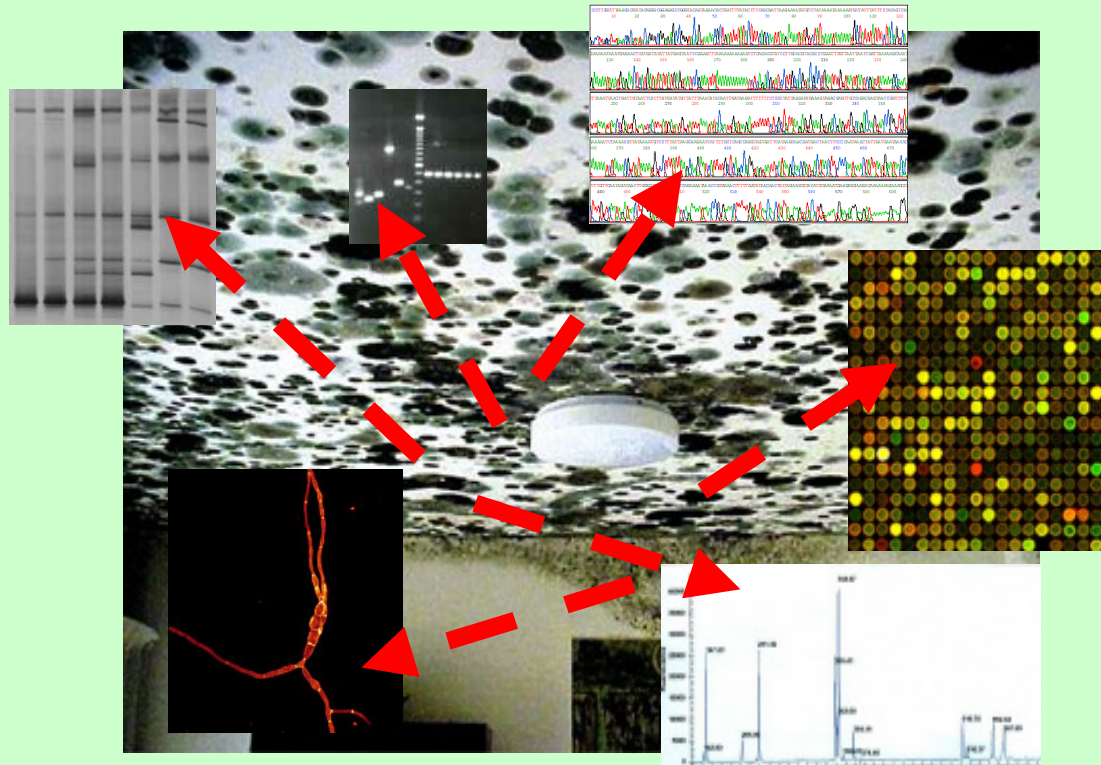
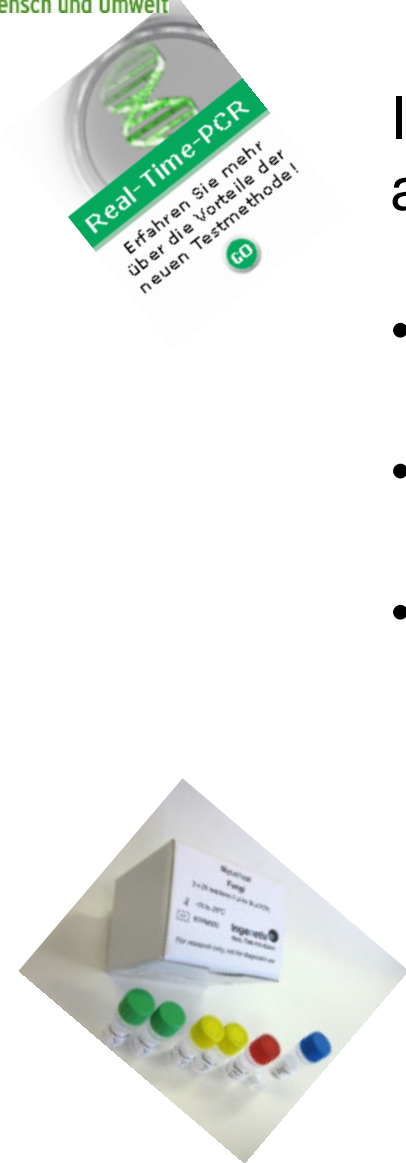


Anwendungen molekularbiologischer Methoden in der Innenraummikrobiologie



Dr. Christiane Baschien
Umweltbundesamt
Fachgebiet II1.4 Mikrobiologische Risiken



Immer mehr Labore bieten PCR-Tests auf Schimmelpilze an:

- Welche Methoden?
- Standardisierung?
- Aussagekraft?



Nachweis und Identifizierung von Schimmelpilzen im Probenmaterial (DNA-Isolation + Kontrollreaktion + eine spezifische PCR)	100 €
Jede weitere Identifizierung von Schimmelpilzen (je PCR)	35 €
<u>Angebot:</u> PCR-Screening (Identifizierung) von 6 Schimmelpilzen (Staffelpreis auf Anfrage)	210 €
DNA-Diagnostik-Nord	



Diversität – **wer?**

Gesamtzellzahl – **wieviele?**

Lokalisation – **wo?**

Arten Abundanz – **wie häufig?**

Gesundheitliche Relevanz – **wie schlimm?**

Funktionen z.B. Mykotoxinproduktion – **wer tut was?**

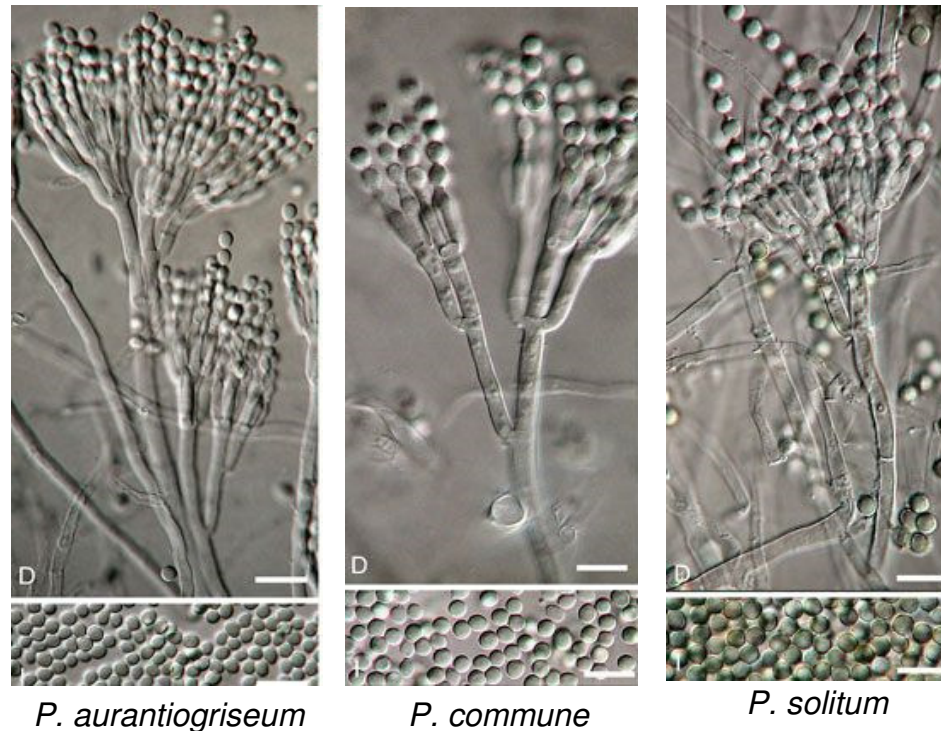
Mikrobielle Interaktionen – **wer mit wem und was?**

Schimmel im Innenraum: Was wollen wir wissen?

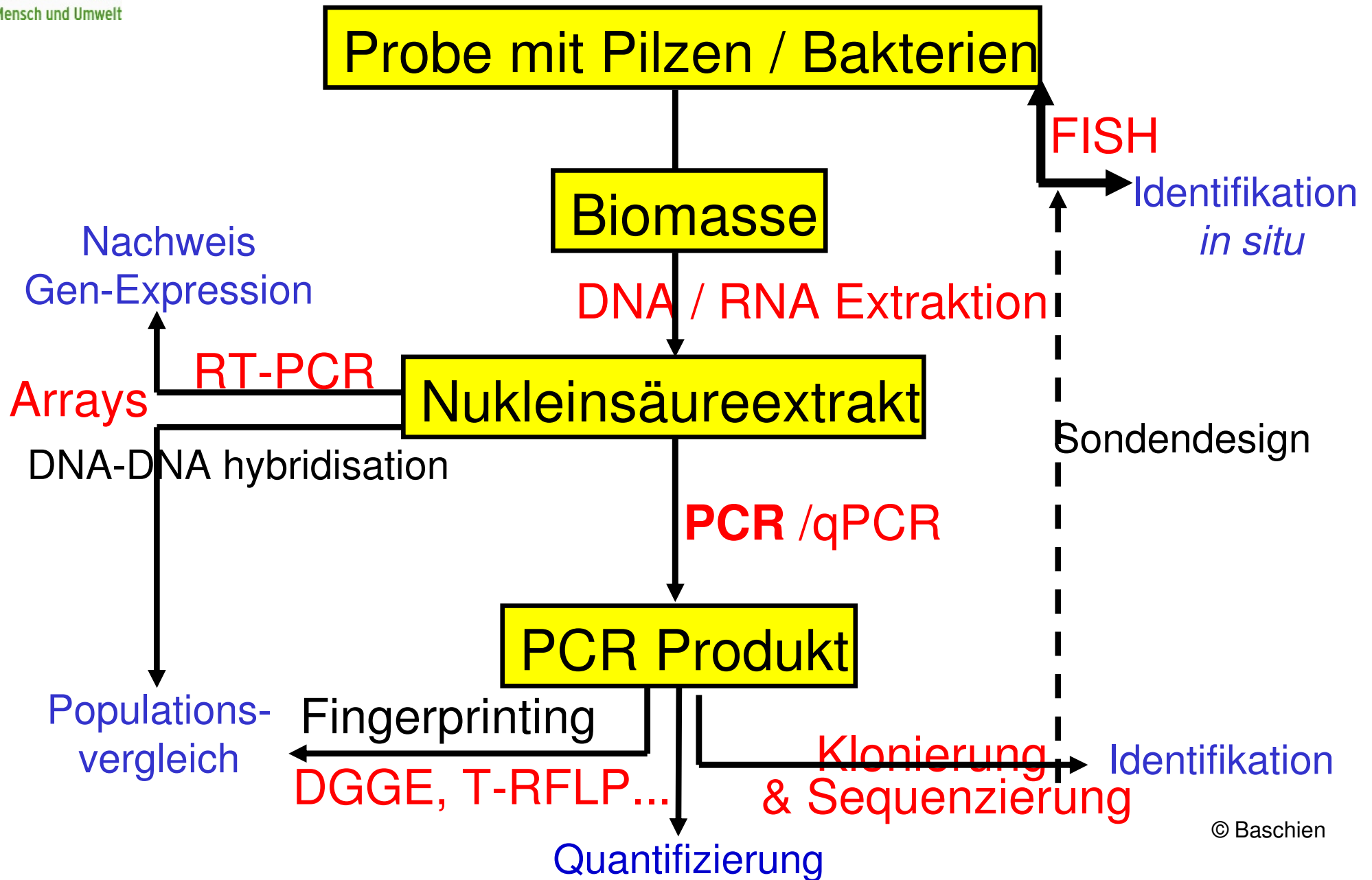


Vorteile molekularer Methoden

- Kultivierungsunabhängig
- Zeitersparnis
- Ähnliche Arten können (leichter) unterschieden werden
- Viele Mikroorganismen können gleichzeitig erfasst werden
- In situ Verfahren



Pictures by Mycobank



© Baschien

DNS/RNS-Färbung

Fluoreszenzfarbstoffe

Acridinorange

(3,6-Acridinediamine, N,N,N',N'-tetramethyl-, monohydrochloride/ 65-61-2)

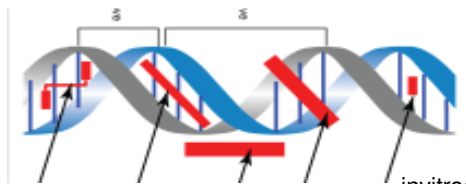
Hoechst 33342-blau

(trihydrochloride, trihydrate)

DAPI-blau

(4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)

SYTO -blau, -grün, -orange, -rot



Bindungsstellen von Nucleinsäurefarbstoffen

Anwendung

- Zählung, Detektion von Zellkernen, Mycel

Vorteile

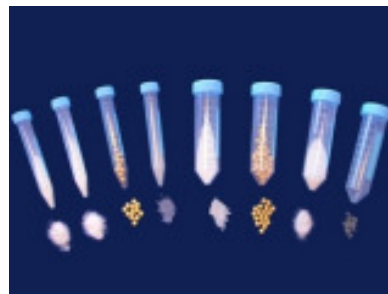
- Hohe Nachweisempfindlichkeit
- Einfache Handhabung
- Schnell

Nachteile

- unspezifische Bindung an Partikel in der Probe
- Hintergrund- und Autofluoreszenz
- Giftigkeit

Nukleinsäure- Extraktion

- Quantität und Qualität wichtig für das Gelingen und die Reproduzierbarkeit der PCR
- Abhängig von **DNS-Extraktionsmethode** und Probenmaterial
- DNS verschiedener Organismen kann unterschiedlich schwer oder leicht isoliert werden
- DNS Extrakte können degradieren (DNAasen, Temperaturschwankungen)
- PCR-Inhibitoren müssen entfernt werden:
Salze, organische Chemikalien, Ethanol (aus der Extraktion)
RNS, Polysaccharide, Phenole, Proteine, ...



PCR:

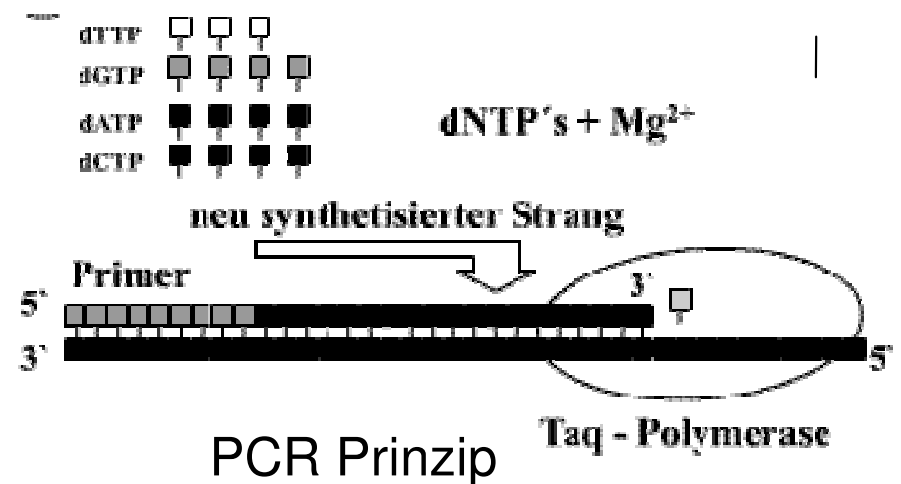
Vervielfältigung (Amplifikation) einer spezifischen DNS-Sequenz

Primer (kurze spezifische Sequenzabschnitte)

- Pilzspezifisch (z.B. Vilgalys & Hester 1990, White et al. 1990)
- Bakterienspezifisch (z.B. Lane 1991)
- Actinobacteria (Schäfer et al. 2010)
- Mycobacteria (Torvinen et al. 2010)
- Artspezifische PCR
- Genspezifische PCR

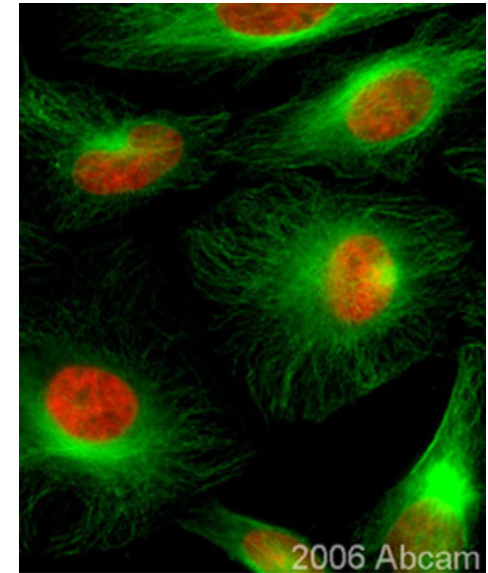
Nachteile konventioneller PCR

- Nicht quantitativ
- Primerspezifität unsicher
- Anfällig für Kontaminationen



Molekulare Marker für Pilze

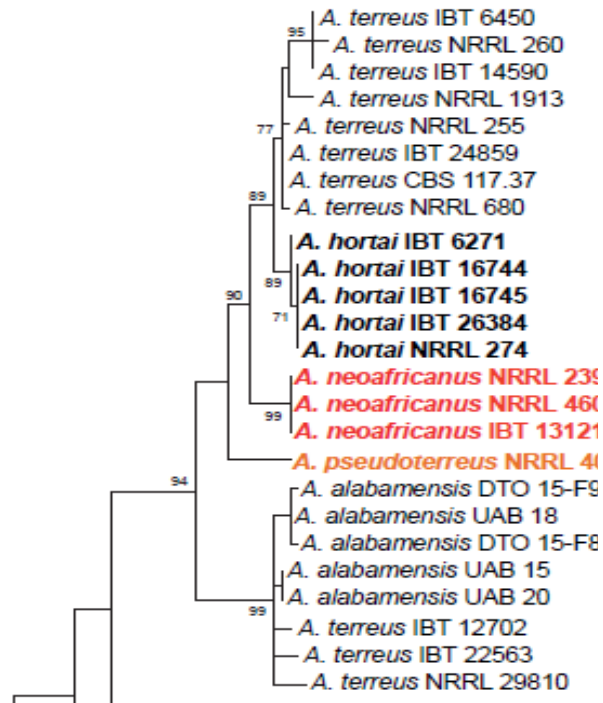
- Ribosomale Gene (rDNA v.a. ITS)
- α -Tubulin (*tub1*)
- β -Tubulin (*tub2*)
- Chitin Synthase (*chs1*, *chs2*)
- Trichodien Synthase (*tri5*)
- α -Elongationsfaktor EF1 α (*tef1\alpha*)
- Polyketid Synthase (*pks*)
- RNA Polymerase II (*rpb2*)
- Cytochrome oxidase (*cox1*)
- ADP ribosylation factor (*arf*)
- ...



Beta Tubulin (grün)

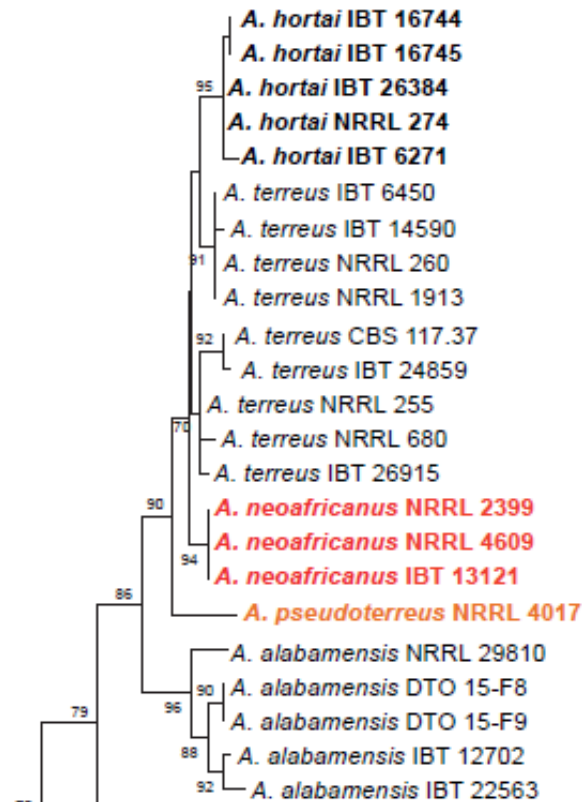
Bacteria:
16 & 23 S rDNA,
Proteine, Genome

Identifizierung durch Sequenzierung

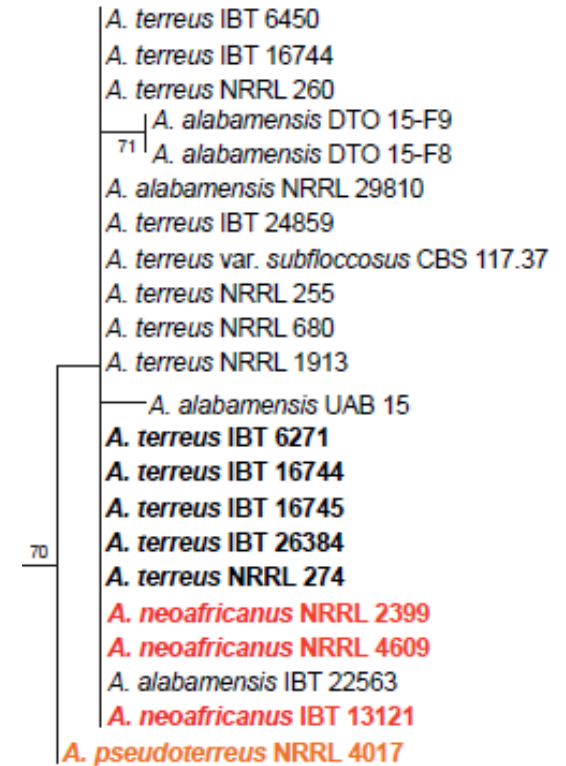


β-Tubulin

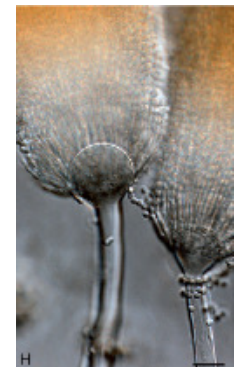
- + Metabolite
- + Morphologie
- + Ökologie



Calmodulin



ITS

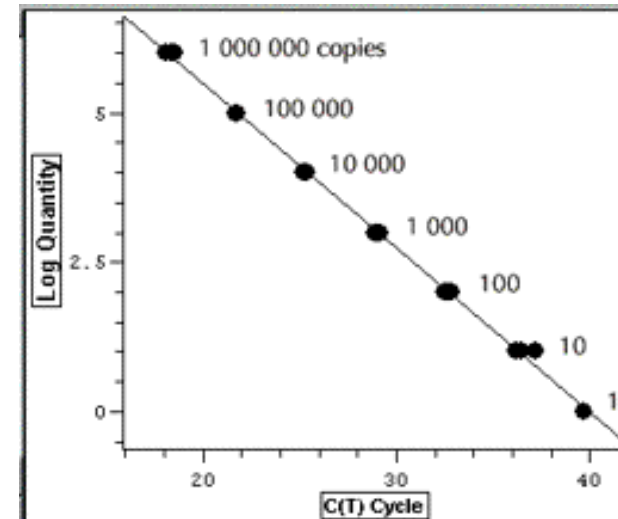
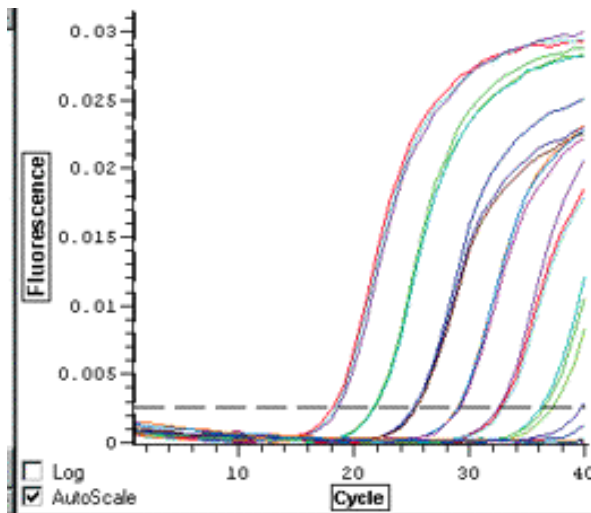


Aspergillus pseudoterreus

R.A. Samson^{1*}, S.W. Peterson², J.C. Frisvad³ and J. Varga^{1,4}
 STUDIES IN MYCOLOGY 69: 39–55. 2011.

Real Time Quantitative PCR

- Detektion von PCR Produkten mit Fluoreszenz
- Quantifizierung in der exponentiellen Phase
- Schwellenwert (Ct=cycle threshold)
- Standardkurve
- Relative Quantifizierung mit internem Standard



Real Time Quantitative PCR

Nachweisgrenzen

- 0.05-1 Konidie (z.B. Hospodsky et al. 2010, *A. fumigatus*)
- 4-5 Bakterien(zellen) (z.B. Torvinen et al. 2010)

Vergleichbarkeit

- DNS-Extraktionsmethode, Amplifikationseffizienz
- Versuchsbedingungen (z.B. Sammelmethode, Filter etc.)
- Zubehör (PCR-Gerät etc.)

Real time qPCR von Mycobakterien in Staub

Eila Torvinen et al. 2010:

- Spezifische Primer für Mycobacteria (16S rDNA)
- Spezifische TaqMan Sonde
- Vergleich mit Kultivierung

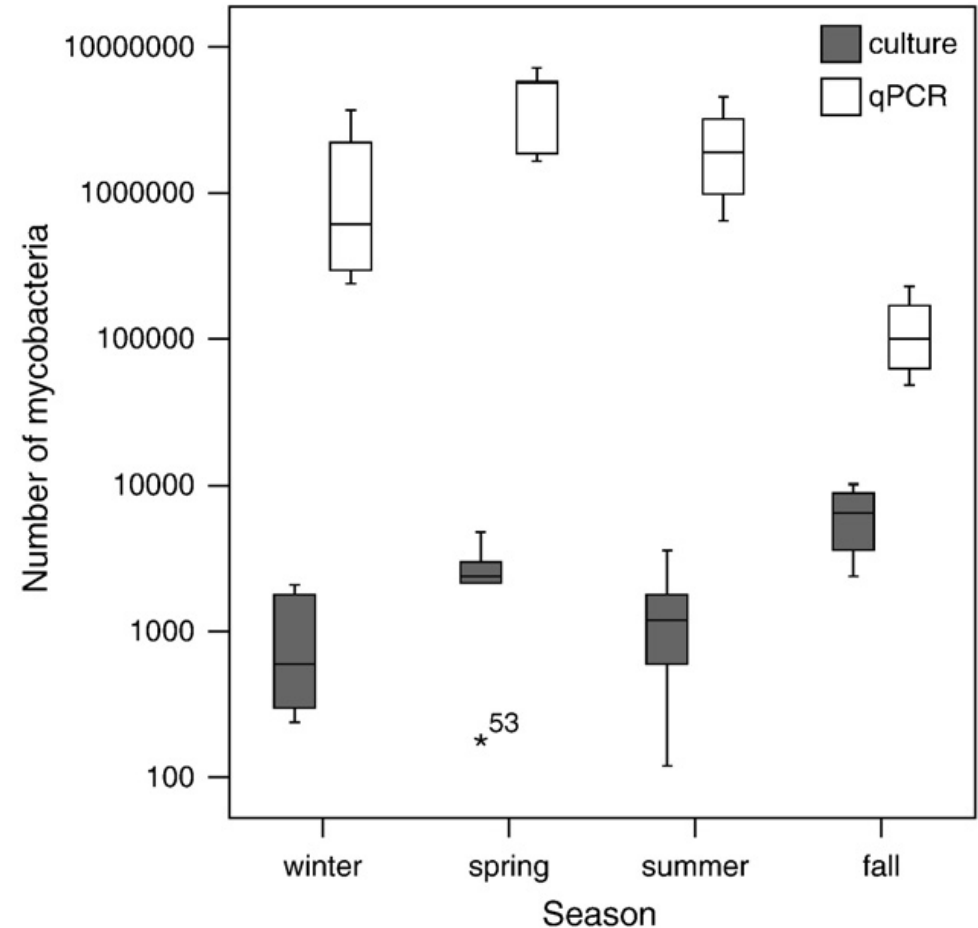


Fig. 2. Seasonal variation of mycobacteria in dust samples as determined by qPCR (cells/g) and culture (CFU/g).

“Mold specific qPCR” Vesper et al. 2007)

- 130 Primer und Sonden
- Art- und gattungsspezifisch (?) basierend auf ITS rDNA
- Basis: Typspezies
- Environmental Relative Moldiness Index (ERMI)
mit 26 Indikatorarten für Wasserschaden (Gruppe 1)
und 10 Arten für Hintergrund (Gruppe 2)

ERMI Group I

Stachybotrys chartarum, Chaetomium globosum, Cladosporium sphaerospermum, Aspergillus versicolor, Eurotium (A.) amstelodami, Penicillium variable, Aspergillus flavus, Aspergillus restrictus, Penicillium crustosum, Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger, Aspergillus sclerotiorum, Penicillium purpurogenum, Aspergillus fumigatus, Penicillium corylophilum, Aureobasidium pullulans, Aspergillus ochraceus, Penicillium brevicompactum, Paecilomyces variotii, Aspergillus sydowii, Penicillium spinulosum, Wallemia sebi, Aspergillus unguis, Scopulariopsis brevicaulis, Scopulariopsis chartarum, Aspergillus penicillioides, Trichoderma viride.

ERMI Group II

Acremonium strictum, Alternaria alternata, Aspergillus ustus, Cladosporium cladosporioides v1, Cladosporium cladosporioides v2, Cladosporium herbarum, Epicoccum nigrum, Mucor & Rhizopus group, Penicillium chrysogenum, Rhizopus stolonifer

**MSQPCR der EPA
(Environmental Protection
Agency, USA)**

Next Generation Sequencing Herausforderungen und Anwendungen

- Zusammensetzen der kurzen Sequenzfragmente aufwändig
- Neue Bioinformatik Methoden zur Datenverarbeitung
- Diversität einer Probe wird häufig überschätzt (Ungenauigkeiten)
- Quantifizierung schwierig (Kopienzahl, Sequenzierfehler)
- Umweltproben-Metagenomics
- Genome (Fungi: 7-40 Mbp, ~ 250)

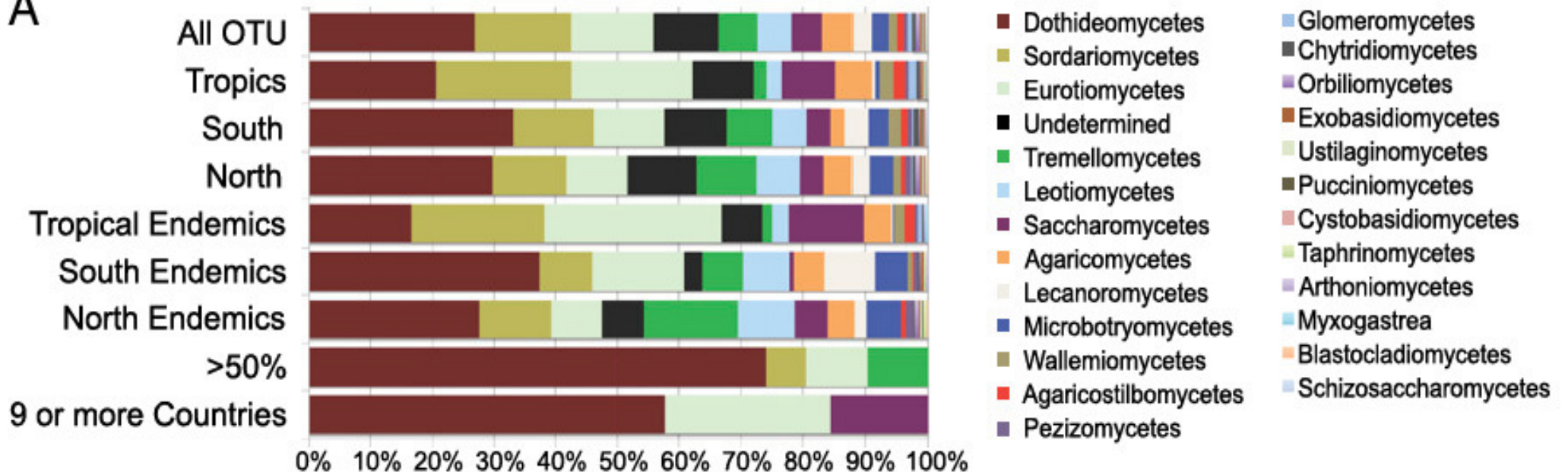


Next Generation Sequencing

Anthony S. Amend et al. 2010

- 72 Innenraum-Staubproben von 6 Kontinenten
- ITS und D1-D2 Region 28S rDNA
- 454 sequencing: 97557 ITS, 187668 28S Sequenzen
- Diversität größer in gemäßigten Breiten

A



Sonden und Arrays

Wen-Tsung Hung et al. 2011:

- Array für 21 (Schimmel)-Pilze
- ITS-Region
- 208 Stämme getestet
(inklusive Luftproben)

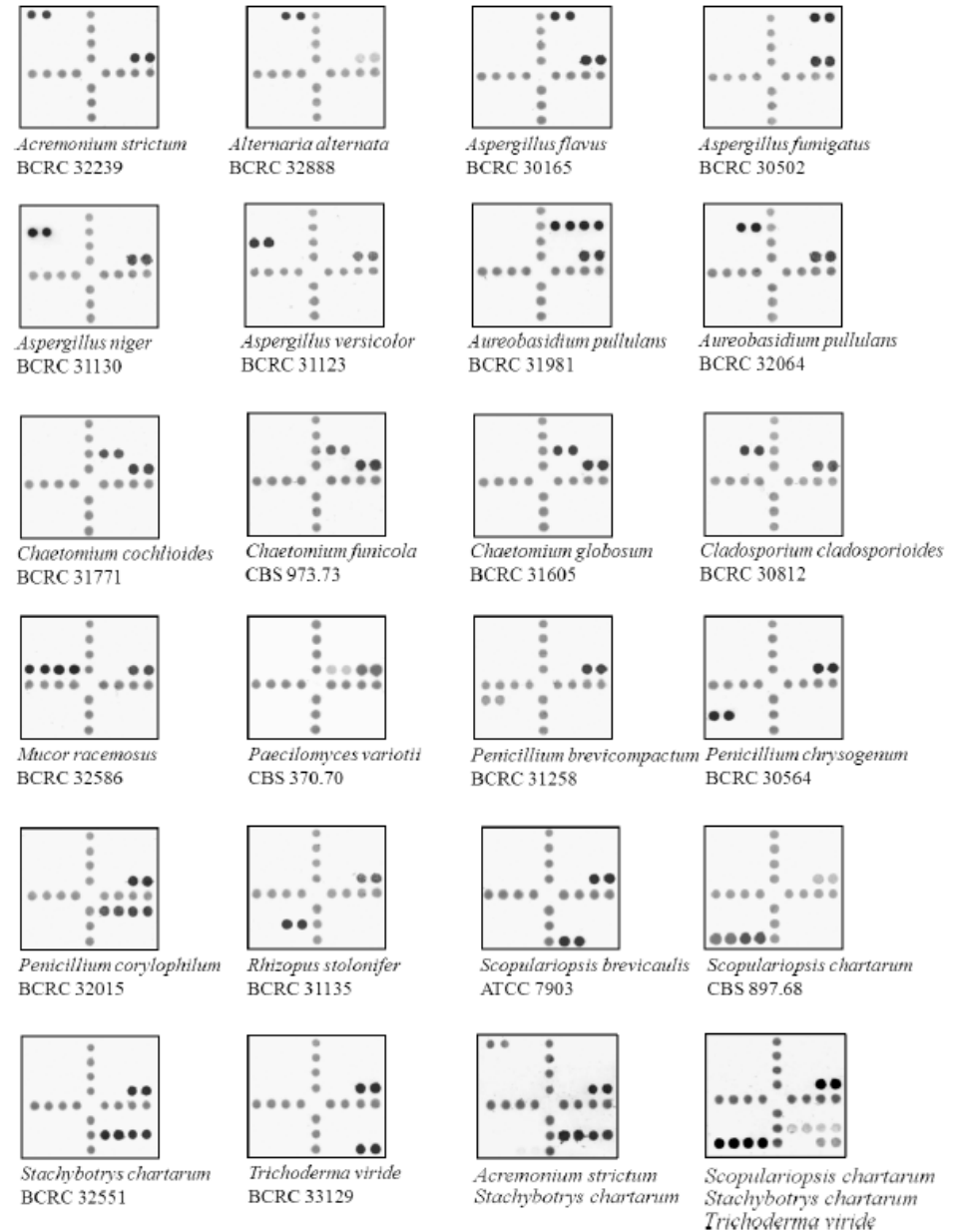


Figure 2 Hybridization patterns of 21 species of fungi on the array.

Limitierungen und Herausforderungen

- Standardisierung von molekularbiologischen Methoden
- DNA-Extraktion , PCR-Inhibition
- Genwahl und Primerspezifität
- GenBank: 20 % fehlerhafte Sequenzen
(z.B. Seifert 2009, Hawksworth 2004, Vilgalys 2003)
- Berücksichtigung der Grenzen der Aussagekraft einzelner Methoden



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

