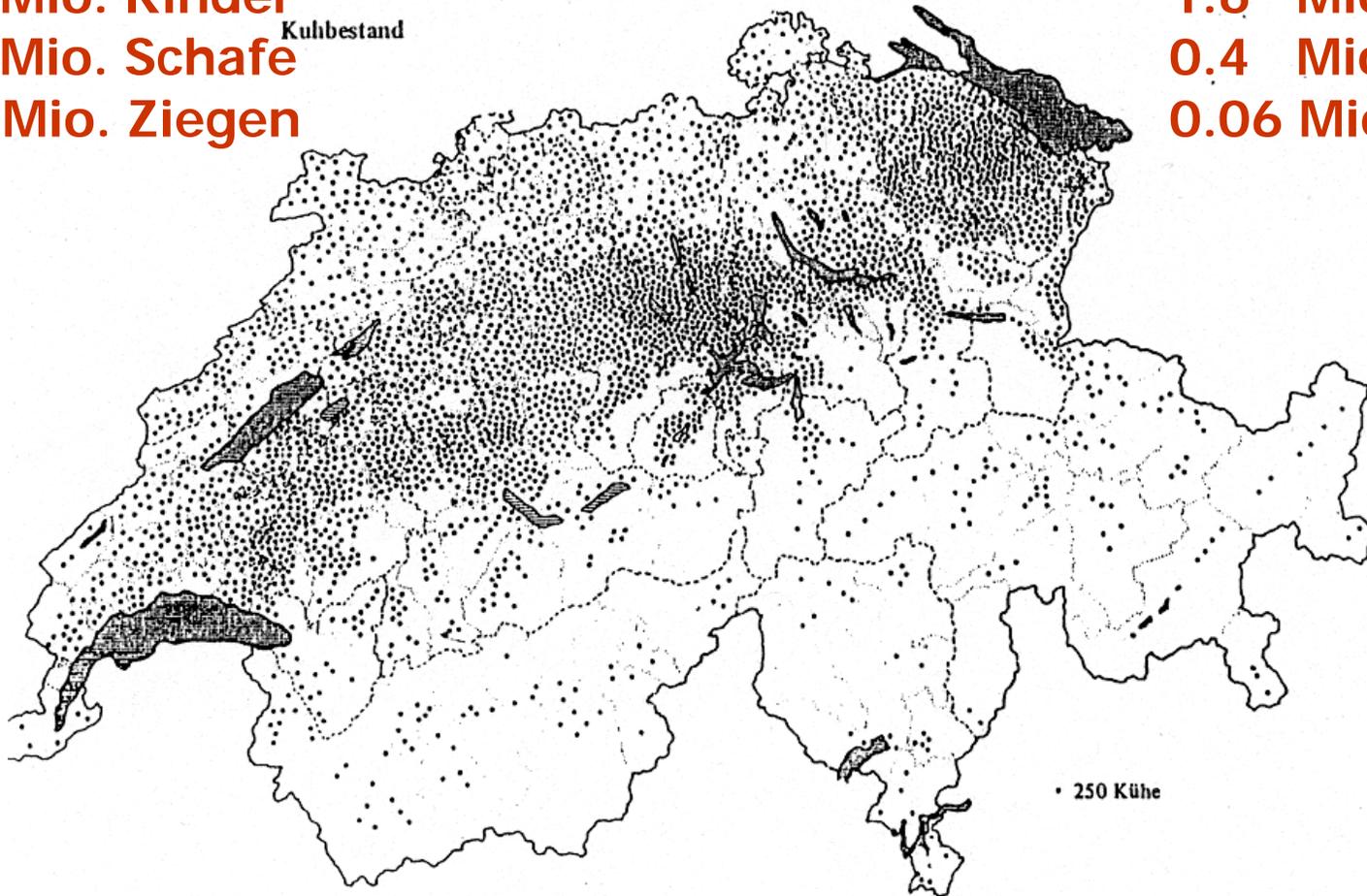
1999

1.5 Mio. Schweine



Rinderbestand in der Schweiz: Ballungsgebiete

<u>1995</u>		<u>1999</u>
1.7 Mio. Rinder		1.6 Mio. Rinder
0.4 Mio. Schafe		0.4 Mio. Schafe
0.06 Mio. Ziegen		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)**

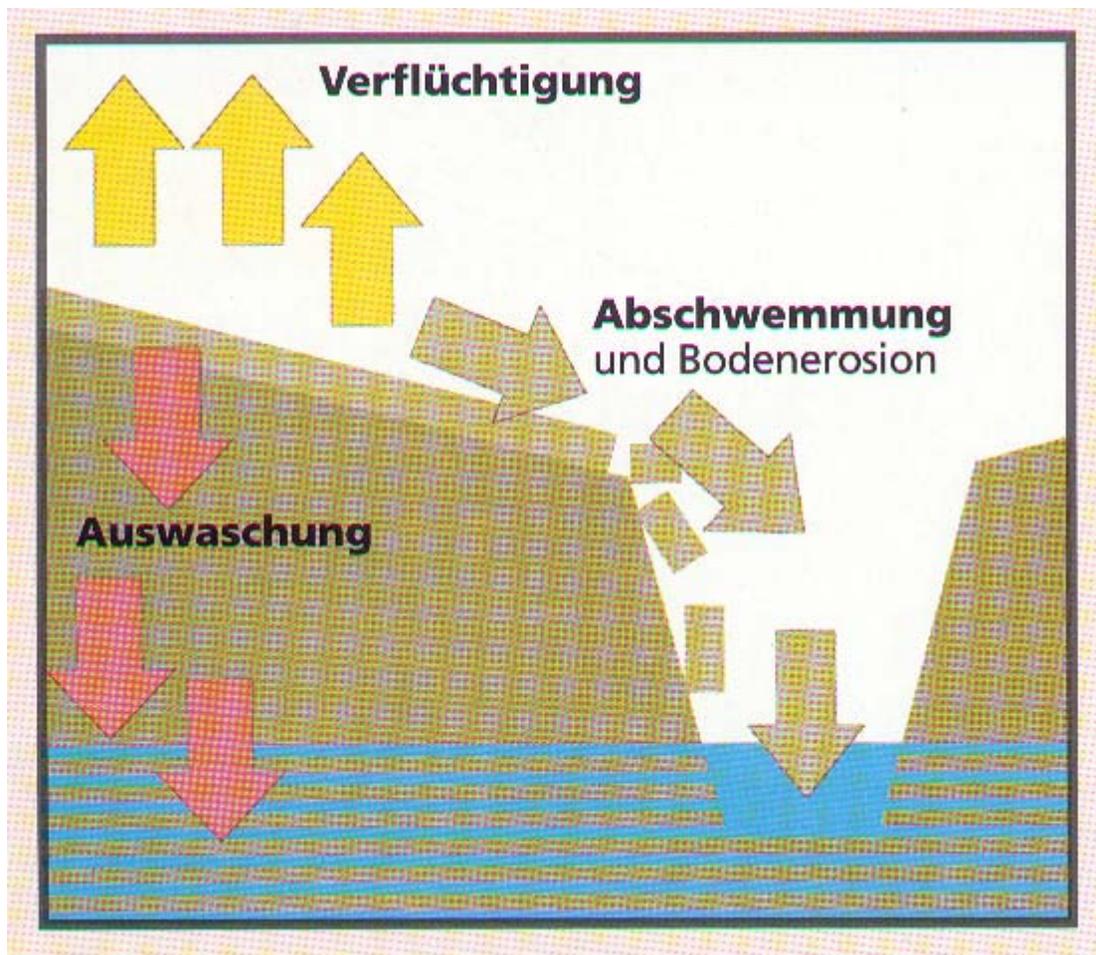
Maximaler Tierbesatz (GSchG)

Produktionskataster	DGVE/ha LN (aktuell)	Richtwert für das Jahr 2006
Ackerbau und Übergangszone	3.0	2.5
Voralpine Hügelzone	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.



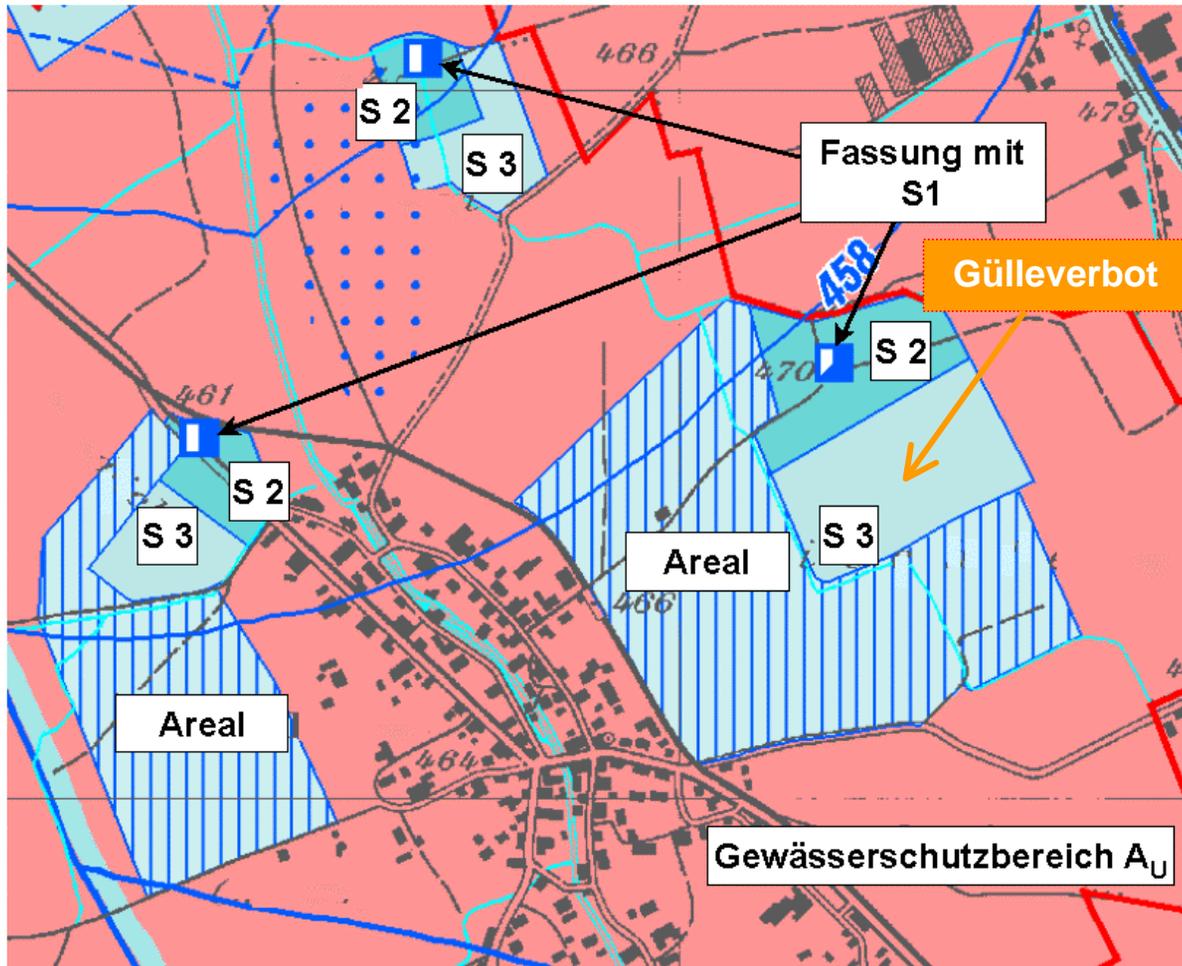
Mikrobiologische Befunde bei Trink- und Rohwasser: Jahresbericht Kant. Labor BL, 2001

Probenart	Anzahl Proben	Beanstandungen	in %
Trinkwasser	2562	213	8.3
Rohwasser	938	(444)	(47.3)
T o t a l	3500	657	--

Probenart	Anzahl Proben	Beanstandungen	in %
Quellwasser	464	73	15.7
Grundwasser	979	34	3.5
Netzwasser	1119	106	9.5
T o t a l	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)

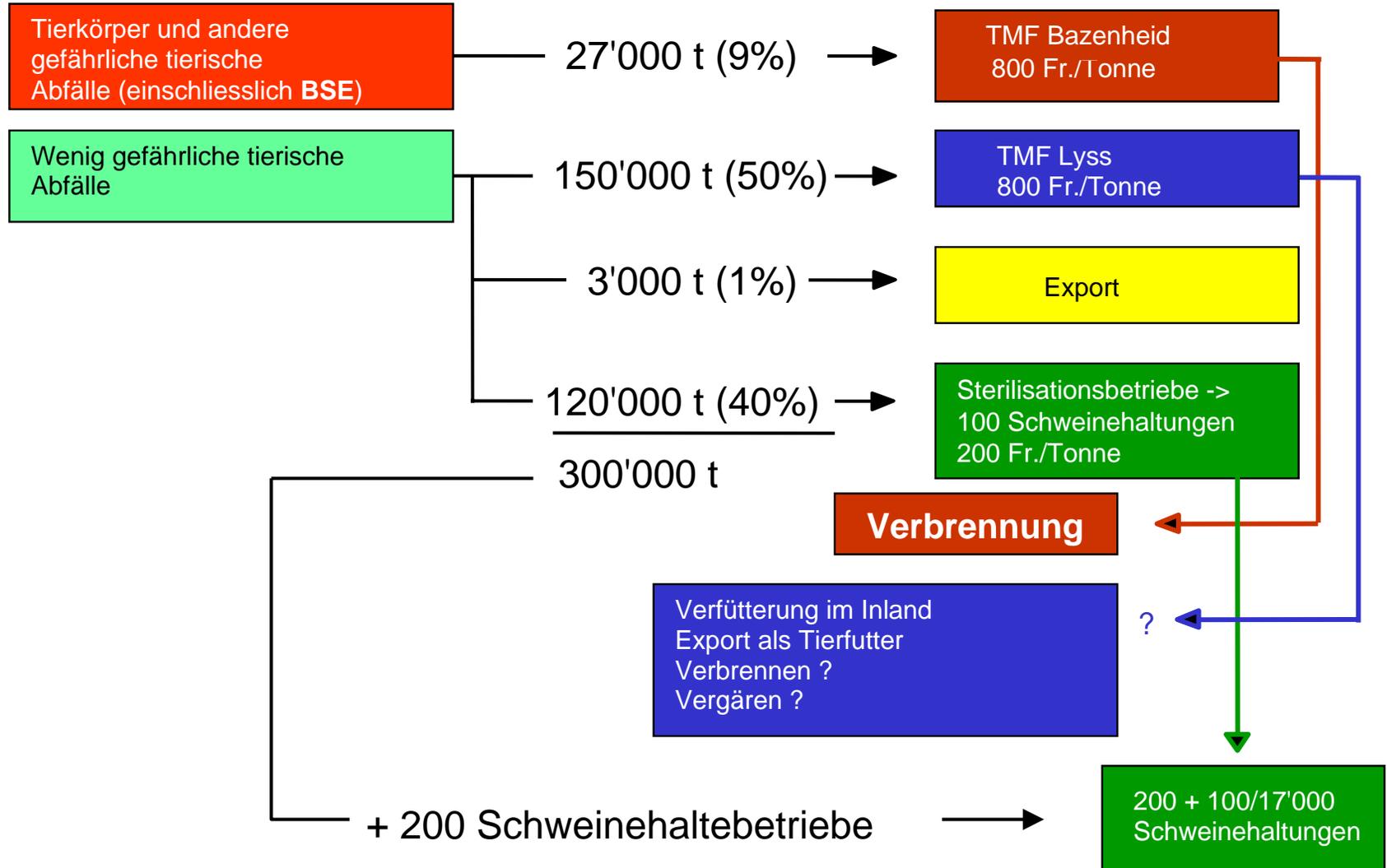
Bioabfall	Jährliche Menge	An Schweine verfüttert
Milchnebenprodukte	1'685	1'509
Ölkuchen/Schrote	100	66
Schlachtabfälle*	273	129 ↓
Müllereiprodukte	175	-
Teigwarenabfälle	4	4
Bäckereiabfälle	10	10
Biskuitabfälle	1	1
Küchenabfälle	175	130
Schokoladefabrikation	3	0.3
Kaffeenebenprodukte	2	-
Brauereien	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

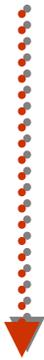
ökonomische Konsequenzen in Form von Lagerkapazität und technischen Einrichtungen

seuchenhygienische Bedenken*

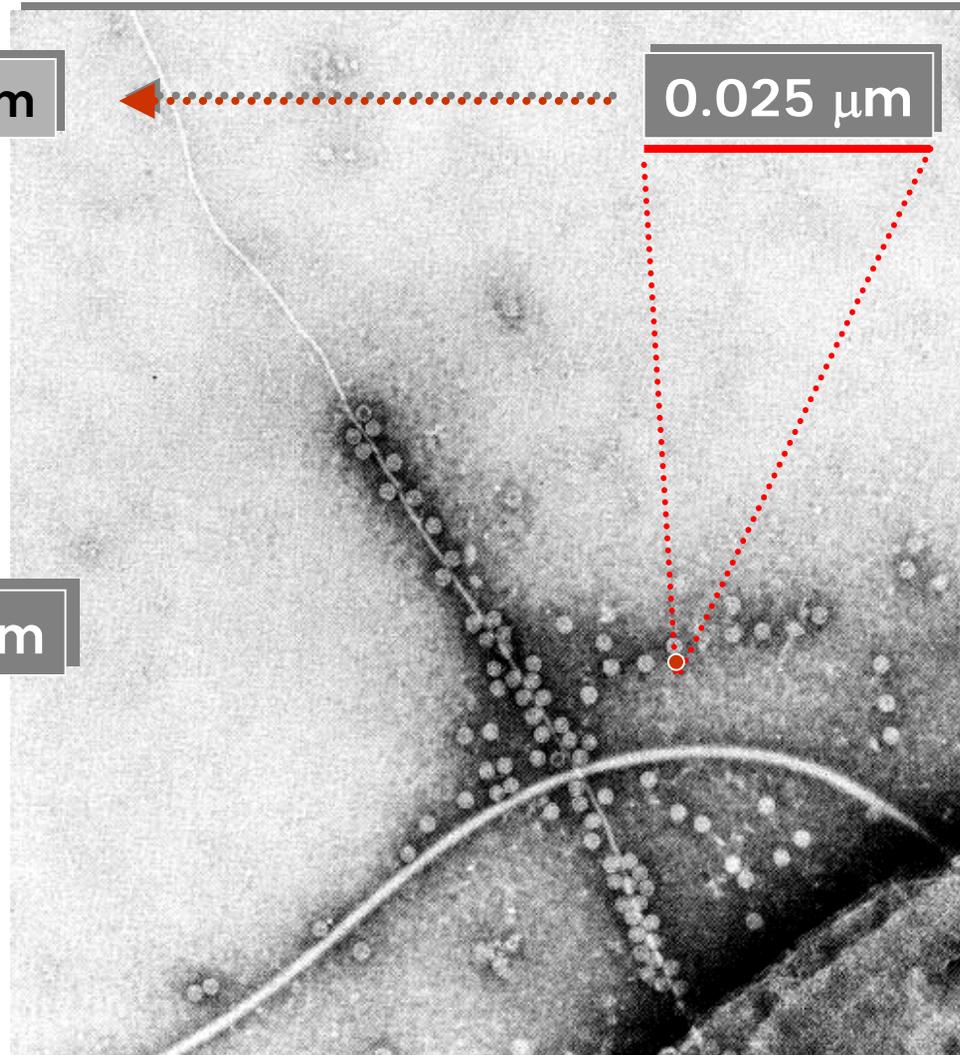
- * Auch in der Schweiz werden immer wieder Pathogene in Trinkwasser-Ressourcen festgestellt: Entero-, Rota- und Norwalk-like Viren, Cryptosporidien, Giardia, *E. coli* und Salmonellen.
Häufig sieht sich die Landwirtschaft als Verursacher bezichtigt.

Bakteriophage M2 von *E. coli*

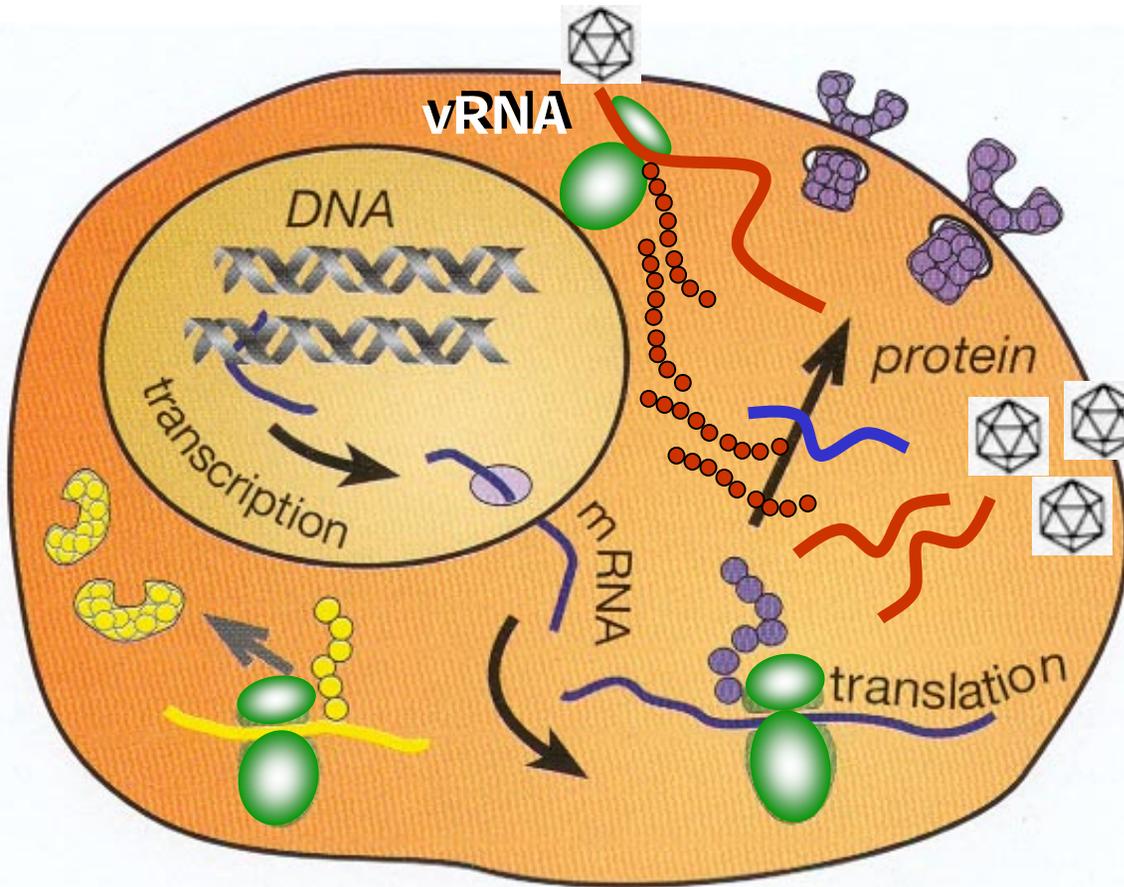
1 μm = 1/1000 mm



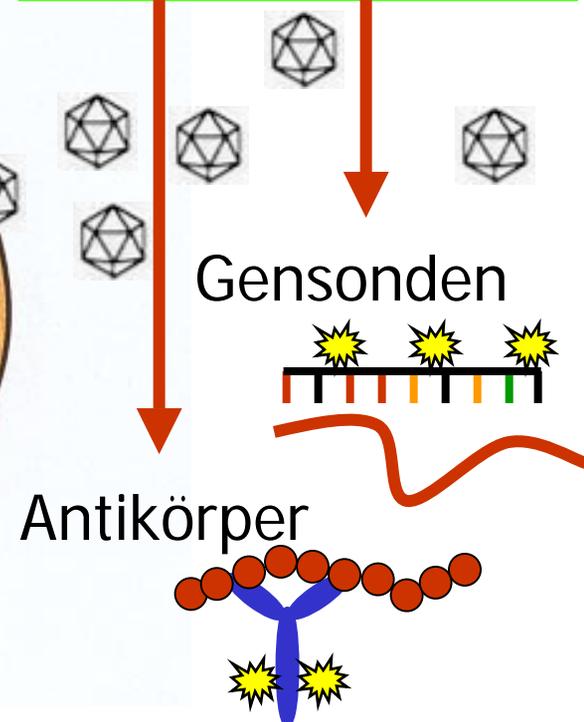
40'000 Viren/mm



Zellen und Viren: Eiweisse und Nukleinsäuren



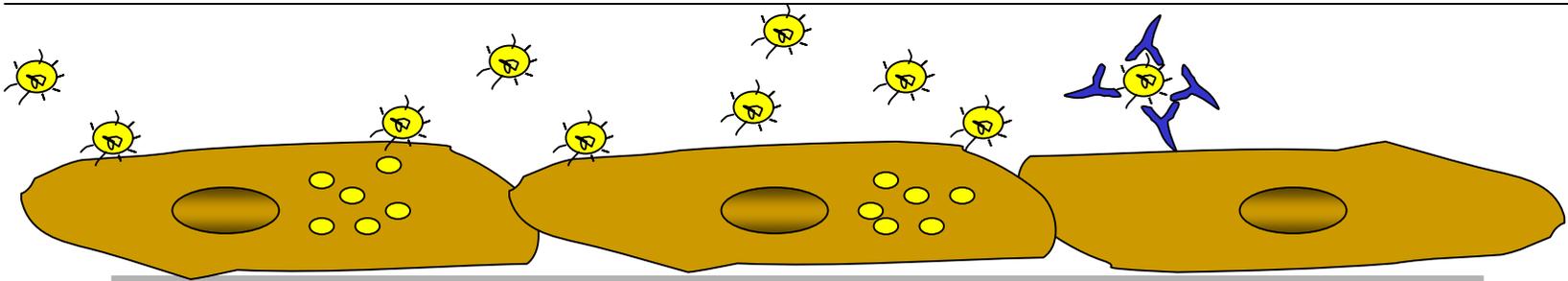
Zielmoleküle für
Nachweis



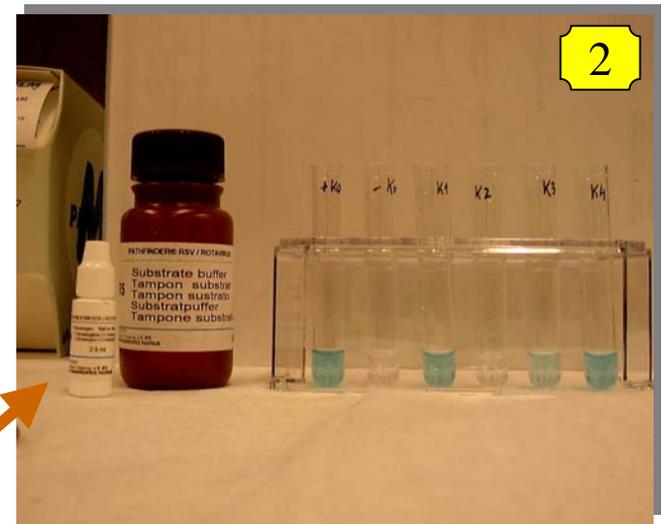
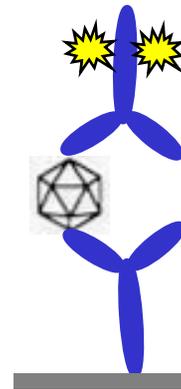
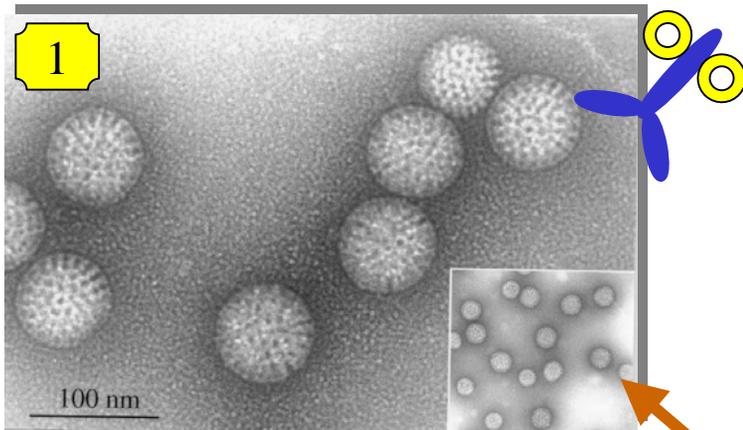
Direkter Virusnachweis

Grundlegende Viruseigenschaften, die für den direkten Virusnachweis geeignet sind

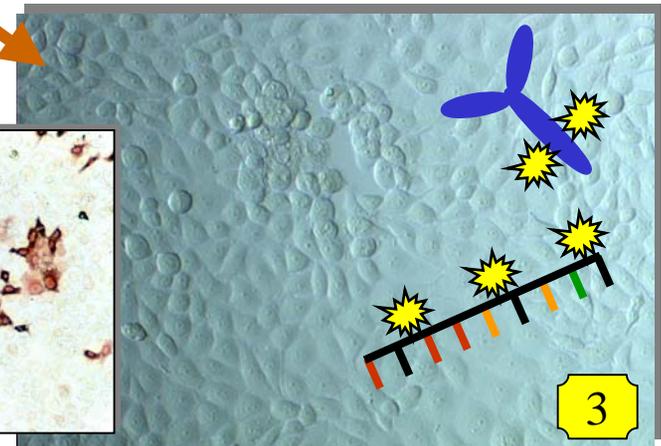
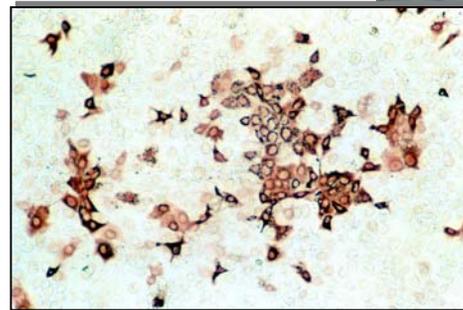
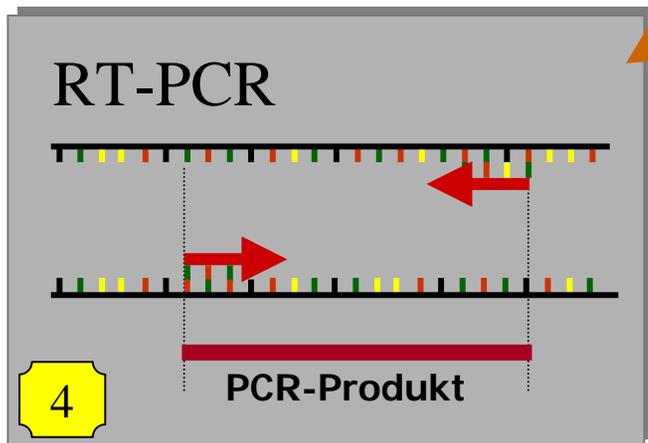
Eigenschaft	Nachweisverfahren
1. Struktur, Form und Grösse	Elektronenmikroskop
2. Infektiosität (Rezeptorbindung)	Zellkultur (Hämagglutination)
3. Antigenität	Serologie
4. Genomaufbau, Gensequenzen	Restriktionsenzyme, Gensonden, (RT-) PCR



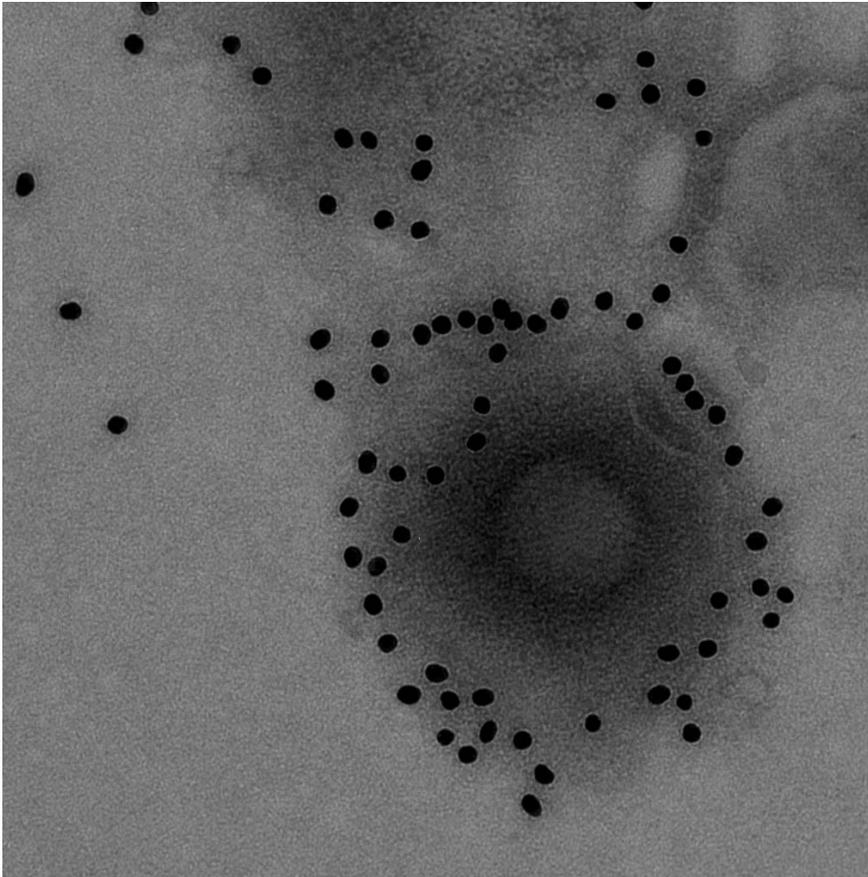
Virale Kardinaleigenschaften



Untersuchungsmaterial → Virus ?



Antigen-Markierung mit "vergoldeten" Antikörpern



Virus

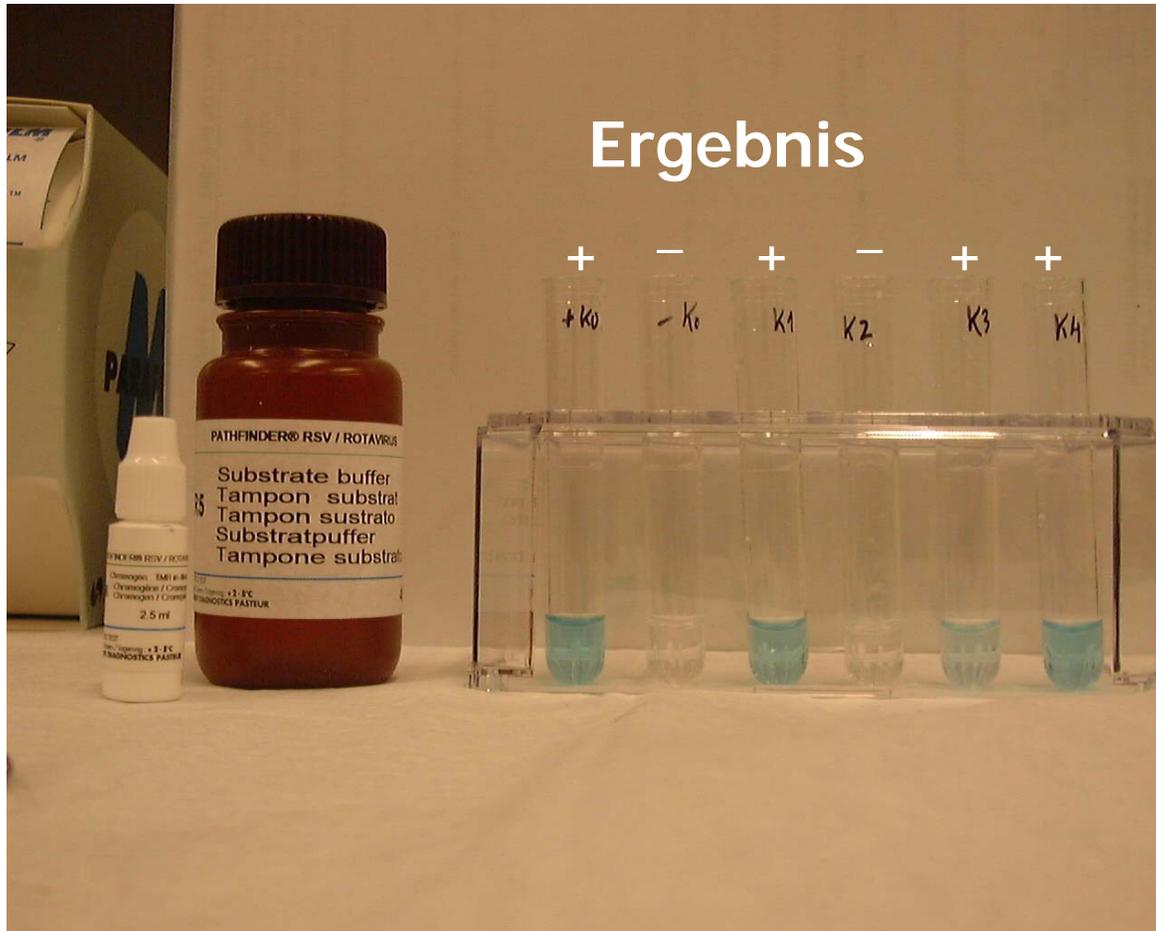
BHV1 = Bovines Herpesvirus 1:
Erreger der IBR und der IPV
(Infektiöse bovine Rhinotracheitis,
Infektiöse pustulöse Vulvovaginitis)

Vorgehen:

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

Rotavirusnachweis mit kommerziellem Testkit: ELISA

Ergebnis



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

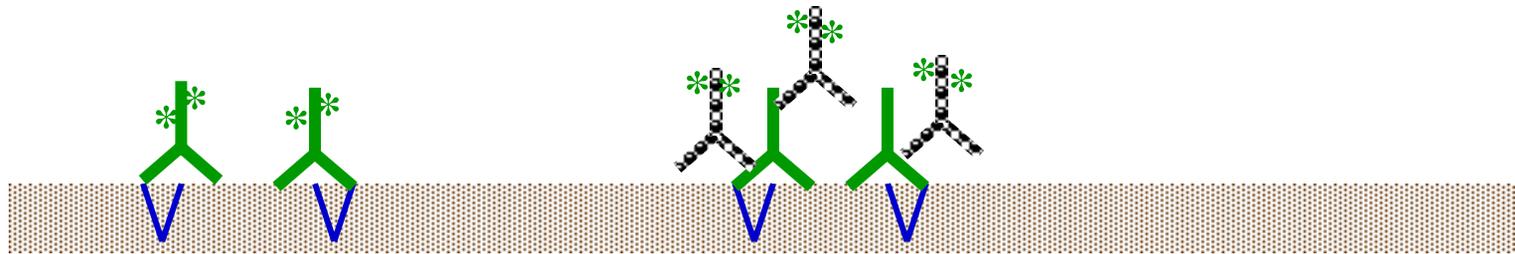
- +Ko: Kontrollantigen
- -Ko: Puffer
- Kotproben 1-4: Puffer und zusätzlich eine geringe Kotmenge
- Peroxidase-markierter mAk; mischen
- 1 Stunde inkubieren
- 5 x waschen (dH₂O)
- Substrat zugeben

Zellkulturen ?



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

Immunhistochemie (IF, EIA)



direkt <- Test -> indirekt



Gewebeschnitt, Abklatschpräparat, Zellkultur



Virusantigen

Primärantikörper



markierter, antigenspezifischer Antikörper

Primärantikörper



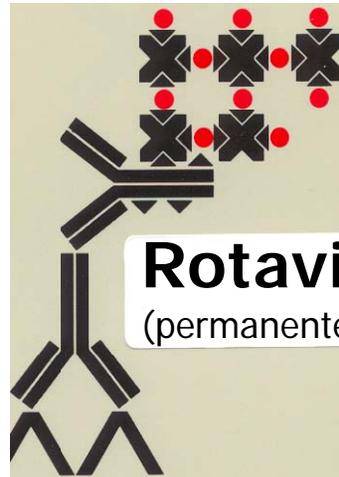
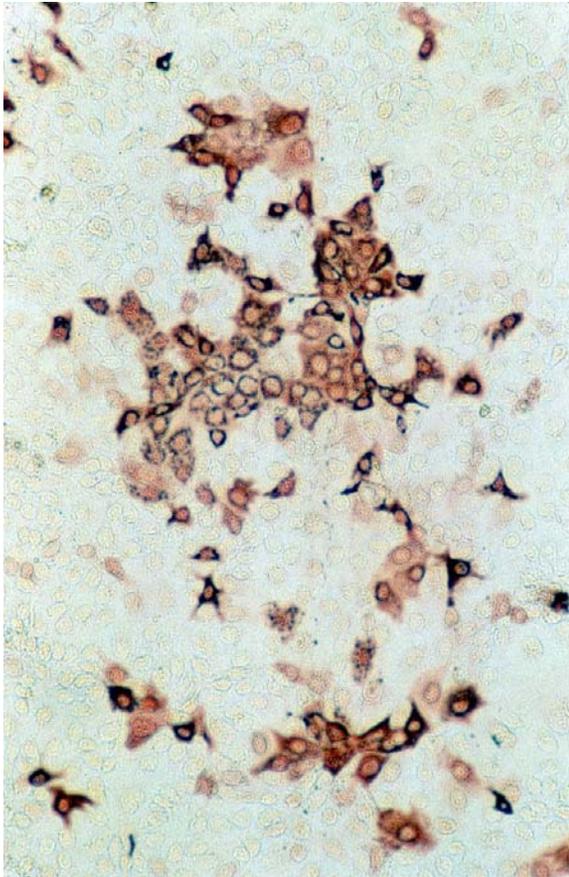
nicht-markierter, antigenspezifischer Antikörper

Sekundärantikörper



markierter Antispeziesantikörper

Immunhistochemischer Virusnachweis



Rotavirus in MA104-Zellen

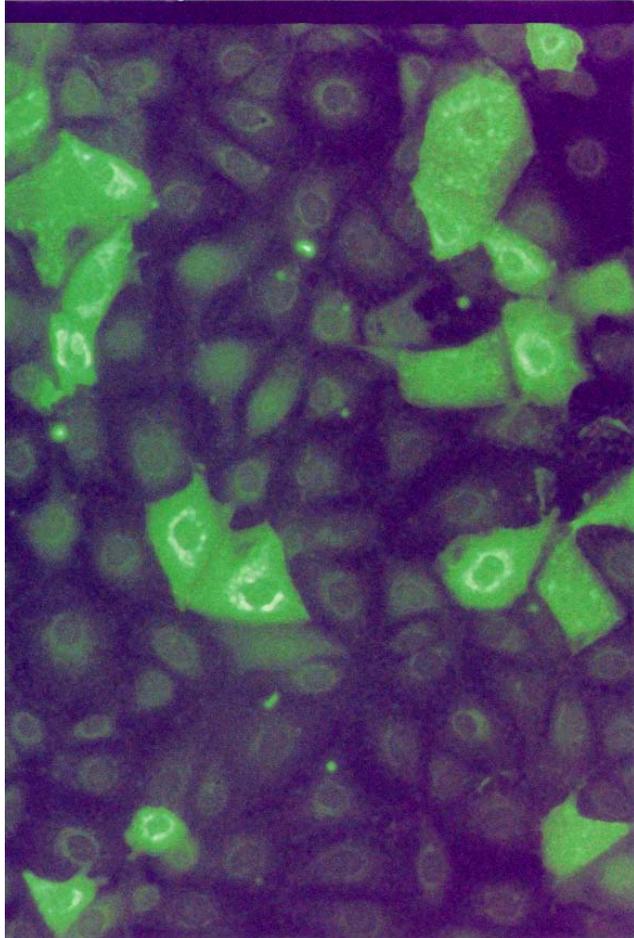
(permanente Affenieren-Zelllinie)

Merke: **Präzipitat** ausschliesslich intrazytoplasmatisch

Fixation der Zellen mit Methanol/Azeton

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

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).

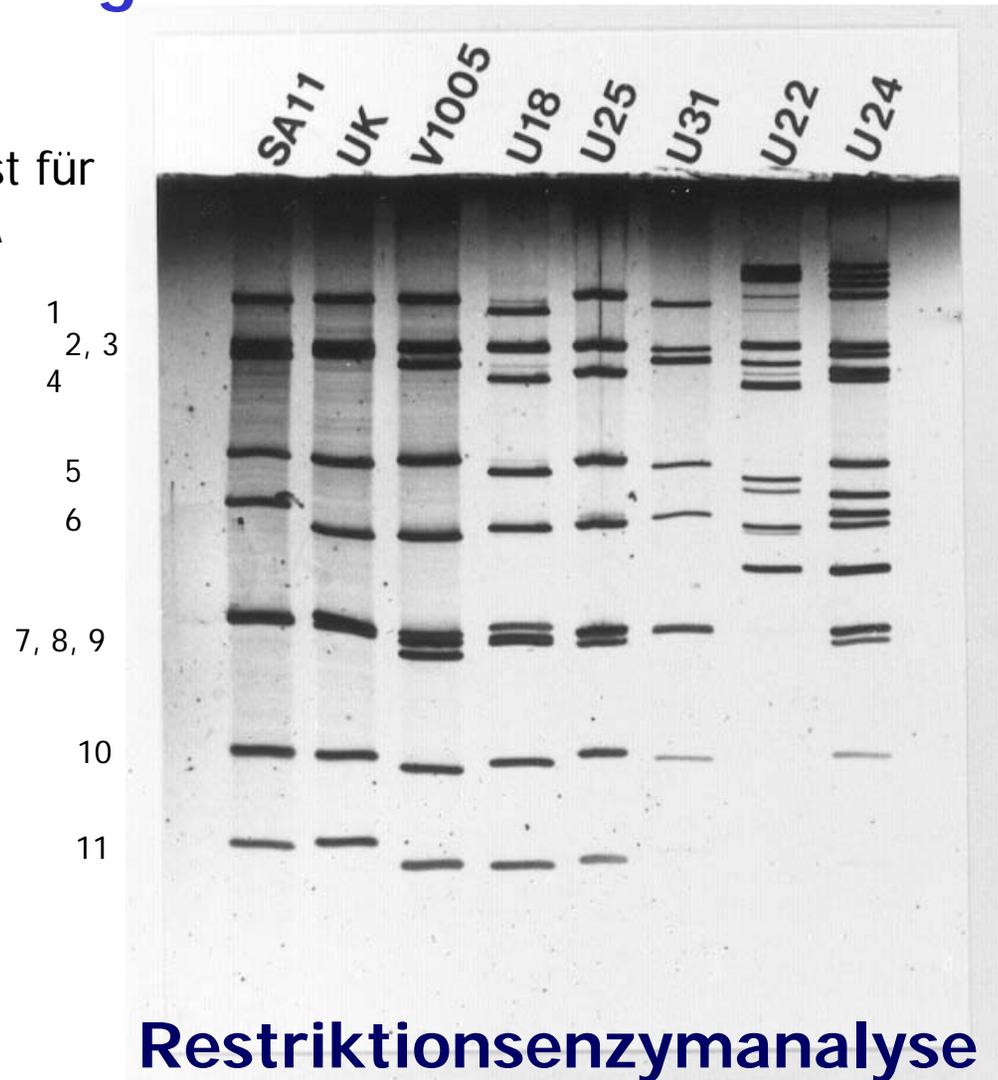
Genomanalyse

Rotaviren: 11 dsRNS-Segmente

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

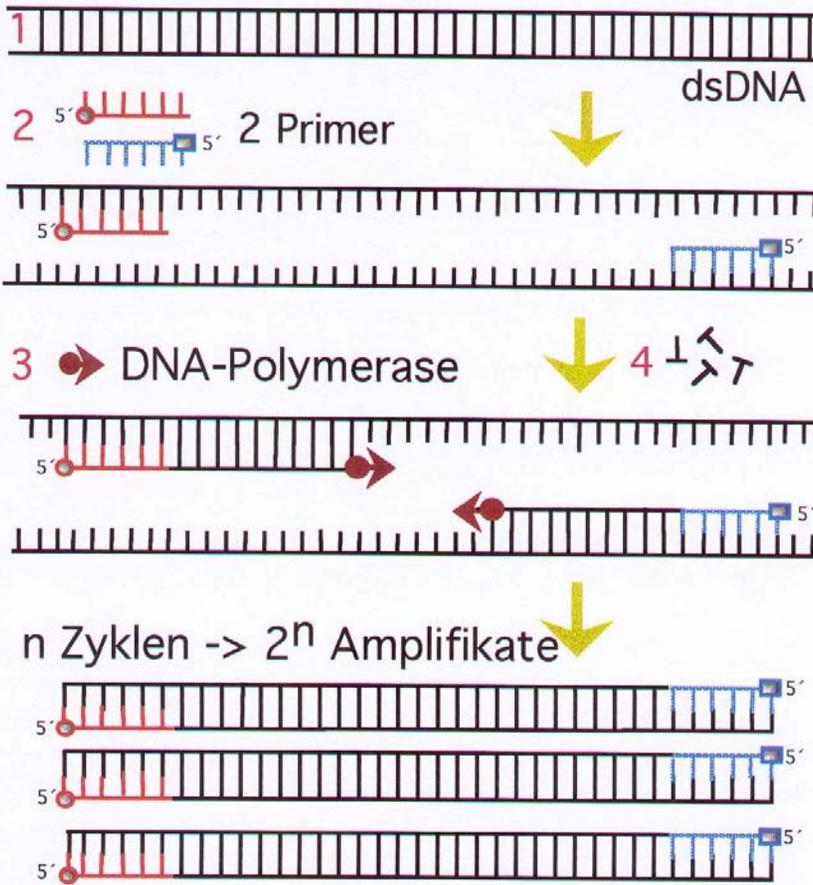
Frage:
Was ist bei U22 und U24 los?

Antwort:
Findet sich auf nächstem Bild



(RT-) PCR

Polymerase-Kettenreaktion, PCR

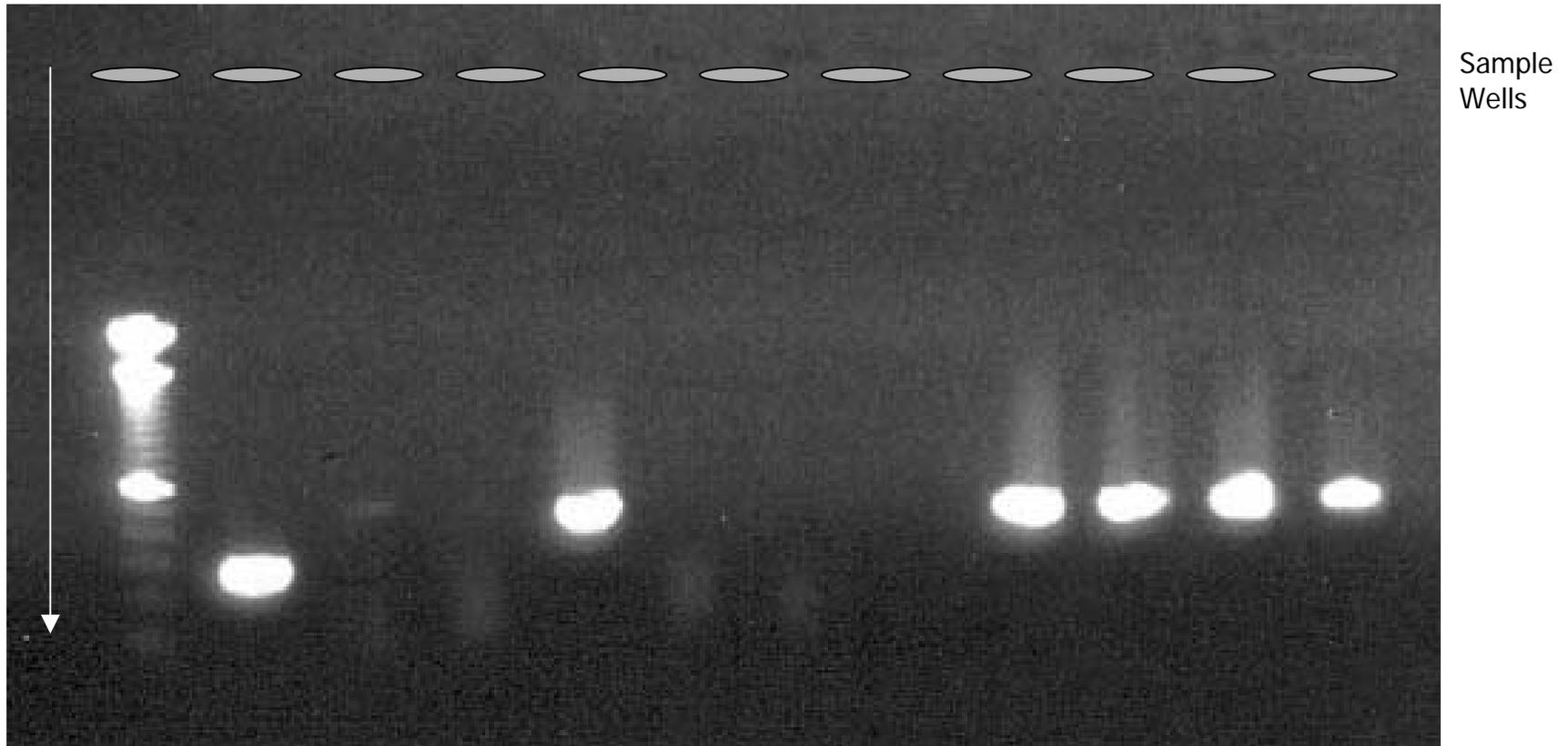


- Target DNA (oder RNA)
- RT-Primer (antisense, random, polyT)
- Reverse Transkriptase = RNA-abhängige DNA-Polymerase
- dNTP's
- Puffer, einschliesslich $MgCl_2$
- PCR-Primer (sense und antisense)
- DNA Polymerase

Rotavirus RT-PCR aus Kotproben

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

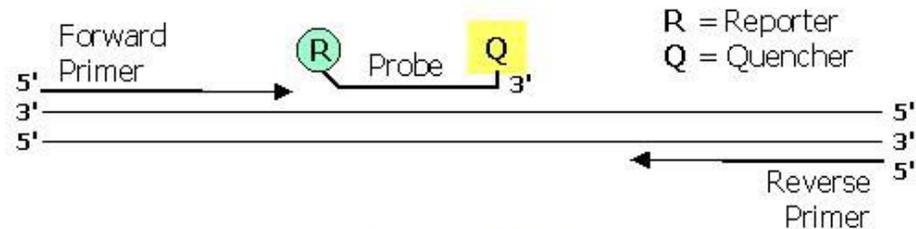
	+Ko	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
	G8	G6		G6				G6	G6	G6	G6
MWM	++	(+)	-	++	-	-	-	++	++	++	++



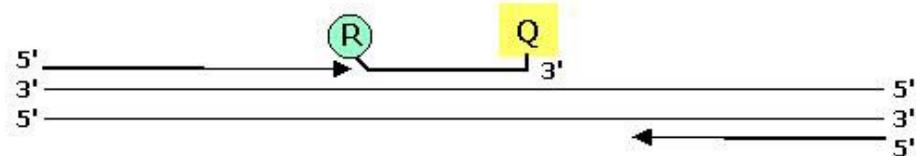
Quantitative Real-Time PCR

Fluorogenic 5' to 3' Nuclease Chemistry

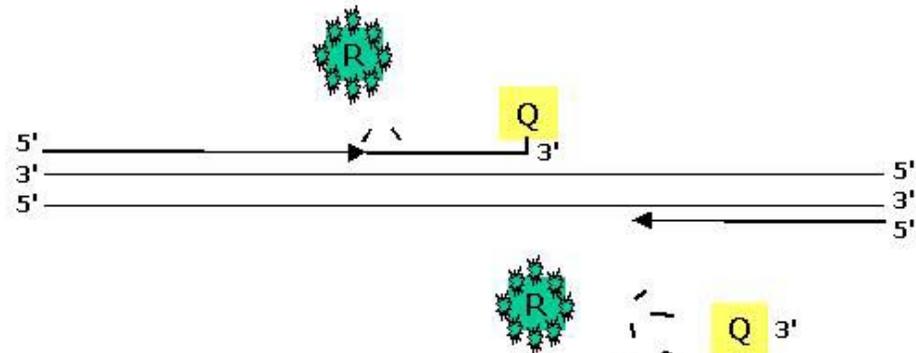
Polymerization



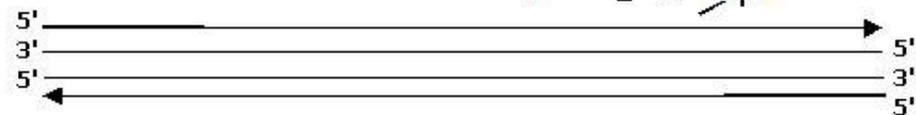
Strand Displacement



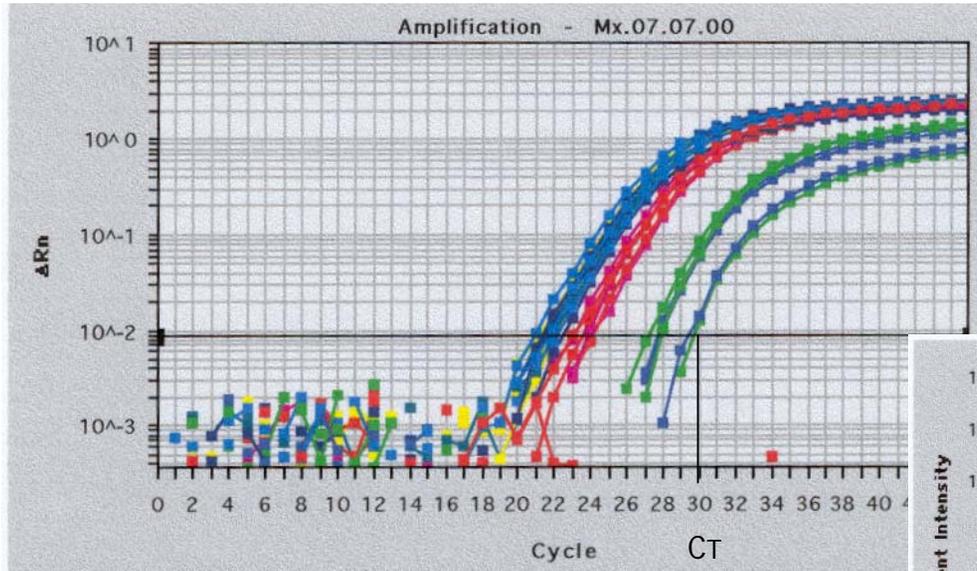
Cleavage



Polymerization Completed



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.

