

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Tierhygiene

Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Erfassung “Asthma-protektiver“ Bakterien im bäuerlichen Milieu

Melanie Korthals

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. E. von Mutius,
Ludwig-Maximilians-Universität München
3. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 20.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan am 09.07.2008 angenommen.

Für meine Eltern gewidmet

**Die stets sehr großes Interesse an dieser Arbeit zeigten und mich in allen
Lebenslagen unterstützten**

***Am Anfang eines jeden Werkes steht das Wort,
am Anfang jeder Tat die Überlegung***

Jesus Sirach 37:16

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG.....	8
2	STAND DER FORSCHUNG.....	10
2.1	Asthma- und Atopieproblematik.....	10
2.1.1	Pathogenese.....	10
2.1.2	Hygiene Hypothese	12
2.1.3	Mikrobielle Exposition unterschiedlicher Populationen	13
2.2	Verfahren zur Bestimmung mikrobieller Exposition.....	15
2.2.1	Bestimmung mikrobieller Komponenten	15
2.2.2	Kultivierungsverfahren	15
3	MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1	Probenmaterial.....	17
3.1.1	Pilotstudie	17
3.1.2	Lagerungsversuch	17
3.1.3	PARSIFAL-Studie	17
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Kultivierung	17
3.2.2	DNS-Extraktion.....	18
3.2.3	Sequenz-spezifische real-time PCR	19
3.2.4	Vergleich von DGGE und PCR-SSCP	19
3.2.5	PCR-SSCP für Staubanalysen	19
3.2.5.1	Modifizierung	21
3.2.5.2	Methodenvalidierung	22
3.2.6	Statistische Auswertung	22
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	24
4.1	Kultivierung von Mikroorganismen aus Stäuben.....	24
4.2	Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> in Stäuben.....	26
4.2.1	Kultivierungsverfahren	27

4.2.2	Real-time PCR.....	28
4.2.3	Vergleich mit Kultivierungsverfahren	29
4.3	Vergleich von DGGE mit PCR-SSCP	31
4.4	Etablierung und Validierung von PCR-SSCP für Staubanalysen	32
4.4.1	Modifizierungen	32
4.4.2	Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Methode für Staubanalysen	34
4.4.3	Sensitivität von PCR-SSCP	36
4.5	Pilotstudie	37
4.6	PARSIFAL-Studie.....	39
4.6.1	PCR-SSCP-Ergebnisse	39
4.6.2	Real-time PCR-Ergebnisse.....	42
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	43
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	45
6	SUMMARY.....	47
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	49
8	PUBLIKATIONEN.....	58
9	DANKSAGUNG.....	90
10	CURRICULUM VITAE.....	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
° C	Grad Celsius
ALEX-Studie	“Allergy and Endotoxin“-Studie
BAL	Broncho-alveläre-Lavage
DGGE	“Denaturing gradient gel electrophoresis“
DNS	Desoxynukleinsäure
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
et al.	“et alteri“
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>iap</i>	“invasion associated protein“
IFN- γ	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KbE	Kolonie bildende Einheit
LAL-Test	Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test
MDE	“Mutation detection enhancement“
mg	Milligramm
μ l	Mikroliter
min	Minute
OVA	Ovalbumin
PARSIFAL-Studie	“Prevention of allergy-risk factors for sensitisation in children related to farming and anthroposophic lifestyle“-Studie
PBS	“phosphate buffered saline“
PCR	“polymerase chain reaction“
rpm	“rounds per minute“
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure

SSCP	“Single-strand conformation polymorphism”
Th-Zellen	T-Helferzellen
u.a.	unter anderem
Vol.	Volumen
WAO	“World Allergy Organization“
WHO	“World Health Organization”
z.B.	zum Beispiel

1 Einführung

Asthma und Allergien gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen der westlichen Welt. Die Kosten der medizinischen Versorgung sind erheblich. Es ist derzeit nicht bekannt, wie diesen Krankheiten vorgebeugt werden kann. In den letzten Jahren wurde daher in zahlreichen epidemiologischen Studien erforscht, ob Umweltfaktoren und Lebensbedingungen einen Einfluss auf die Entstehung von Asthma und Allergien haben. So wurde gezeigt, dass Bauernhofkinder im Vergleich zu Kindern aus derselben ländlichen Region ohne Bauernhofkontakt (Landkinder) einen vorbeugenden Schutz vor Asthma bronchiale, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung haben. Dieser so genannte „Bauernhofeffekt“ war am deutlichsten bei Kindern zu finden, die sich im ersten Lebensjahr in Tierställen aufhielten und von ihren Eltern Rohmilch zu trinken bekamen (Riedler et al., 2001; Braun-Fahrlander et al., 2002). Der Grund für diesen Zusammenhang ist noch unbekannt, aber man vermutet, dass Mikroorganismen diesen Effekt herbeiführen. Erste Anhaltspunkte für diese Vermutung lieferten Studien, in denen u.a. gezeigt wurde, dass bei zunehmend höherem Gehalt an mikrobiellen Komponenten im Matratzenstaub die oben genannten Krankheitsbilder weniger häufig auftraten (inverse Beziehung; Braun-Fahrlander et al., 2002; van Strien et al., 2004; Schram-Bijkerk et al., 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Exposition von Mäusen gegenüber den aus Kuhställen kultivierten Bakterienarten *Acinetobacter Iwoffii* und *Lactococcus lactis* allergische Reaktionen verhindern kann (Debarry et al., 2007).

Die bisher angewandten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Umweltexposition von Kindern durch Staubanalysen waren jedoch ungenau. So wurden bei der Analyse von bakteriellen Komponenten nur Sub-Populationen gemessen, da z.B. beim Nachweis von Endotoxin Gram-negative jedoch nicht Gram-positive Bakterien erfasst wurden (Waser et al., 2004). Kultivierungsverfahren ließen zwar eine bessere Differenzierung zu, allerdings stellen sie nur einen geringen Teil der tatsächlich vorkommenden Mikroorganismen dar, da viele Spezies nicht kultivierbar sind (Debarry et al., 2007; Amann et al., 1995).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Verfahren anzuwenden, mit denen die mikrobielle Umweltexposition von Kindern im ländlichen Raum genauer charakterisiert werden konnte. Für diesen Zweck sollten kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden etabliert und validiert werden und mit klassischen Kultivierungsverfahren

verglichen werden. Mit diesen Methoden sollte ein Beitrag zur Klärung folgender Fragen geliefert werden:

1. Ist Matratzenstaub, ein in früheren Studien verwendetes Probenmaterial geeignet, die mikrobielle Umweltexposition der Kinder in einem gewissen Rahmen widerzuspiegeln?
2. Inwiefern unterscheidet sich die mikrobielle Exposition von Bauernhof- und Landkindern?
3. Sind gegen Asthma und atopische Sensibilisierung geschützte Bauernhofkinder bestimmten Bakterien vermehrt ausgesetzt?

Die Beantwortung der letzteren Frage führt zu einer wissenschaftlich begründeten Selektion von Testorganismen zur Prüfung Asthma- und Atopieprotektiver Eigenschaften im Tierversuch.

2 Stand der Forschung

2.1 Asthma- und Atopieproblematik

Asthma bronchiale ist eine entzündliche obstruktive Atemwegserkrankung. Klinisch manifestiert sich Asthma in Anfällen von Luftnot, Husten, Giemen und Thoraxenge infolge variabler und reversibler Bronchialverengung und bronchialer Hyperreaktivität (Pschyrembel et al., 2007). Die Atopie, vom griechischen „atopos“ (fehl am Platze) abgeleitet, ist eine Bezeichnung für die genetische Prädisposition für verschiedene klinische Manifestation der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I der Allergie; Pschyrembel et al., 2007). Zu den atopischen Erkrankungen zählen z.B. die allergische Rhinitis (chronische Entzündung der Nasenschleimhaut) und das atopische Ekzem. Asthma und Atopie gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen bei Kindern der westlichen Welt (Sennhauser et al., 2005). Nach Angaben der WHO (2007) ist Asthma die am meisten verbreitete chronische Krankheit unter Kindern mit weltweit über 300 Millionen Betroffenen. In den letzten 50 Jahren ist das Vorkommen von Asthma und atopischen Erkrankungen enorm gestiegen (Liu, 2007; Beasley et al., 2000). Dieser Anstieg insbesondere in Ballungsgebieten deutet darauf hin, dass Veränderungen in modernen Umgebungen und/oder Veränderungen des Lebensstils diesen Trend bewirken (Liu, 2007).

Die durch Asthma hervorgerufenen Todesfälle werden in den nächsten 10 Jahren voraussichtlich von derzeit 250.000 pro Jahr um weitere 20 % steigen (WHO, 2007). Von der WAO (2007) werden die jährlich für die Therapie anfallenden Kosten zurzeit auf 20 Milliarden US-Dollar geschätzt. Aufgrund dieser Fakten besteht ein großes Interesse an einer effektiven Vorbeugung zur Vermeidung von Asthma und atopischen Erkrankungen.

2.1.1 Pathogenese

Gründe für die Entstehung von Asthma und Atopie sind vermutlich in einer Veränderung der Th-Immunantwort zu finden. Beim ungeborenen und neugeborenen Kind ist das Gleichgewicht von Th1/Th2 in Richtung Th2-Zellen verschoben. Sie schützen das ungeborene Kind vor einer Abstoßungsreaktion durch die Mutter (Adkins, 2000; Adkins et al., 2004; Prescott et al., 1998). Innerhalb des ersten Lebensjahres pendelt sich beim gesunden Kind das Verhältnis der Th-Zellen

zugunsten der Th1-Zellen ein. Bei Asthma- und Atopiepatienten wurde jedoch wiederholt eine in Richtung Th2 verschobene Immunantwort beobachtet (Holt, 1996; Harylowicz und O'Garra, 2005). Th1 und Th2 unterscheiden sich darin, dass sie unterschiedliche Zytokine freisetzen: Th1 bildet z.B. IL-2, IL-12 und IFN- γ , Th2 dagegen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (Harylowicz und O'Garra, 2005). Bei Atopie beispielsweise führen die durch eine verstärkte Th2-Immunantwort freigesetzten IL-4 und IL-13 zu einem Isotypenwechsel von IgM zu IgE und somit zu einer verstärkten Produktion von IgE durch B-Zellen (Harylowicz und O'Garra, 2005; Abbildung 1). Diese IgEs werden über den hoch affinen Fc- ϵ -Rezeptor auf Mastzellen gebunden, was bei Kontakt mit dem Allergen zur Quervernetzung dieser Rezeptoren und dadurch zur Freisetzung verschiedener Mediatoren führt (u.a. Histamin, Chemo- und Zytokinen; Taylor et al., 2004). Diese Mediatoren vermitteln ihrerseits eine erhöhte Mukussekretion durch die Becherzellen, eine Kontraktion der glatten Muskulatur, eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit und eine Entzündungsreaktion, die das Anlocken weiterer Zellen wie z.B. der Eosinophilen zur Folge hat (Abbildung 1).

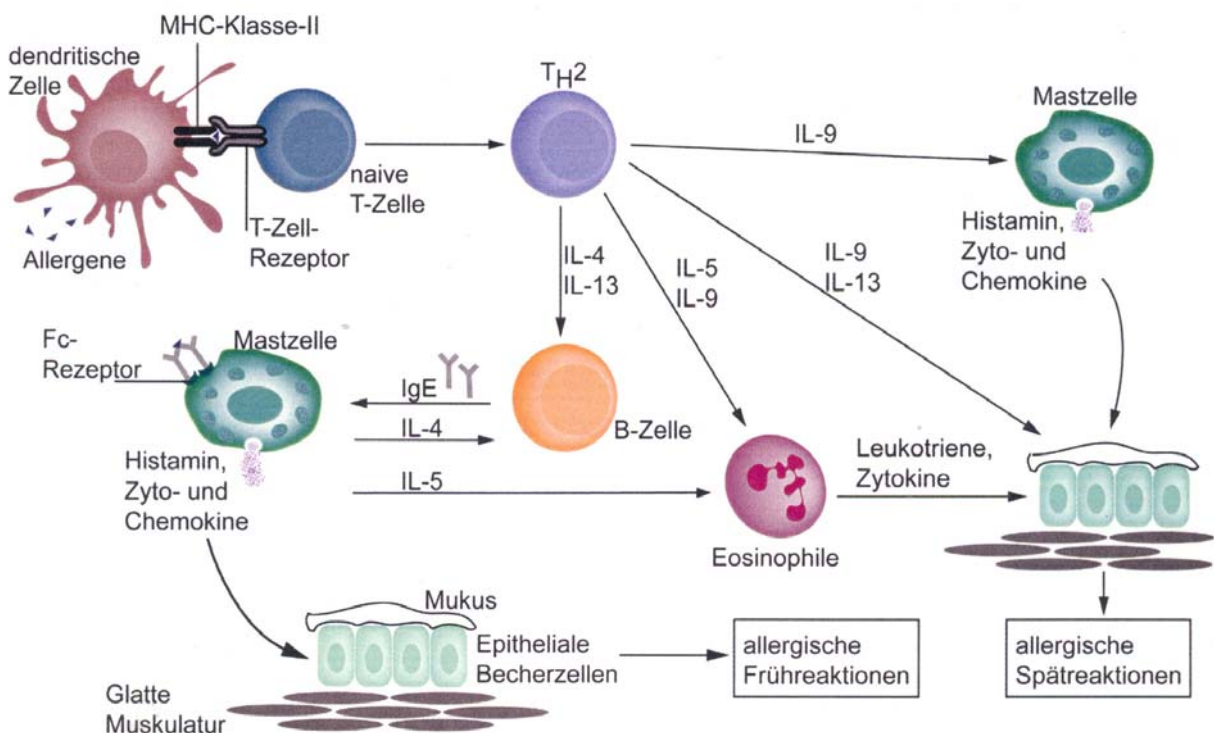


Abbildung 1: Mechanismen der allergischen Reaktion (Debarry, 2007)

Vieles spricht dafür, dass Infektionskrankheiten in den ersten drei Lebensjahren die Th1-Zellbildung fördern und damit das Asthma- und Atopierisiko sinkt (von Mutius, 2001). Der heute im Gegensatz zu früher wesentlich verbesserte Hygiene-Status der

westlichen Welt scheint jedoch dazu zu führen, dass es immer weniger häufig zu Infektionskrankheiten kommt (Stanwell-Smith, 2003). Damit fehlen die Signale für eine Th1-Zellbildung und somit dominieren bei Kindern, die später Asthma und Allergien entwickeln, auch weiterhin die Th2-Zellen.

2.1.2 Hygiene Hypothese

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Hygiene im allerweitesten Sinne und der Entwicklung von Asthma und Allergien wurde in den 80er Jahren erstmals diskutiert und als so genannte „Hygiene-Hypothese“ postuliert. Sie beruhte auf der Beobachtung, dass Personen, die viele ältere Geschwister haben, ein geringeres Risiko aufweisen, an Allergien zu erkranken als Einzelkinder (Strachan, 1989). Demnach scheinen Infektionen in der frühen Kindheit, verursacht durch Kontakt mit älteren Geschwistern oder durch Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft, die Entwicklung von allergischen Krankheiten zu verhindern. Diese Beobachtung ist in zahlreichen Studien immer wieder bestätigt worden (von Mutius, 2007). In den letzten Jahren hat diese Hypothese zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen und wurde auf verschiedene Bereiche ausgedehnt: Einerseits auf die Frage, ob bestimmte Infektionskrankheiten diesen Schutz induzieren könnten, inwieweit Infektionen und Umweltexposition einen Effekt auf die angeborene und erworbene Immunität haben und schließlich ob die Exposition gegenüber mikrobiellen Komponenten in der Umwelt diesen Schutz bewirken könnten (von Mutius, 2007). So wurden seit 1999 zahlreiche Studien zur Umweltexposition von Kindern im ländlichen Raum weltweit, insbesondere aber in Europa, durchgeführt (Riedler et al., 2001; Leynaert et al., 2001; Filipiak et al., 2001; Wickens et al., 2002; Klintberg et al., 2001; Chrischilles et al., 2004; Kilpelainen et al., 2002; Downs et al., 2001; Ernst und Cormier, 2000; Kilpelainen et al., 2000; Eduard et al., 2004; Chatzi et al., 2005; von Ehrenstein et al., 2000). Alle diese Studien zeigten, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, weniger häufig an Asthma und Allergien erkranken. Der Grund für diesen Zusammenhang ist noch unbekannt, aber man vermutet, dass Mikroorganismen diesen Effekt herbeiführen. Erste Anhaltspunkte für diese Vermutung lieferten die ALEX-Studie und die PARSIFAL-Studie, in denen u.a. gezeigt wurde, dass der Gehalt an mikrobiellen Komponenten in Matratzen von Bauernhofkindern invers mit dem Krankheitsbild bezogen war.

2.1.3 Mikrobielle Exposition unterschiedlicher Populationen

Die ALEX-Studie war eine Querschnitts-Erfassung der Umweltexpositionen von Kindern in ländlichen Räumen aus Österreich, Deutschland und der Schweiz. Alle diese Regionen waren ähnlich in Bezug auf Bevölkerungsdichte und Betriebsmerkmale; die meisten Höfe waren kleine Familienbetriebe und 98 % der Betriebe hatten Kühe, Schweine, Schafe, Geflügel, Pferde oder Ziegen (Riedler et al., 2001). Als Studienpopulationen dienten Bauernhofkinder und Kinder aus derselben ländlichen Region ohne Bauernhofkontakt (Landkinder). Es sollte insbesondere der Zusammenhang zwischen Endotoxin-Exposition und dem Vorkommen von Allergien und Asthma untersucht werden.

Neben Stallstaub und Haushaltsstaub vom Fußboden wurden auch Matratzenstäube von jedem Kind gewonnen (Waser et al., 2004). Aus den Stäuben wurde neben dem Endotoxin-Gehalt auch der N-Acetylmuraminsäure-Gehalt bestimmt (Braun-Fahrländer et al., 2002; van Strien et al., 2004). Matratzenstaub zur Bestimmung der mikrobiellen Umweltexposition von Kindern wurde gewählt, da die Endotoxin-Gehalte in Matratzen weniger schwankten als bei Boden- und Stallproben (Park et al., 2000). Des Weiteren bot Matratzenstaub ein einheitliches Probenmaterial sowohl für Bauernhof- als auch Landkinder (Waser et al., 2004).

Braun-Fahrländer et al. (2002) zeigten, dass der Endotoxin-Gehalt von Matratzenstäuben der Bauernhofkinder invers bezogen war zum Vorkommen von Heuschnupfen, atopischem Asthma und atopischer Sensibilisierung. Ähnliche Ergebnisse ließen erkennen, dass bei höherem N-Acetylmuraminsäure-Gehalt in der Matratze das Vorkommen von Giemen und Asthma niedriger war (van Strien et al., 2004). Zudem war der Gehalt an N-Acetylmuraminsäure in den Matratzen von Bauernhofkindern deutlich höher als bei Landkindern (van Strien et al., 2004). In einer Studie von von Mutius et al. (2000) wurde ebenfalls gezeigt, dass der Endotoxin-Gehalt in den Matratzenstäuben von Bauernhofkindern höher war als der von Landkindern, was durch eine vermehrte Aktivität der Kinder wie z.B. spielen in den Ställen und Scheunen oder helfen bei der Ernte bedingt sein kann (Waser et al., 2004).

Im Rahmen der ALEX-Studie wurden auch mit Kultivierungsverfahren Bakterienisolate von Stallstäuben gewonnen. Hierbei zeigte sich, dass *Acinetobacter lwoffii* und *Lactococcus lactis* als dominante Mikroorganismen in Ställen vorhanden waren. Beide Organismen agierten in einem Mausmodell hoch protektiv gegen

allergisches Asthma (Debarry et al., 2007). Da jedoch nur Stallstäube untersucht wurden, konnte kein Vergleich der mikrobiellen Exposition von Bauernhofkindern zu Landkindern getroffen werden.

Die PARSIFAL-Studie war eine Querschnitts-Erfassung der Umweltexposition von Kindern in ländlichen Räumen in Schweden, den Niederlanden, Österreich, Schweiz und Deutschland. Als Studienpopulation dienten 4 verschiedene Gruppen: (1) Kinder, die auf Bauernhöfen lebten, (2) Kinder, die in denselben ländlichen Gegenden, aber nicht auf einem Bauernhof lebten (Referenzgruppe zu 1), (3) Waldorf-Schüler aus urbanen und suburbanen Gegenden, (4) Kinder, die keine Waldorf-Schule besuchten, aber aus denselben urbanen und suburbanen Gegenden stammten, wie die Waldorf-Schüler (Referenzgruppe zu 3). Es sollten die Zusammenhänge zwischen Umwelt- und Lebensstil-Faktoren mit Allergien und Asthma untersucht werden. Das Ziel von PARSIFAL war, Faktoren ausfindig zu machen, die im Vergleich zu den Kontrollgruppen charakteristisch für Landwirtschaft und Waldorf-Schüler sind und möglicherweise einen protektiven Effekt auf die Entstehung von atopischen Krankheiten bei Kindern haben. Wie in der ALEX-Studie wurden auch hier Stäube von Kindermatratzen und Wohnräumen gesammelt. Dabei wurden neben dem Endotoxin-Gehalt in den Stäuben auch diverse Pilz-Komponenten wie Glucane und EPS bestimmt. Es wurde hierbei ein höherer Gehalt an Endotoxin in Matratzenstäuben als in Stallstäuben festgestellt (Schram et al., 2005). Auch EPS und Glucane lagen höher konzentriert vor als in den Kontrollgruppen. Bei Bauernhofkindern war der Gehalt 1,2 bis 3,2-fach höher als bei Landkindern. Matratzen von Waldorf-Schülern zeigten einen 1,1 bis 1,6-fach höheren Wert verglichen mit Nicht-Waldorf-Schülern. Diese Unterschiede wurden konsistent in allen untersuchten Ländern beobachtet. Auch die Verschiedenheiten zwischen den Gruppen waren in den oben genannten Ländern signifikant. Schram-Bijkerk et al. (2005) untersuchten den Zusammenhang zwischen den mikrobiellen Komponenten in Matratzenstäuben und dem Vorkommen von Kindern mit atopischem Giemen. Es zeigte sich, dass der Durchschnittswert von Endotoxin, EPS und Glucanen in Matratzenstäuben von gesunden Kindern 1,1 bis 1,2-fach höher ($p < 0,10$) lag als in den Kontrollgruppen mit atopischem Giemen. Der Gehalt an Matratzenstaub-Endotoxin, -EPS und -Glucanen war hierbei invers mit dem Vorkommen des Krankheitsbildes bezogen.

2.2 Verfahren zur Bestimmung mikrobieller Exposition

2.2.1 Bestimmung mikrobieller Komponenten

Bisher wurden fast ausschließlich bakterielle und pilzliche Komponenten zur Bestimmung der mikrobiellen Exposition von Kindern im ländlichen Raum angewandt (Kapitel 2.1.3). Eine sehr häufig für Expositionsstudien bestimmte mikrobielle Komponente ist das Endotoxin. Zu dessen Nachweis wird überwiegend der LAL-Test eingesetzt. Er beruht darauf, dass die Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) in Gegenwart von Endotoxinen ein Gel bildet. Mit dieser Methode kann die Gesamtheit Gram-negativen Bakterien erfasst werden, nicht jedoch Gram-positive Bakterien oder Pilze (Waser et al., 2004). Des Weiteren ist keine qualitative Aussage zur Bestimmung von einzelnen Spezies möglich.

2.2.2 Kultivierungsverfahren

Die Anzucht von Mikroorganismen auf Nährmedien unter speziellen Kultivierungsbedingungen ist sicherlich einer der am weitest verbreitete Nachweis von Mikroorganismen. Diese Methodik ist z.B. in der Qualitätssicherung von Lebensmitteln und Pharmaka nach wie vor das gängige und sehr erfolgreiche Nachweisverfahren für Bakterien und Pilze in den Produkten. Allerdings wurde festgestellt, dass die mikrobielle Diversität unvollständig erfasst wird, wenn kulturelle Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen in Umweltproben angewandt werden (Wagner et al., 1993; Amann et al., 1995). Die wichtigste Einschränkung dieser Verfahren besteht darin, dass jedes mikrobiologische Kultivierungsverfahren eine spezifische Selektivität aufweist. Unter den gewählten Bedingungen (Nährmedienzusammensetzung, Temperatur, Zeitintervall, Gasatmosphäre, etc.) kann nur der vermehrungsfähige Anteil der Organismen erfasst werden. Viele mikroskopisch sichtbare Zellen sind lebensfähig, formen jedoch keine Kolonien auf entsprechenden Kulturplatten (Amann et al., 1995). Den Kultivierungsbedingungen kommt dabei eine wesentliche Bedeutung zu, da die Auswahl der Nährmedien dazu führt, dass bestimmte Populationen von Mikroorganismen nicht erfasst oder deren Konzentration unterschätzt wird (Nocker et al., 2007). Zudem verlangt die Identifizierung von Mikroorganismen Reinkulturen gefolgt von einer Reihe mikroskopischer, physiologischer, biochemischer und serologischer Tests (Amann et al., 1995).

Bis zum Beginn des PCR-Zeitalters in der mikrobiellen Ökologie, Ende der 80er Jahre, kannte man nur 12 große Bakteriengruppen (Divisionen), die alle durch Reinkulturen charakterisiert waren. Heute sind bereits mehr als 80 Divisionen mit über 50 großen Bakteriengruppen ohne bisher kultivierbare Vertreter erfasst worden (Rappe und Giovannoni, 2003). Davon sind über 471.792 unterschiedliche 16S rRNS-Sequenzen bekannt (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>; Stand Januar 2008). Die beeindruckend rasante Entdeckung neuer Sequenzen von Bakterien aus der Umwelt im Vergleich zu den mit Kultivierung gewonnenen Mikroorganismen ist in Abbildung 2 dargestellt. Innerhalb von 10 Jahren Forschung stieg die Anzahl bekannter Bakterien in der Umwelt von ca. 10.000 auf mehr als 180.000 Mikroorganismen, wobei nur ca. 60.000 durch Kultivierungsverfahren identifiziert wurden. Der größte Teil wurde durch kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden bekannt (Schmidt, 2006).

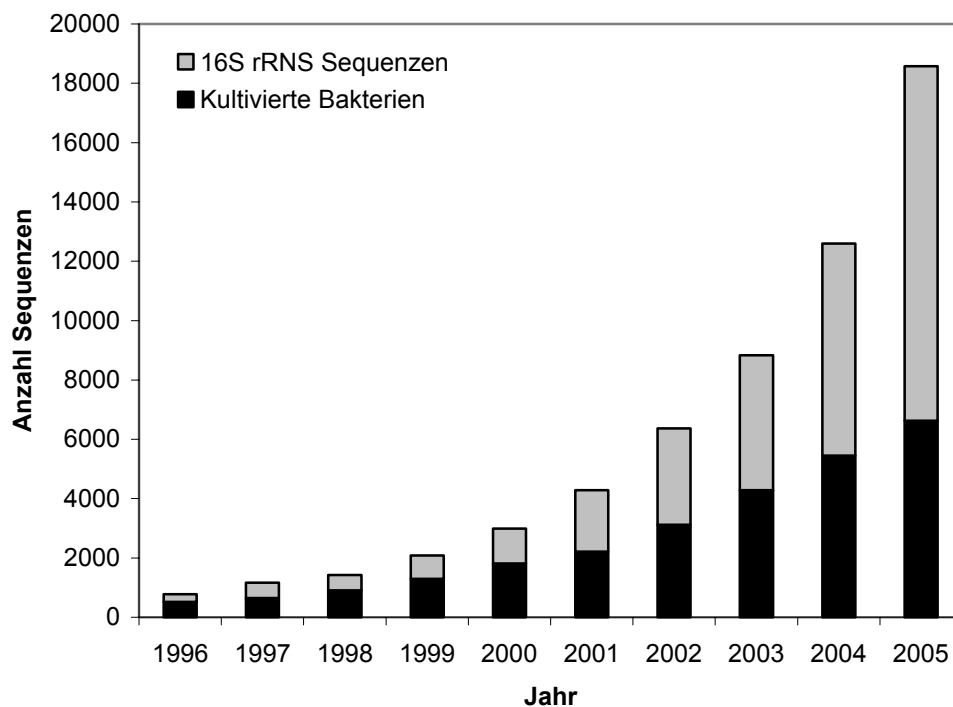


Abbildung 2: Vergleich der Anzahl von 16S rRNS Sequenzen von Bakterien aus der Umwelt zu durch Kultivierung identifizierten Mikroorganismen (modifiziert nach Schmidt, 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Pilotstudie

Staubproben wurden im Frühling 2006 in Bayern von 26 Bauernhöfen mit freiwilligen Teilnehmern genommen:

- Matratzen von 63 Kindern wurden 3 min lang nach einem Standardprotokoll abgesaugt und die Stäube in einem speziellen Nylonfilter aufgefangen (Schram-Bijkerk et al., 2005).
- In 24 Kuhställen und 10 Schweineställen wurde mit einem sterilen Pinsel Sedimentstaub gesammelt.

3.1.2 Lagerungsversuch

Matratzen einer Bauernhoffamilie (Mutter, Vater und ein Kind) wurden im Juli 2005 jeweils im oberen und unteren Bereich abgesaugt, in speziellen Nylonfiltern aufgefangen und 18 Monate bei -20 °C gelagert.

3.1.3 PARSIFAL-Studie

Als Studienpopulation dienten Matratzenstäube der deutschen Sektion der PARSIFAL-Studie. Die Matratzenstäube wurden ebenfalls 3 min lang nach einem Standardprotokoll gewonnen (Schram-Bijkerk et al., 2005). Insgesamt wurden Matratzenstäube von Kindern aus 4 Gruppen untersucht:

- 258 Bauernhofkinder
- 76 Landkinder
- 81 Waldorf-Schülern
- 107 Nicht-Waldorf-Schülern

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung

Aliquote der Staubproben wurden in PBS-Puffer suspendiert und eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt. 100 µl dieser Suspensionen wurden auf folgende Nährmedien ausplattiert:

- Blutagar (Merck, Deutschland) mit 5 % Schafsblut (Fiebig Nährstofftechnik, Deutschland): Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen sowie Kultivierung von *Bacillus* spp.
- CATC-Agar (Merck, Deutschland): Kultivierung von *Enterococcus* spp.
- MRS-Agar (Merck, Deutschland): Kultivierung von *Lactobacillus* spp.
- Schädler-Agar (BD, Deutschland): Kultivierung von *Clostridium* spp.
- Gassner-Agar (Merck, Deutschland): Kultivierung von coliformen Bakterien
- DG 18-Agar (Oxoid, Deutschland): Kultivierung von Pilzen
- Sabouraud-Agar (Merck, Deutschland): Kultivierung von Pilzen

Blutagarplatten zur Bestimmung von aeroben Gesamtkeimzahlen und *Bacillus* spp. sowie CATC- und Gassner-Agarplatten wurden 24 h bei 37 °C bebrütet. Blutagarplatten für die Erfassung der anaeroben Gesamtkeimzahlen und MRS-Agarplatten wurden 48 h bei 37 °C anaerob inkubiert. Schädler-Agar wurde 24 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet. DG 18- und Sabouraud-Agarplatten wurden 24 h bei 30 °C bebrütet gefolgt von einer einwöchigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Keimzahlen wurden als KbE/g bestimmt. Von den bebrüteten Platten wurden mehrere Einzelkolonien mit unterschiedlichem Aussehen subkultiviert. Dabei wurden insgesamt 783 Isolate gewonnen, mit konventionellen mikrobiologischen Methoden (Gram-Färbung, Prüfung der biochemischen Leistungsfähigkeit) differenziert und kryokonserviert.

3.2.2 DNS-Extraktion

Um die Mikroorganismen von den Staubpartikeln zu lösen, wurde zu je 150 mg Matratzenstaub 2,85 ml PBS gegeben und bei 350 rpm 30 min geschüttelt. Große Staubpartikel wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 200 x g entfernt. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Gefäß nach Eppendorf Art überführt und bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert, um ein Sediment mit Bakterienzellen zu erhalten, welches für die Extraktion der DNS verwendet wurde (Publikationen 1 bis 3).

Die Extraktion der DNS wurde nach Somerville et al. (2005) mit minimalen Modifizierungen durchgeführt. In Kürze: Nach Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) Behandlung wurden 600 µl der wässrigen Phase in ein 1,5 ml Gefäß nach Eppendorf Art überführt, 2 µl Glycogen und 600 µl eiskaltes Isopropanol (100 %) hinzugefügt, vermischt und bei 16.000 x g 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in

600 µl 70 % Ethanol (Vol./ Vol.) gewaschen und nochmals bei 16.000 x g 2 min zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol entfernt und das DNS-Pellet in 30 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst (Publikationen 1 bis 3).

3.2.3 Sequenz-spezifische real-time PCR

In dieser Arbeit wurde das Prinzip des FRET zur Detektion des *iap*-Gens von *Listeria monocytogenes* eingesetzt (Publikation 1). Es wurden sowohl Stäube der Pilotstudie als auch die der PARSIFAL-Studie analysiert (Kapitel 3.1).

Um die Sensitivität der real-time PCR zu bestimmen, wurde DNS von γ -bestrahlten (22 Stunden bei 26 kGy), mit *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Verdünnungen versetzten Stäuben extrahiert und mit dem Verfahren amplifiziert. Parallel dazu wurden die KbE/g Staub aller Proben bestimmt. Das Experiment wurde im Dreifachansatz durchgeführt (Publikation 1).

3.2.4 Vergleich von DGGE und PCR-SSCP

DGGE wurde am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) und SSCP and der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) nach den dort bestehenden Verfahren für die Analyse von Bodenproben durchgeführt (Muyzer et al., 2004; Dohrmann und Tebbe, 2004). Dazu wurde DNS sowohl aus Reinkulturen von *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Enterococcus faecalis* DSM 20478, *Lactobacillus casei* (Lehrstuhl eigene Stammsammlung), *Bacillus subtilis* (Lehrstuhl eigene Stammsammlung) und *Clostridium perfringens* als auch von Matratzenstäuben (oberer und unterer Bereich der Matratze) zweier Bauernhofkinder und eines Landkindes extrahiert und dem jeweiligen Verfahren unterzogen.

3.2.5 PCR-SSCP für Staubanalysen

Die Bestimmung von mikrobiellen Diversitäten in Stäuben wurde mit PCR-SSCP durchgeführt (Publikation 3). PCR-SSCP ist ein molekularbiologisches Finger-
printverfahren, das der Erfassung von mikrobiellen Diversitäten in unterschiedlichen Probenmaterialien dient (Schwieger und Tebbe, 1998).

Bei dieser Technik wurde nach Isolierung der bakteriellen DNS ein Fragment (~400 Basenpaare) des 16S rRNS Gens (variable Region 4 und 5) durch eine PCR amplifiziert. Die Primersequenzen waren dabei so gewählt, dass sie möglichst an hoch konservierten Bereichen des 16S rRNS Gens binden. Die zu vervielfältigende

Nukleinsäuresequenz zwischen den beiden Primern war gleichlang und artspezifisch. Der eingesetzte reverse Primer war am 5'-Ende phosphoryliert. Dieser Phosphatrest bildete den Angriffspunkt für ein Enzym, die Lambda-Exonuklease, welches den phosphorylierten Strang in 5'-3'-Richtung selektiv verdaute. Die verbleibenden nicht phosphorylierten DNS-Einzelstränge („single strands“) wiesen unter nicht denaturierenden Bedingungen (sogenannte native Bedingungen) Formvariabilitäten („conformation polymorphism“) auf, die sequenz-spezifisch waren. Über ein natives Polyacrylamidgel konnten diese unterschiedlichen Konformationen voneinander getrennt werden. Anschließend wurden die einzelsträngigen DNS-Banden mit einer Silberfärbung im Gel sichtbar gemacht, eingescannt und mittels einer speziellen Software (GelCompare[®] II) normalisiert und ausgewertet. Durch densitometrische Analyse der digitalisierten Bandenmuster (1 bis 670 mögliche Positionen) von mikrobiellen Gemeinschaften in Stäuben wurde festgestellt, welche Banden gemeinsam (Stall versus Matratze) bzw. unterschiedlich (PARSIFAL-Gruppen 1 bis 4) waren. Eine Auswahl dieser Banden wurde aus den Gelen ausgeschnitten, kloniert und sequenziert (Abbildung 1). Die Identifizierung der 16S rRNA-Sequenzen erfolgte über das im Internet verfügbare Auswertungsprogramm Ribosomal Database Project. Ein Überblick der Methode ist in Abbildung 3 dargestellt.

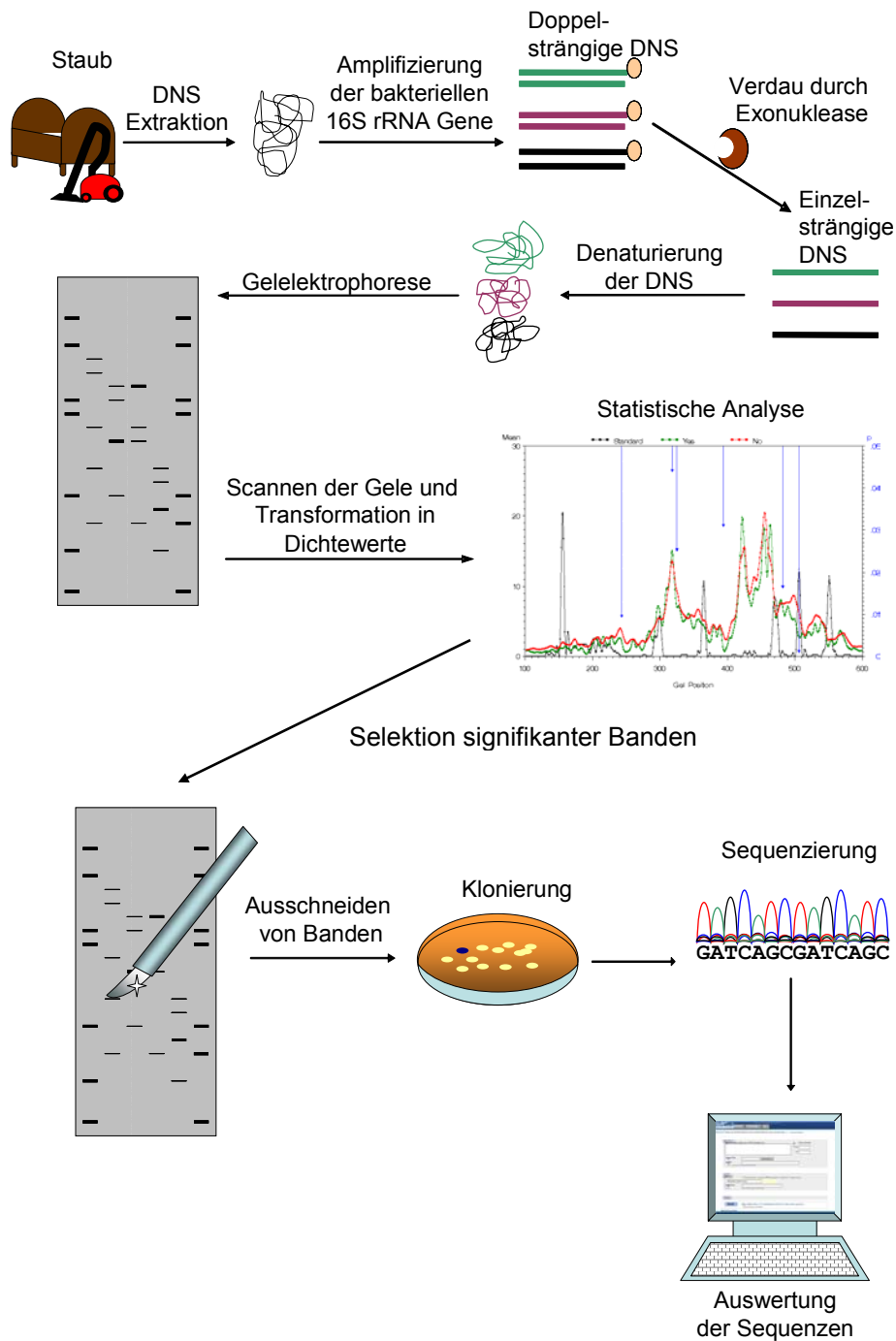


Abbildung 3: Analysen- und Auswertungsschema von PCR-SSCP

3.2.5.1 Modifizierung

Für die Anwendung der PCR-SSCP-Methode nach Schwieger und Tebbe (1998) auf bakterielle Gemeinschaften in Stäuben, waren Modifizierungen notwendig (Publikation 3). Um die besten elektrophoretischen Bedingungen für die

Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften in Stäuben mit SSCP zu etablieren, wurde von 10 phylogenetisch verschiedenen Bakterien die Einzelstrang-DNS analysiert. Dazu wurden diese in 30 bis 40 %igen MDE-Gelen (MDE-Lösung, Cambrex, Belgien), die in einer PerfectBlue Dual Gel System Twin L Kammer (Peqlab, Deutschland) unter Verwendung von 0,4 mm dicken Abstandshaltern und Kämmen gegossen wurden, für jeweils 13 bis 18 Stunden bei 20 °C und 400 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.5.2 Methodvalidierung

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu untersuchen, wurde je eine Staubprobe aus einer Matratze, einem Kuhstall, einem Schweinestall, einem Pferdestall und einem Hühnerstall gut homogenisiert, die DNS von jeder Probe jeweils fünffach extrahiert und mit PCR-SSCP untersucht. Für die Bestimmung der Tag zu Tag Variation der Methode wurde die DNS eines Matratzenstaubes an je fünf Tagen extrahiert und PCR-SSCP durchgeführt. Gel zu Gel Schwankungen wurden durch Auftragen von Einzelstrang-DNS eines Matratzenstaubes auf 5 verschiedenen Gelen untersucht. Die Ähnlichkeiten der SSCP-Profile wurden als Pearson Korrelations Koeffizient (%) mit der GelCompare II Software (Applied Maths, Belgien) berechnet. Für die Validierung der Sensitivität des Nachweises von Mikroorganismen in Stäuben durch PCR-SSCP wurden je 21 Stäube zu 150 mg γ -bestrahlt (26 kGy, 22 h) und 7 Verdünnungen in einem Bereich von 10^8 bis 10^2 KbE/ml von je *Listeria monocytogenes* (Gram-positiv), *Bacillus licheniformis* mit 30 % Sporenteil und *Escherichia coli* (Gram-negativ) dazugegeben (Publikation 3). Von diesen Proben wurde die DNS extrahiert und dem PCR-SSCP Verfahren unterzogen.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ege (Dr. von Hauner'sches Kinderspital) durchgeführt. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen dem kulturell bestimmten Vorkommen von Mikroorganismen in Stall- und Matratzenstäuben wurden Signifikanzen mit dem „Student's unpaired t-test“ analysiert. Die Übereinstimmung zwischen dem Vorkommen von *Listeria* spp. in Stäuben von Ställen und Matratzen wurde als Kappa Koeffizient (κ [95 %- Konfidenz Intervall]) berechnet (Publikation 1).

Zur epidemiologischen Auswertung der SSCP-Gele wurden die mit GelCompare[®]

berechneten Dichtewerte der SSCP-Banden als kontinuierliche Variablen verwendet, und die unterschiedlichen PARSIFAL-Gruppen (z.B. Bauernhofkinder versus Referenzkinder) unter Anwendung eines U-Tests miteinander verglichen. Für eine logistische Regression wurden die Variablen dichotomisiert. Als Abrissgrenze wurden 5 beliebige Dichteeinheiten gewählt, weil dabei die Bandensignale aus dem Hintergrundrauschen abgehoben wurden. Außerdem wurde eine Sensitivitätsanalyse für verschiedene Abrissgrenzen der Dichotomisierung von 0 bis 20 Dichteeinheiten durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden Banden bezüglich des Zusammenhangs mit dem Gesundheitszustand der Kinder bewertet. In einem zweiten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen Bauernhofexposition oder Bauernhof-Charakteristika bestimmt, und in einem dritten Schritt wurde überprüft, ob der Effekt der Bauernhofexposition auf Gesundheitszustand der Kinder direkt zustande gekommen war oder ob der Effekt durch das Vorhandensein der Banden vermittelt war.

Real-time PCR Ergebnisse zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in PARSIFAL-Stäuben wurden durch einen Pearson's Chi Quadrat Test bzw. einen Fischer's Exact Test analysiert und Odds Ratios berechnet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung von Mikroorganismen aus Stäuben

Aus Stäuben von Matratzen und Kuhställen wurden Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. sowie coliforme Bakterien und Pilze der Gattungen *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. und *Wallemia* spp. isoliert (Tabelle 1 und 2, Publikation 1 und 2).

Tabelle 1: Analyse der mikrobiellen Diversität in Stäuben aus Kuhställen und Kindermatratzen von 24 Bauernhöfen in Bayern.

Isolierte Mikroorganismen	Stall/Matratze			
	+/+	+/-	-/+	-/-
<i>Bacillus</i> spp.	24	0	0	0
Coliforme Bakterien	24	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp.	9	7	5	3
<i>Enterococcus</i> spp.	11	7	3	3
<i>Clostridium</i> spp.	9	6	3	6
<i>Aspergillus</i> spp.	23	1	0	0
<i>Mucor</i> spp.	21	2	1	0
<i>Cladosporium</i> spp.	10	4	3	7
<i>Penicillium</i> spp.	8	3	9	4
<i>Wallemia</i> spp.	16	3	4	1

+/+ = Mikroorganismen in Stall und Matratze nachweisbar

+/- = Mikroorganismen nur im Stall nachweisbar

-/+ = Mikroorganismen nur in der Matratze nachweisbar

-/- = Mikroorganismen weder im Stall noch in der Matratze nachweisbar

Dieser Eintrag an verschiedenen Mikroorganismen in Stallstaub kann durch unterschiedliche Tierspezies, Baubedingungen, Fütterung, saisonales Klima und tägliche Aktivitäten bedingt sein (Schierl et al., 2007). Den größten Beitrag leisten jedoch Tierfäkalien und Futtermittel (z.B. Silage), die eine hohe Diversität an Mikroorganismen aufweisen (Radon et al., 2002, Pahlow et al., 2003; Hobson et al.,

1997; Snell-Castro et al., 2005).

Die mikrobielle Diversität von Matratzenstäuben wird vor allem durch die Mikroorganismenflora der Haut geprägt, die wiederum durch die Individualhygiene beeinflusst wird (Dekio et al., 2005; Waser et al., 2004). Auch das Übernachten von Haustieren in den Betten der Kinder nimmt Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora des Matratzenstaubes (Waser et al., 2004). Überlagert wird das Ganze durch bestimmte Tätigkeiten oder Verhaltensweisen der Kinder, die mit einer verstärkten mikrobiellen Exposition einhergehen (z.B. Mithilfe bei der Ernte, Aufenthalt in Scheunen und Ställen). Es ist leicht nachvollziehbar, dass Kinder mikrobiell kontaminierten Staub aus diesen Bereichen mit ihrer Kleidung oder den Haaren in die Wohnräume transportieren (Waser et al., 2004). So wurde durch den Vergleich von Stall- und Matratzenstäuben festgestellt, dass sich die Stallexposition der Kinder zu einem gewissen Maße im Matratzenstaub widerspiegelt. Beispielsweise wurden auf allen untersuchten Bauernhöfen *Bacillus* spp. und coliforme Bakterien sowohl in Stallstäuben als auch in Matratzenstäuben gefunden (Tabelle 1 und Publikation 2). Auch wenn beide Keimgruppen in der Umwelt weit verbreitet sind, so kann dieses Ergebnis dennoch als ein Indiz dafür gewertet werden, dass Matratzenstaub die mikrobielle Umweltexposition des Menschen in einem gewissen Umfang widerspiegelt und somit als Probenmaterial für epidemiologische Untersuchungen als geeignet erscheint. Eine detaillierte Analyse von *Bacillus* spp. in allen gesammelten Stäuben ergab das Vorkommen von *Bacillus licheniformis* in 95 % der Proben, gefolgt von *Bacillus pumilus* (31 %), *Bacillus subtilis* (28 %) und *Bacillus cereus* (7 %) mit signifikant reduzierter Prävalenz (Publikation 2). Die Erkenntnis, dass *Bacillus licheniformis* ein dominantes Bakterium in Ställen und Matratzen ist, führte zu der Idee, dass diese Spezies ein möglicher Kandidat für Asthma- und Atopieprävention sein könnte. Erste *in vitro* und *in vivo* Expositions-Studien des Bakteriums zeigten viel versprechende Ergebnisse bezüglich dieser Eigenschaften (Publikation 2).

Es stellte sich jedoch die Frage, ob die Lagerung der Staubproben einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Lagerungsversuch über 18 Monate durchgeführt. Hier zeigte sich, dass selbst bei Aufbewahrung der Proben bei -20 °C der Großteil der vegetativen Bakterien schon nach 2 Monaten nicht mehr anzüchtbar war und nur noch Sporenbildner nachzuweisen waren (Abbildung 4).

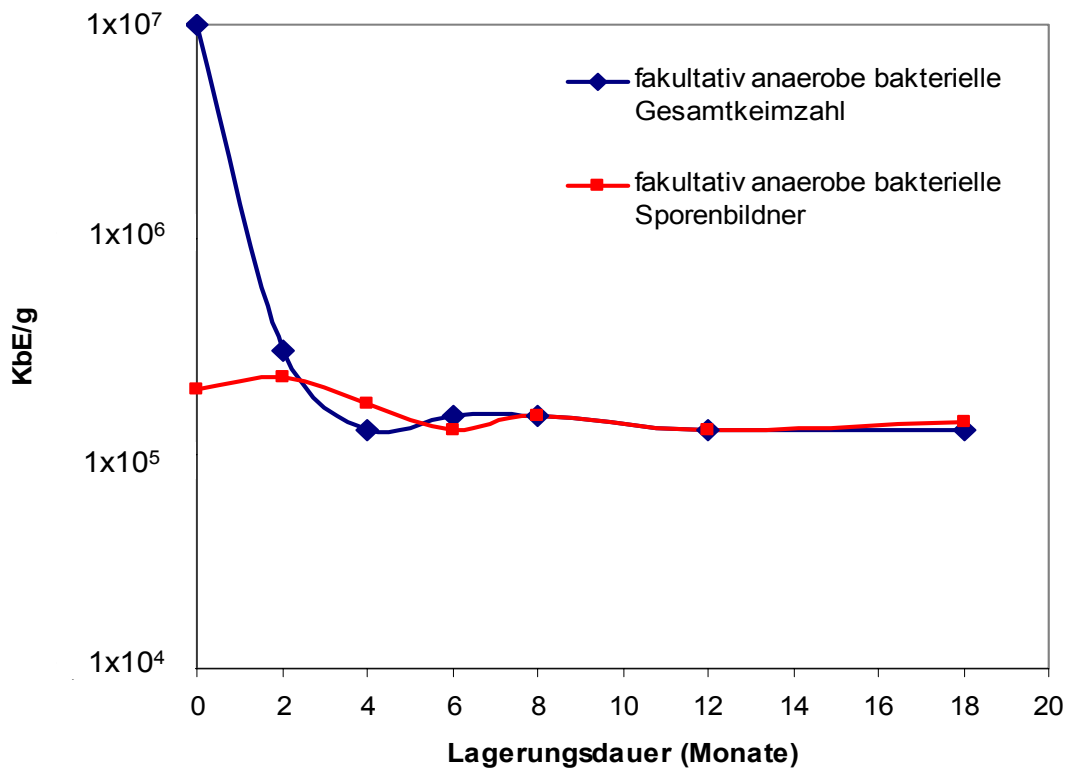


Abbildung 4: Verlauf der bakteriellen Keimzahlen von Matratzenstaub während einer Lagerungszeit von 18 Monaten bei -20 °C.

Da epidemiologische Untersuchungen auf großen Stichprobenzahlen beruhen, sind kulturelle Verfahren aufgrund des zeitlichen Arbeitsaufwandes wenig geeignet repräsentative Ergebnisse zu liefern. Wie gezeigt wurde, nimmt die Anzüchtbarkeit mit zunehmender Lagerdauer ab, so dass die Ergebnisse in qualitativer und quantitativer Hinsicht beeinträchtigt werden. Aus diesem Grunde wurde versucht, molekularbiologische Methoden einzusetzen, da DNS bei -20°C Lagerung stabil bleibt und zudem auch abgestorbene oder lebende aber nicht kultivierbare Mikroorganismen (VBNC) durch Nachweis von deren DNS identifiziert werden können (Young et al., 2007; Wery et al., 2006; Publikation 1).

4.2 Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Stäuben

Da *Listeria (L.) monocytogenes* auch im abgestorbenen Zustand die Entwicklung von allergischen Immunantworten *in vivo* durch IL-12 Freisetzung und Sekretion von IFN- γ inhibierte (Kapitel 2.1), sollte insbesondere das Vorkommen dieser Spezies genauer analysiert werden (Hansen et al., 2000). Zu diesem Zweck wurde in einer

Pilotstudie Stäube aus Ställen und Matratzen (Kapitel 3.1.1) kulturell und mit einem real-time PCR-Verfahren bezüglich des Vorkommens von *Listeria* spp. untersucht.

4.2.1 Kultivierungsverfahren

Mit Kultivierungsverfahren wurden *L. monocytogenes* in Matratzen- und Stallstäuben nachgewiesen (Kapitel 4.1 und Publikation 1). Da die direkte quantitative Erfassung dieses Bakteriums nach ISO 11290-2 kein Wachstum ergab, wurde der qualitative Nachweis nach ISO 11290-1 durchgeführt.

Kultivierbare *Listeria* spp. wurden in 5 von 63 (8 %) Matratzenstäuben erfasst. Dabei zeigte die Spezies Identifizierung durch API Tests und Multiplex-PCR in 5 Matratzen (8 %) das Vorkommen von *L. innocua* und in 2 Matratzen (3 %) die Präsenz von *L. monocytogenes* (Tabelle 2 und Publikation 1). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Untersuchungen von Wagner et al. (2007), die in 8,7 % von Küchenstäuben *Listeria* spp. nachwiesen; in 1,1 % aller Proben wurden hierbei *L. monocytogenes* erfasst.

Wie zu erwarten, wurden in Stallstäuben weitaus mehr *Listeria* spp. nachgewiesen als in Matratzenstäuben. So waren 11 von 40 Proben (28 %) *Listeria* spp. positiv. Dabei wurden *L. monocytogenes* in 6 Ställen identifiziert (15 %), *L. innocua* in 7 Proben (18 %) und *L. seeligeri* in nur einem Stallstaub (Tabelle 2 und Publikation 1). Die Bestimmung des Serotyps von *L. monocytogenes* ergab mit einer Ausnahme (Serotyp 4ab) in allen Isolaten den Serotyp 1/2a (Tabelle 2 und Publikation 1).

Tabelle 2: Nachweis von *Listeria* spp. in Matratzen- und Stallstäuben durch Kultivierung und real-time PCR.

Staubquelle	Probe	Kultivierung			<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> real-time PCR berechnete Genom Kopien pro 150 mg Staub
		<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (serotype)	<i>Listeria</i> <i>innocua</i>	<i>Listeria</i> <i>seeligeri</i>	
Schweinestall	220 SSt	-	+	-	n.d.
Matratze	448 K4	-	+	-	n.d.
Matratze	448 K5	-	+	-	938
Schweinestall	448 SSt	-	+	-	210
Kuhstall	484 KS	-	+	-	n.d.
Schweinestall	776 SSt	-	+	-	n.d.
Matratze	795 K2	-	+	-	n.d.
Kuhstall	133 KS	+ (1/2a)	-	+	n.d.
Matratze	413 K1	+ (1/2a)	+	-	435
Kuhstall	413 KS	+ (1/2a)	+	-	218
Kuhstall	510 KS	+ (1/2a)	-	-	450
Kuhstall	710 KS	-	+	-	n.d.
Kuhstall	863 KS1	+ (1/2a) and + (4ab)	-	-	n.d.
Kuhstall	863 KS2	+ (1/2a)	-	-	n.d.
Matratze	187 K3	+ (1/2a)	+	-	248
Kuhstall	969 KS	+ (1/2a)	+	-	n.d.

n.d. = nicht nachweisbar, Zahlen der Proben = Kodierungen der jeweiligen Familie, SSt = Schweinestall, K = Kindermatratze, KS = Kuhstall.

4.2.2 Real-time PCR

Für den Nachweis des *iap*-Gens von *L. monocytogenes* wurde das Verfahren nach Schwaiger et al. (2003) eingesetzt. Diese Methode wurde für die Matrix „Staub“ bezüglich Sensitivität validiert.

Um die Sensitivität der real-time PCR zu bestimmen, wurde DNS von γ -bestrahlten (22 Stunden bei 26 kGy) und anschließend mit *L. monocytogenes* in verschiedenen Verdünnungen versetzten Stäuben extrahiert und mit dem Verfahren amplifiziert. Parallel dazu wurden die KbE/g Staub aller Proben bestimmt. Das Experiment wurde im Dreifachansatz durchgeführt (Publikation 1). Alle Quantifizierungen basierten auf der Kalkulation, dass 1 ng bakterielle DNS 3×10^5 Kopien des Genoms (*L.*

monocytogenes Genomgröße 2,9 Mbp) entsprachen und nur eine Kopie des *iap*-Gens enthielten (Hein et al., 2001). Die Untersuchung zeigte, dass dieses Verfahren bis zu 2 KbE/mg Staub nachweisen kann (Tabelle 3 und Publikation 1).

Tabelle 3: Nachweisbarkeit von *L. monocytogenes* in Staubproben durch real-time PCR

KbE/mg	KbE/150 mg Staub	Berechnete Genomkopien pro 150 mg Staub
2×10^4	3×10^6	6270000
2×10^3	3×10^5	447990
2×10^2	3×10^4	31448
2×10^1	3×10^3	3810
2×10^0	3×10^2	308

Die Anwendung der Methode auf Stäube der Pilotstudie (Kapitel 3.1.1) zeigte, dass von 63 Matratzenstäuben 38 (60 %) das *L. monocytogenes* typische *iap*-Gen aufwiesen. Stallstäube hingegen zeigten in nur 28 % (12 von 43) der Fälle die Anwesenheit der DNS dieser Spezies (Publikation 1). Diese unerwartete Diskrepanz kann durch PCR-Inhibitoren wie Huminsäuren in den Stallstäuben erklärt werden (von Wintzingerode et al., 1997; Tebbe und Vahjen, 1993).

4.2.3 Vergleich mit Kultivierungsverfahren

Von insgesamt 103 Stäuben der Pilotstudie (Matratzen und Ställe) zeigten 53 ein übereinstimmendes Ergebnis mit real-time PCR und Kultivierung; 4 Proben (2 Matratzen und 2 Ställe) waren *L. monocytogenes* positiv und 49 (25 Matratzen und 24 Ställe) negativ bei Anwendung beider Verfahren (Tabelle 2). In 50 Stäuben konnte *L. monocytogenes* entweder nur mit real-time PCR (36 Matratzen und 10 Ställe) oder nur mit Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden (4 Ställe; Tabelle 4).

Tabelle 4: Vorkommen von *L. monocytogenes* in Matratzen- und Stallstäuben: Vergleich der Ergebnisse von Kultivierung und real-time PCR

Stäube	Real-time PCR / Kultivierung			
	+/+	-/-	+/-	-/+
Matratzen	2	25	36	0
Ställe	2	24	10	4
Summe	4	49	46	4

+ /+ = Stäube mit real-time PCR und Kultivierung positiv

-/- = Stäube mit real-time PCR und Kultivierung negativ

+/- = Stäube mit real-time PCR positiv und mit Kultivierung negativ

-/+ = Stäube mit real-time PCR negativ und mit Kultivierung positiv

Die Gründe für diese offensichtliche Diskrepanz sind vielfältig. Zum einen hat die inhomogene Verteilung der Bakterien und das unterschiedliche Vorkommen von PCR-Inhibitoren in Erde und Partikeln im Staub einen Einfluss auf die Ergebnisse (von Wintzingerode et al., 1997; Tebbe und Vahjen, 1993). Zum anderen werden, wie schon erwähnt, mittels PCR auch nicht kultivierbare Stadien (abgestorben und VBNC) nachgewiesen (Young et al., 2007; Wery et al., 2006). Es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* durch Umwelteinflüsse VBNC-Stadien entwickeln kann, was die Diskrepanz zwischen PCR-positiven und kulturell negativen Ergebnissen erklären kann (Besnard et al., 2002). Der Vergleich der PCR-Ergebnisse von Stall- und Matratzenstaub lieferte erneut einen Hinweis dafür, dass Matratzenstaub zumindest partiell die mikrobielle Exposition im Stall widerspiegelt. So konnte bei 21 von 26 Bauernhöfen *L. monocytogenes* sowohl in Stallstäuben als auch in Matratzenstäuben nachgewiesen werden, was einem Übereinstimmungs-Wert von $\kappa=0,59$ [0,26-0,91] entspricht (Publikation 1). Es gibt also eine Konkordanz zwischen dem Vorkommen von *L. monocytogenes* in Stäuben von Ställen und Matratzen, was auf einen Transfer von Mikroorganismen aus dem Stall zur Matratze hindeutet (Kapitel 4.1).

Durch die Anwendung von PCR oder real-time PCR alleine können einzelne Gene nachgewiesen, jedoch noch keine Aussagen zur mikrobiellen Diversität in Umweltproben getroffen werden. Daher werden die durch PCR vervielfältigten DNS-Fragmente häufig auch für molekulare Fingerprint-Techniken wie DGGE und PCR-SSCP verwendet. Hierbei wird meist mit dem Gen der 16S rRNS gearbeitet (Nocker et al., 2007).

4.3 Vergleich von DGGE mit PCR-SSCP

Um zu überprüfen, welches molekulare Fingerprint-Verfahren, DGGE oder PCR-SSCP, sich für die Analyse von Staubproben besser eignet, wurden diese miteinander verglichen. Dazu wurden beide Methoden für DNS von Bakterien-Reinkulturen und Matratzenstäuben von Kindern nach Vorgehensweisen für Bodenproben durchgeführt (Kapitel 3.2.4). Abbildung 5 zeigt den Vergleich der erstellten Gele.

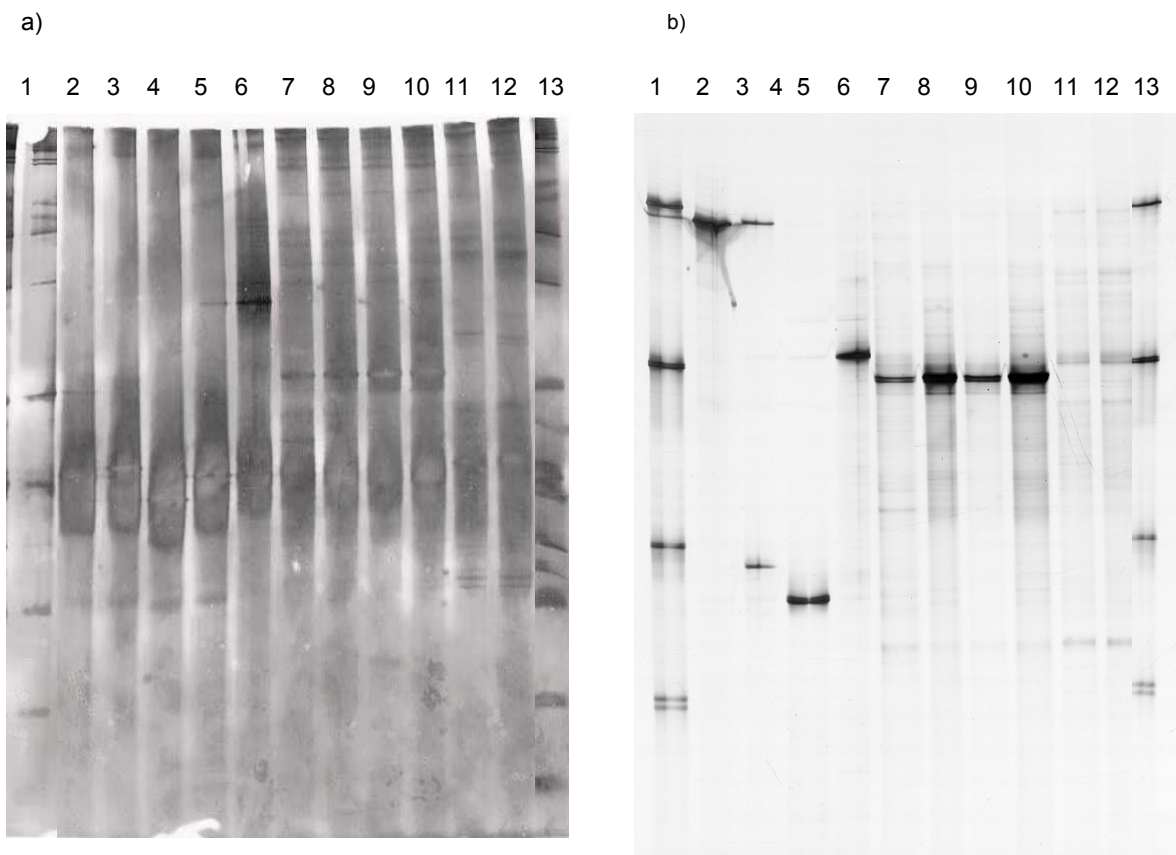


Abbildung 5: Vergleich von DGGE mit PCR-SSCP unter Verwendung gleicher Proben.

a) DGGE-Gel, b) PCR-SSCP-Gel, 1 = Standard, 2 = *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, 3 = *Enterococcus faecalis* DSM 20478, 4 = *Lactobacillus casei* (Lehrstuhl eigene Stammsammlung), 5 = *Bacillus subtilis* (Lehrstuhl eigene Stammsammlung), 6 = *Clostridium perfringens*, 7 = Matratzenstaub (Kopfbereich) von Bauernhofkind 1, 8 = Matratzenstaub (Fußbereich) von Bauernhofkind 1, 9 = Matratzenstaub (Kopfbereich) von Bauernhofkind 2, 10 = Matratzenstaub (Fußbereich) von Bauernhofkind 2, 11 = Matratzenstaub (Kopfbereich) von einem Landkind, 12 = Matratzenstaub (Fußbereich) von einem Landkind, 13 = Standard.

Die Diversität der Banden von Matratzenstaubproben war bei beiden Methoden in etwa gleich. Es waren jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Klarheit der Banden zu sehen. So waren die Einzelstrang-DNS der Reinkulturen im SSCP-Gel deutlich voneinander unterscheidbar, hingegen die gleichen Proben im DGGE-Gel nur sehr unscharf erkennbar. Auch die Intensität der Färbung des SSCP-Gels war besser als die des DGGE-Gels. Ähnliche Ergebnisse insbesondere was die Klarheit der Banden betraf, wurde bereits von Hori et al. (2006) berichtet. Des Weiteren braucht das Gießen eines Gradienten eine gewisse Erfahrung und ist nur schlecht reproduzierbar (Nocker et al., 2007). Eine gute Reproduzierbarkeit ist jedoch sehr wichtig für epidemiologische Studien. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit PCR-SSCP für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft in Stäuben gewählt.

Die Anwendung von PCR-SSCP nach einem Protokoll für Bodenproben zeigte jedoch, dass insbesondere die dominanten Banden sehr eng beieinander lagen. Eine gute Auftrennung ist aber wichtig, um die Überlagerung von Einzelsträngen zu minimieren. Auch das Ausschneiden definierter Banden aus den Gelen ist schwieriger, wenn diese eng beieinander liegen. Um dieses Problem zu minimieren, waren Modifizierungen bezüglich der Trennbedingungen notwendig.

4.4 Etablierung und Validierung von PCR-SSCP für Staubanalysen

4.4.1 Modifizierungen

Die Analyse der mikrobiellen Diversität in Stäuben mittels PCR-SSCP wurde bisher noch nicht durchgeführt. Um das Verfahren für diesen Zweck anwenden zu können, waren Modifizierungen notwendig. So musste die Methode nach Schwieger und Tebbe (1998) an die Laborgegebenheiten angepasst und die Ausstattung verändert werden, da die von Schwieger und Tebbe (1998) verwendeten Geräte teilweise nicht mehr erhältlich waren. Es wurde z. B. die vertikale Elektrophoresekammer PerfectBlue Dual Gel System Twin L (Peqlab, Deutschland) unter Verwendung von speziell gefertigten 0,4 mm dicken Abstandshaltern und Kämmen anstatt der vertikalen Elektrophorese Einheit MacroPhor (Amersham Biosciences Europe GmbH, Deutschland) verwendet. Weiterhin waren Modifizierungen der Trennbedingungen bei der vertikalen Elektrophorese notwendig.

Die systematische Variierung verschiedener Parameter zeigte, dass die beste Auflösung zur Differenzierung unterschiedlicher PCR-Produkte bei einer Laufzeit von 16 h und einer 31,7 %igen MDE-Gellösung erreicht wurde. Unter diesen Bedingungen bildeten 16S rRNS Gene in Einzelstrangform von 10 unterschiedlichen Bakterien, die in einer Bauernhofumgebung zu erwarten waren, Einzel- oder Doppelbanden (Abbildung 6), die deutlich zu unterscheiden waren. Doppelbanden können durch das Vorhandensein von mehreren rRNA Operons mit jeweils unterschiedlichen 16S rRNS-Genen innerhalb einer Baterspezies auftreten (Schmalenberger et al., 2001)

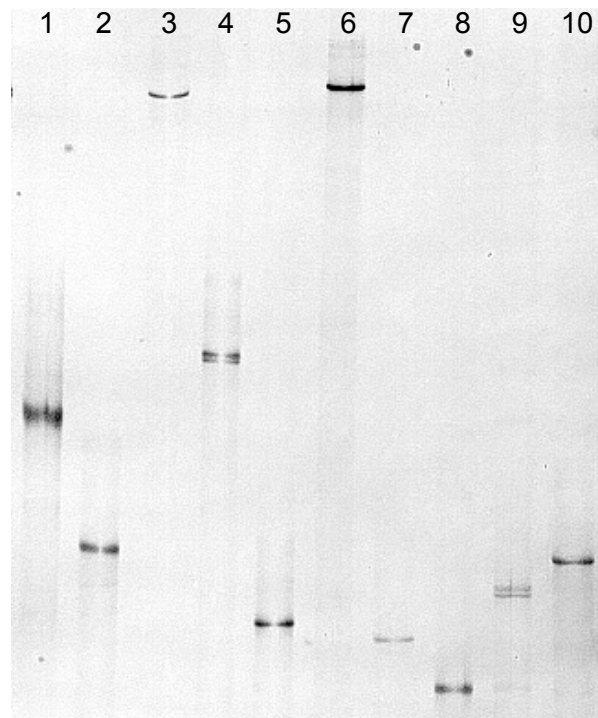


Abbildung 6: SSCP Banden von Einzelstrang-DNS verschiedener Reinkulturen von Bakterispezies nach Amplifizierung der 16S rRNA Gene.

1 = *Escherichia coli* , 2 = *Staphylococcus aureus*, 3 = *Listeria monocytogenes*, 4 = *Clostridium perfringens*, 5 = *Enterococcus faecalis*, 6 = *Bacillus licheniformis*, 7 = *Enterococcus faecium*, 8 = *Acinetobacter lwoffii*, 9 = *Lactobacillus plantarum*, 10 = *Lactobacillus acidophilus* .

4.4.2 Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Methode für Staubanalysen

Für epidemiologische Studien ist es wichtig, dass die angewandten Methoden robust sind und dass die Ergebnisse reproduzierbar sind. Gel-basierte molekulare Fingerprint Techniken wie DGGE und SSCP wurden jedoch von verschiedenen Autoren bezüglich der Reproduzierbarkeit in Frage gestellt (Hong et al., 2007; Nunan et al., 2005). Da entsprechende Validierungen bislang fehlten, wurde in dieser Arbeit die Reproduzierbarkeit von der SSCP-Technik getestet (Publikation 3).

Die fünffach wiederholte PCR-SSCP Analyse von je einem homogenisierten Kuhstall-, Schweinestall-, Hühnerstall-, Pferdestall- und Matratzenstaub zeigten für jede Staubprobe unterschiedlicher Herkunft nahezu gleiche Bandenprofile (Publikation 3 und Abbildung 7). Diese zeigten im Durchschnitt eine 89 bis 95 %ige Ähnlichkeit für jede Wiederholung (Publikation 3 und Tabelle 5).

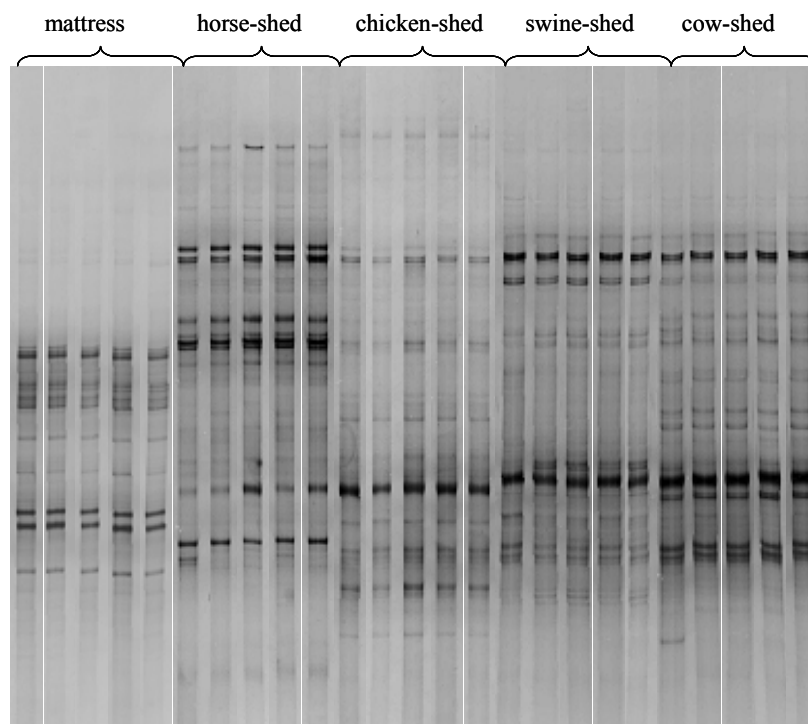


Abbildung 7: SSCP Bandenprofile von Staubproben unterschiedlicher Herkunft.

Tabelle 5: Einfluss des Faktors "DNS-Extraktion" auf die Ähnlichkeit der SSCP-Bandenprofile von jeweils einer Staubprobe unterschiedlicher Herkunft (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)). Anzahl der Analysen pro Staubprobe = 5.

Staubquelle	Durchschnittlicher Pearsons Korrelations Koeffizient (%)
Matratze	95.2 (SD=2.6)
Pferdestall	92.9 (SD=4.9)
Hühnerstall	89.7 (SD=6.2)
Schweinstall	92.9 (SD=3.0)
Kuhstall	90.4 (SD=6.2)

SD = Standardabweichung

Ähnlich hohe Reproduzierbarkeiten wurden bei der Analyse der Tagesschwankung erhalten, welche im Durchschnitt 87,2 % betrug (Publikation 3 und Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluss des Faktors "Tag" auf die Ähnlichkeit von SSCP-Bandenprofilen eines Matratzenstaubs (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)). Anzahl der Analysen pro Tag = 5.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Tag 1	100				
Tag 2	78.7	100			
Tag 3	92.2	89.7	100		
Tag 4	92.0	88.0	93.2	100	
Tag 5	86.3	81.2	86.5	84.6	100

Auch die Gel zu Gel Schwankung war relativ gering; die durchschnittliche Reproduzierbarkeit lag bei annähernd 90 % (Publikation 3 und Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluss des Faktors "Gel" auf die Ähnlichkeiten von SSCP-Bandenprofilen von DNS eines Matratzenstaubs (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)). Anzahl der Analysen pro Gel = 5.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5
Gel 1	100				
Gel 2	84.5	100			
Gel 3	91.7	95.8	100		
Gel 4	80.6	75.2	92.3	100	
Gel 5	87.3	90.2	92.1	73.2	100

Die leichte Varianz der Reproduzierbarkeit durch die Faktoren "DNS-Extraktion", "Tag" und "Gel" könnte durch eine ineffiziente Lysierung der Bakterienzellen oder durch eine unvollständige Freisetzung der DNS zurückzuführen sein (Farely et al., 1995; Suzuki and Giovannoni, 1996). Zudem ist Staub ein inhomogenes Substrat, welches zahlreiche biotische und abiotische Komponenten enthält. Anorganische Partikel oder organisches Material verändern die Effizienz der Lysierung und können die DNS Aufreinigung und enzymatische Schritte beeinflussen (von Wintzingerode et al., 1997).

Insgesamt ist also für epidemiologische Studien unter Anwendung von PCR-SSCP für Staubanalysen mit einer Abweichung von jeweils 10 % pro Faktor zu rechnen, was ganz im Gegensatz zu früheren Berichten eine durchaus akzeptable Reproduzierbarkeit darstellt (Hong et al., 2007; Nunan et al., 2005).

4.4.3 Sensitivität von PCR-SSCP

Zur Bestimmung der Sensitivität von PCR-SSCP für Staubanalysen wurden je 21 Stäube zu 150 mg γ -bestrahlt (26 kGy, 22 h) und sieben Verdünnungen in einem Bereich von 10^8 bis 10^2 KbE/ ml von je *L. monocytogenes* (Gram-positiv), *Bacillus licheniformis* (Sporenteil 30 %) und *Escherichia coli* (Gram-negativ) dazugegeben (Publikation 3). Von diesen Proben wurde die DNS extrahiert und dem PCR-SSCP Verfahren unterzogen.

Die PCR-SSCP Ergebnisse zeigten, dass für *Escherichia coli* ein Detektionslimit von 70 KbE/g bestand, wohingegen insgesamt 700 KbE/g Staub notwendig waren, um die Gram-positiven Bakterien *Bacillus licheniformis*, dessen Sporenteil bei 30 % lag, und *Listeria monocytogenes* nachzuweisen. Im Vergleich dazu ergaben

Kultivierungsmethoden ohne vorherige Anreicherung ein Limit von 1000 KBE/g Staub. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das Probenmaterial auf 150 mg limitiert war, da Matratzen gewöhnlich nicht mehr Material enthalten. Wäre hingegen eine größere Menge Staub verfügbar, ließe sich die Nachweisgrenze von Bakterien in Staub verbessern, denn mit Kultivierungsverfahren können bei ausreichend vorhandenem Probenmaterial erfahrungsgemäß durchaus 10×10^2 KBE/g Probe nachgewiesen werden. PCR-SSCP ist also ähnlich sensitiv wie dieses Verfahren (Publikation 3). Verglichen mit Gram-negativen Bakterien könnte das beachtlich höhere Detektionslimit von Gram-positiven Bakterien durch eine unvollständige Lysierung der resistenteren Zellwand der Gram-positiven Bakterien erklärt werden (von Wintzingerode et al., 1997). Folglich mag die DNS Gram-positiver Bakterien unterrepräsentiert sein (Frey et al., 2006). Eine Verbesserung des Extraktionsverfahrens bezüglich Gram-positiver Bakterien könnte jedoch zu stärker fragmentierten Nukleinsäuren von Gram-negativen Bakterien führen, was wiederum deren Nachweisbarkeit beeinträchtigt (von Wintzingerode et al., 1997). Die Sensivität des Nachweises von Sporenbildnern kann durch die Wahl des DNS-Extraktionsverfahren beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass Bakteriensporen schwieriger zu lysieren sind als vegetative Bakterien, da Sporen eine extrem resistente äußere Hülle besitzen, welche die Freisetzung von DNS behindert (Popham und Setlow, 1993; von Wintzingerode et al., 1997). Das Verfahren könnte daher bezüglich des Nachweises von Sporen weiter optimiert werden.

Trotz gewisser Einschränkungen bezüglich unterrepräsentierter Gram-positiver Bakterien und Sporenbildnern, ist PCR-SSCP eine gute Methode zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität in Stäuben.

4.5 Pilotstudie

Zur orientierenden Darstellung der mikrobiellen Exposition auf Bauernhöfen (n=26) wurden in einer Pilotstudie Stäube von Kuhställen (n=24), Schweineställen (n=19), Hühnerställen (n=2) und einem Pferdestall sowie von Kindermatratzen (n=63) mit PCR-SSCP untersucht. Dabei ergaben verschiedene Bauernhofumgebungen unterschiedliche SSCP-Banden (Abbildung 7 und 8). Wie zuvor diskutiert, können diese unterschiedlichen Mikroorganismenpopulationen durch verschiedene Quellen bedingt sein (Kapitel 4.1). Eine Betrachtung der Bandenprofile von Stall- und

Matratzenstäuben gleicher Bauernhöfe ergab, dass bestimmte Banden in beiden Probenarten zu analysieren waren, was wiederum auf einen Transfer von Mikroorganismen aus dem Stall zur Matratze hinweist. Abbildung 8 verdeutlicht dies exemplarisch anhand von 2 der 26 Bauernhöfe. Durch Klonierung, Sequenzierung und phylogenetischer Analyse der markierten Banden wurden *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Corynebacterium mucifaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium linens* und *Arthrobacter* spp. als möglicherweise transferierte Bakterien identifiziert (Abbildung 8).

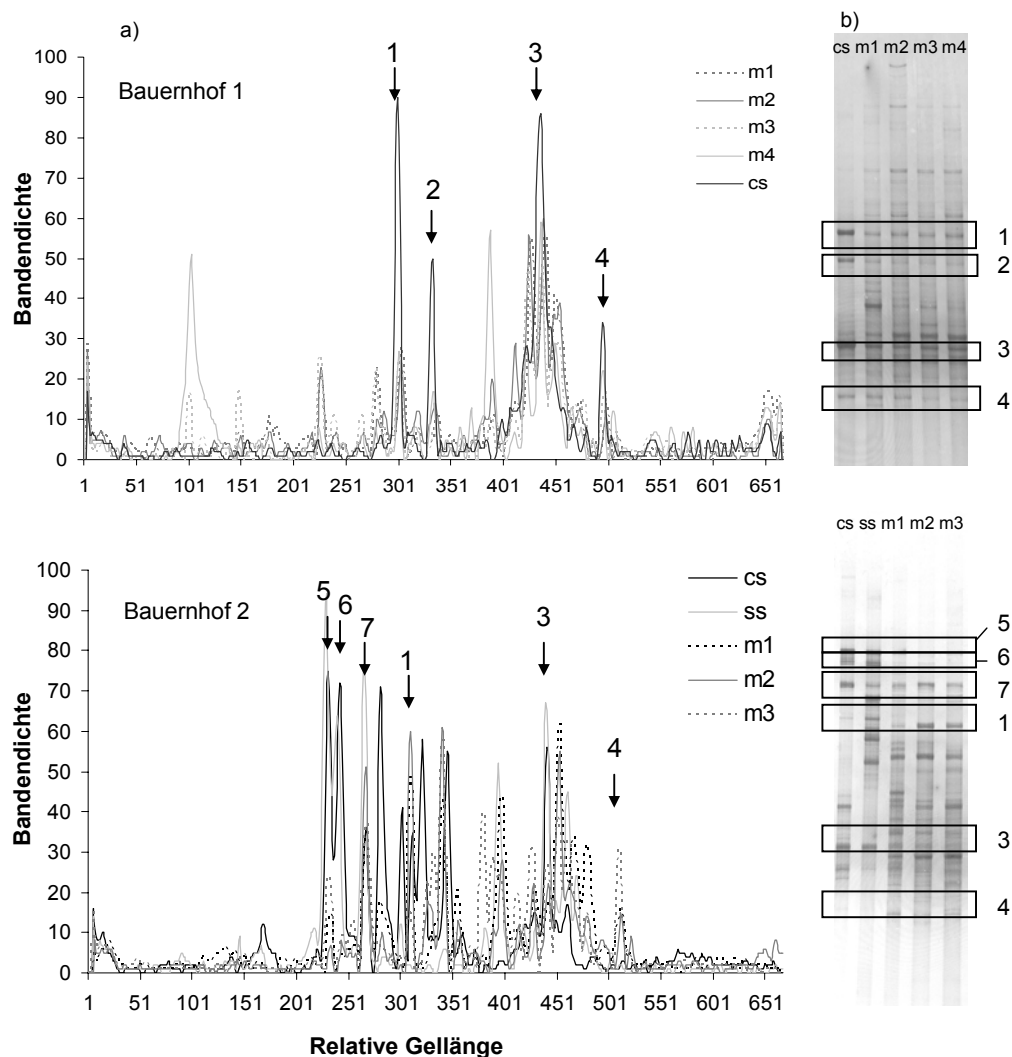


Abbildung 8: PCR-SSCP Profile von Matratzen- und Stallstäube von 2 aus 26 Bauernhöfen.

a) Densitometrische Auswertung der Bandenprofile, b) SSCP-Gel, cs = Kuhstall, ss = Schweinestall, m = Matratze, 1 = *Corynebacterium tuberculostearicum*, 2 = *Corynebacterium mucifaciens*, 3 = *Staphylococcus epidermidis*, 4 = *Acinetobacter lwoffii*, 5 = *Brevibacterium iodinum*, 6 = *Brevibacterium linens*, 7 = *Arthrobacter* spp.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass nicht alle „Marker-Spezies“ in den Proben aller Bauernhöfe gefunden wurden; allerdings wurden Hinweise auf vom Stall in die Matratzen transferierte Bakterien bei jedem Bauernhof beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PCR-SSCP geeignet ist, mikrobielle Diversitäten oder Übereinstimmungen in Proben unterschiedlicher Herkunft zu erkennen. Die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes in relativ kurzer Zeit empfiehlt diese Technik für groß angelegte epidemiologische Untersuchungen.

4.6 PARSIFAL-Studie

Um die unterschiedliche bakterielle Umweltexposition von Bauernhof- und Referenzkindern zu untersuchen, wurden Matratzenstäube der jeweiligen Gruppen (Kapitel 3.1.3) mit PCR-SSCP analysiert und die Ergebnisse epidemiologisch bezüglich des Gesundheitszustandes der Kinder ausgewertet.

4.6.1 PCR-SSCP-Ergebnisse

Die Analyse der PARSIFAL-Stäube mit PCR-SSCP lieferte detaillierte Ergebnisse zur mikrobiellen Exposition von Bauernkindern. Es wurden bei ihnen insgesamt 40 Banden gefunden, die im Vergleich zu Referenzkindern typisch für eine Bauernhofexposition sind (Abbildung 9). Diese waren signifikant ($p < 0,05$) verschieden zwischen den Gruppen. Da der Unterschied der Umweltexposition zwischen den Kindern, von denen die Matratzen untersucht wurden, hauptsächlich im Stallkontakt lag, könnten die verschiedenen Bandenprofile möglicherweise durch einen Transfer von Bakterien aus dem Stall zur Matratze erklärt werden (Kapitel 4.5 und Publikation 3).

Eine epidemiologische Auswertung der verschiedenen Bandenprofile unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes der Kinder ergab, dass insgesamt 10 spezifische Banden bzw. Bakterien invers mit dem Auftreten von Asthma und atopischer Sensibilisierung bezogen waren. Diese „Kandidaten“ wurden aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten, reamplifiziert, kloniert und durch Sequenzierung mit anschließender Auswertung in der Ribosomal Database Project II Datenbank identifiziert.

Das weitere Vorgehen sei am Beispiel der ersten auffälligen Bande (von links nach rechts betrachtet) dargestellt, welche auf gleicher Höhe mit dem im Standard

enthaltenden Bakterium *L. monocytogenes* lag (Abbildung 8). Die Identifizierung der Bande ergab, dass es sich tatsächlich um *L. monocytogenes* handelte. Wie bereits zuvor gezeigt (Kapitel 4.2.2 und Publikation 1), könnte diese Spezies aus den Ställen stammen und daher ein möglicher Kandidat für Asthmaprävention sein.

Die epidemiologische Auswertung der weiteren 9 „Kandidaten“ ergab, dass insbesondere die Bande an der relativen Gellänge 506, welche mit der Exposition der Kinder zum Heuboden und Silage bezogen war, einen starken präventiven Effekt auf Asthma zu haben scheint. Die Bande an der Gelposition 365, welche vor allem mit Betriebsmerkmalen wie Geflügelhaltung, Landwirtschaft allgemein und Mithilfe der Kinder bei der Heuverarbeitung assoziiert ist, zeigte den stärksten inversen Bezug zu atopischer Sensibilisierung.

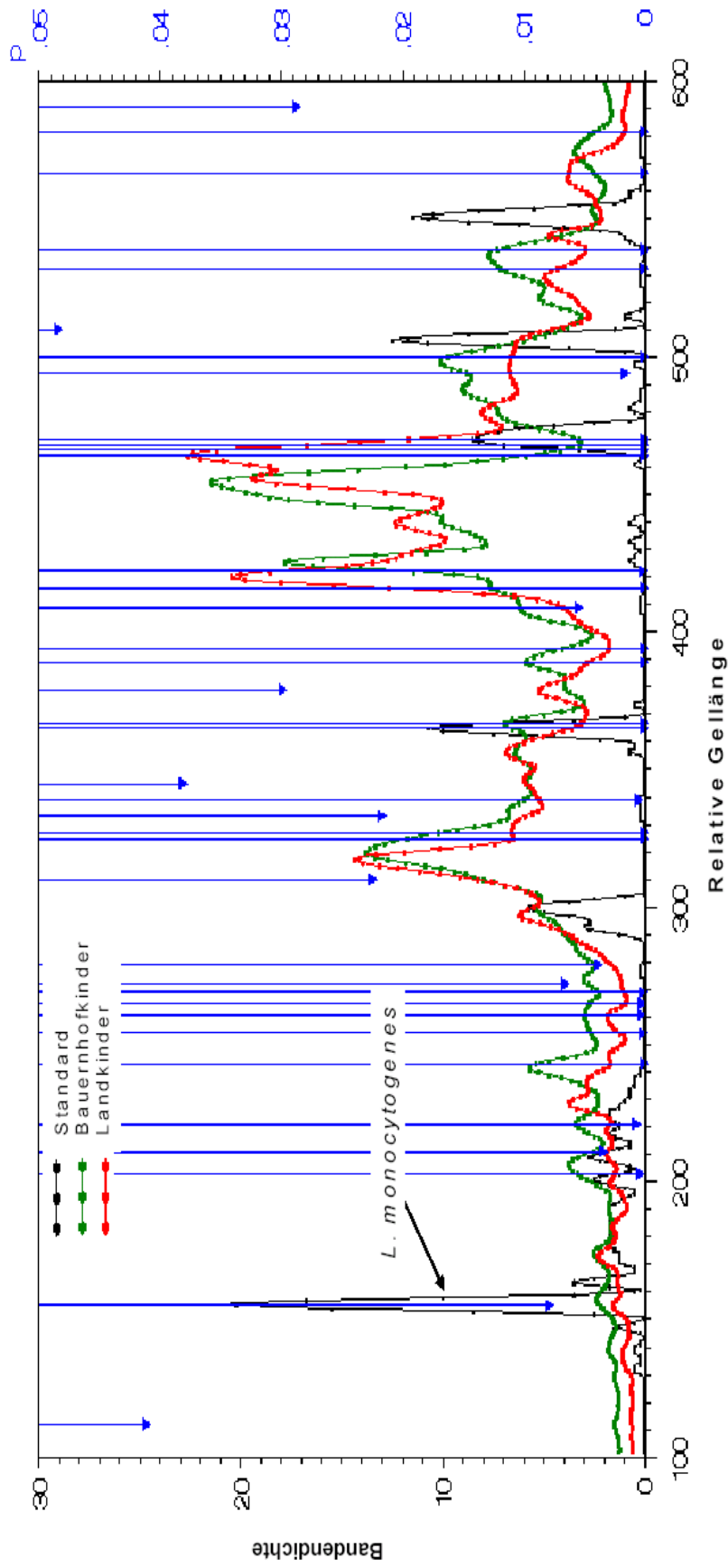


Abbildung 8: Durchschnittswerte der densitometrischen Analyse aller SSCP-Banden von Matratzenstäuben der Bauernhof- und Referenzkinder

Blaue Pfeile = signifikante Unterschiede zwischen der mikrobiellen Exposition von Bauernhof- und Referenzkindern, dargestellt als p-Werte. Schwarze Kurve = Standard bestehend aus *L. monocytogenes*, *M. vaccae*, *B. subtilis*, *L. plantarum*, *E. faecalis* und *A. lwoffii*.

4.6.2 Real-time PCR-Ergebnisse

Zur Bestätigung der SSCP-Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von *L. monocytogenes* in PARSIFAL-Stäuben wurden alle DNS-Extrakte mit real-time PCR zum Nachweis des *iap*-Gens amplifiziert und epidemiologisch ausgewertet.

Die Anwendung ergab eindeutig mehr positive Matratzenstäube bei den Bauernhofkinder als bei den Referenzkindern (Tabelle 9). Somit wurden die Ergebnisse der SSCP Analyse (Kapitel 4.6.1) bezüglich des Vorkommens von *L. monocytogenes* bestätigt.

In einem Chi-Quadrat Test wurden dichotome Variablen bezüglich positiven und negativem *L. monocytogenes* Nachweis und bezüglich Asthma krank und nicht krank (Tabelle 9) untersucht.

Tabelle 9: Epidemiologische Auswertung des real-time PCR Nachweises von *L. monocytogenes* in PARSIFAL-Stäuben bezüglich des Vorkommens von Asthma

Bauern- kinder		Asthma		Summe	Referenz- kinder		Asthma		Summe
		0	1				0	1	
Listerien	0	166 91,71 %	15 8,29 %	181	Listerien	0	208 89,66 %	24 10,34 %	232
	1	71 97,26 %	2 2,74 %			73	1	29 100 %	
Summe		237	17	254	Summe		237	24	261

0 = nicht erkrankt bzw. kein Listerien Nachweis

1 = erkrankt bzw. Listerien nachweisbar

Von 254 untersuchten Matratzenstäuben der Bauernhofkinder wurden 73 *iap*-Gen positiv getestet. Die Auswertung hinsichtlich Asthma zeigte, dass nur 2 von 73 Kindern (2,74 %) erkrankt waren. Wurden jedoch keine *L. monocytogenes* nachgewiesen (181 Matratzen) lag die Wahrscheinlichkeit an Asthma zu leiden bei 8,29 %. Die Exposition zu *L. monocytogenes* scheint also die Prävalenz dieser Krankheit vierfach (von 8,29 % auf 2,74 %) zu senken. Die Berechnung des „Fisher’s Exact Test“ ergab, dass diese Ergebnisse „borderline“ signifikant ($p=0,164$) sind.

Von 261 Matratzenstäuben der Referenzkinder waren nur 29 positiv bezüglich des Vorkommens des *iap*-Gens von *L. monocytogenes*. Die Kinder, die auf diesen

Matratzen schliefen hatten alle kein Asthma. Von 232 Kindern ohne Listerien in Matratzen waren 26 an Asthma erkrankt. Aufgrund der niedrigen Fallzahl *L. monocytogenes* positiver Matratzen und einem Wert von 0 % bei Listerien-Nachweis und Asthma Vorkommen wurde der genauere "Fischer Exact Test" durchgeführt. Hier lag der p-Wert bei 0,0915.

Für das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Matratzenstaub und der Prävalenz von Asthma wurde ein Odds Ratio von 0,237 [0,055-1,022] berechnet. Somit scheint das Risiko an Asthma zu erkranken um etwa 75 % reduziert zu sein, wenn Kinder diesem Bakterium exponiert sind. Dieses Ergebnis mag auf den ersten Blick überraschen, lässt sich aber mit früheren *in vivo Studien* an Mäusen in Einklang bringen. Diese zeigten, dass eine Infektion mit *L. monocytogenes* eine durch OVA induzierte Th2 Immunantwort supprimiert (Mizuki et al., 2001). Sowohl lebende als auch hitzeabgetötete *L. monocytogenes* inhibieren die Entwicklung von allergischen Immunantworten in Mäusen durch Freisetzung des Th1 Zytokins IL-12 was zur Sekretion von IFN- γ führt (Hansen et al., 2000). Dadurch befinden sich Th1 und Th2 Immunantwort wieder im Gleichgewicht (Kapitel 2.1.1).

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen zum einen, dass PCR-SSCP ein geeignetes Verfahren für epidemiologische Studien zur Bestimmung der mikrobiellen Umweltexposition von Kindern ist, da es eine Vielzahl von Mikroorganismen erfasst und im Gegensatz zu früheren Berichten eine durchaus akzeptable Reproduzierbarkeit liefert. Die Methode könnte jedoch noch bezüglich der Nachweisbarkeit von Bakteriensporen verbessert werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Matratzenstaub als Probenmaterial zur Erfassung der mikrobiellen Exposition von Kindern geeignet ist, denn sowohl kulturelle Untersuchungen als auch real-time PCR- und SSCP-Analysen weisen auf einen Transfer von Mikroorganismen vom Stall zur Matratze hin.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Bauernhofkinder einer anderen mikrobiellen Umweltexposition ausgesetzt sind als deren Referenzkinder. Dazu wurden Matratzenstäube der PARSIFAL-Studie mit PCR-SSCP und Real-time PCR untersucht. Es wurden zahlreiche signifikante „SSCP-Bandenunterschiede“ der Matratzenflora von Bauernhof- und Referenzkindern festgestellt. Insgesamt 10

Banden bzw. Bakterien („Kandidaten“) ergaben durch epidemiologische Auswertung eine inverse Beziehung mit Asthma und Atopie. Die Exposition gegenüber diesen Spezies könnte eventuell den protektiven Effekt vom Bauernhof erklären. *In vivo* Studien an Mäusen mit identifizierten „Kandidatenbakterien“ sollen dies klären.

Vor kurzem veröffentlichte Studien weisen darauf hin, dass die Exposition zu Schimmelpilzsporen bzw. Pilzbestandteilen (Exopolysaccharide, β -1,3-Glukane) invers bezüglich des Auftretens von atopischem Asthma und atopischem Giemen korreliert ist (Eduard et al., 2004; Schram-Bijkerk et al., 2005). Dieser Sachverhalt könnte die niedrigere Asthma-Rate bei Bauernkindern zumindest teilweise erklären (Ege et al., 2007). Daher wäre die Anwendung von PCR-SSCP mit spezifischen Pilzprimern zur genaueren Charakterisierung der Pilzgemeinschaften in Matratzenstäuben von Bauernhof- und Referenzkindern eine vielversprechende Arbeit für die Zukunft.

5 Zusammenfassung

Die Untersuchung der mikrobiellen Umweltexposition von Kindern im ländlichen Raum gewinnt zunehmend an Bedeutung, da die Exposition gegenüber Mikroorganismen auf Bauernhöfen mit einem reduzierten Vorkommen von Asthma und atopischen Krankheiten in Verbindung gebracht wurde. Die bisherigen Studien konzentrierten sich ausschließlich auf die Bestimmung von Mikroorganismen mittels Kultivierung oder auf die Messung von mikrobiellen Komponenten in Stäuben. Diese Verfahren sind jedoch nur sehr eingeschränkt geeignet, da lediglich ein begrenzter Teil der tatsächlich vorhandenen mikrobiellen Diversität nachgewiesen werden kann. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, Methoden zu etablieren, die eine Vielzahl von in der Umwelt vorhandenen Mikroorganismenarten erfassen. Des Weiteren sollten diese Verfahren praktikabel für epidemiologische Studien und gut reproduzierbar sein. Die Anwendung dieser Methoden sollte die Frage klären, ob Matratzenstaub ein geeignetes Probenmaterial zur Bestimmung der mikrobiellen Umweltexposition ist und ob Bauernhofkinder anderen Mikroorganismen ausgesetzt sind als Landkinder. Schließlich sollte überprüft werden, inwieweit gegen Asthma und atopische Sensibilisierung geschützte Bauernhofkinder bestimmten Bakterien vermehrt ausgesetzt sind. Folgende Resultate wurden erzielt:

1. Mit Kultivierungsverfahren wurden aus Matratzen- und Stallstäuben Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., sowie coliforme Bakterien und Pilze der Gattungen *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. und *Wallemia* spp. isoliert.
2. Manche Bakterien wie z.B. *Bacillus* spp. und *Listeria* spp. kamen in Stäuben von Kindermatratzen und von Ställen vor, was auf einen Transfer dieser Mikroorganismen vom Stall zur Matratze hindeutet.
3. Die Validierung und Anwendung von real-time PCR zum Nachweis von *L. monocytogenes* in Stall- und Matratzenstäuben zeigte, dass dieses Verfahren sehr sensitiv ist (Nachweisgrenze 2 KbE/mg Staub). So wurden im Vergleich zu Kultivierungsverfahren weitaus mehr Listerien nachgewiesen.
4. Der Vergleich der Anwendung von DGGE und PCR-SSCP für Staubproben

unter Verwendung von Protokollen für Bodenproben ergab, dass die Diversität der Banden bei beiden Methoden in etwa gleich war. Es waren jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Klarheit der Banden erkennbar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit PCR-SSCP für die Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften gewählt. Die Methode musste jedoch für die Anwendung bei Stäuben modifiziert und validiert werden.

5. Die Validierung der PCR-SSCP Methode für die Bestimmung von Mikroorganismen in Stäuben zeigte, dass die Reproduzierbarkeit bei etwa 90 % lag. Die Sensitivität der Methode lag für Gram-positive Bakterien und Sporenbildner mit 30 % Sporenteil bei 700 KbE/g und für Gram-negative Bakterien bei 70 KbE/g Staub.
6. Die Anwendung der SSCP-Methode auf Matratzen- und Stallstäube zeigte auch, dass Mikroorganismen vom Stall zur Matratze transferiert wurden. Matratzenstaub ist daher ein geeignetes Probenmaterial für epidemiologische Untersuchungen der mikrobiellen Umweltexposition von Kindern im ländlichen Raum. Insgesamt 501 Matratzenstäube von Kindern der PARSIFAI-Studie wurden mit PCR-SSCP untersucht. Es waren deutliche Unterschiede der Bandenprofile von Bauernhofkindern zu Referenzkindern festzustellen. Unter den auffälligen Banden war eine *L. monocytogenes* zuzuordnen.
7. Durch real-time PCR wurden die SSCP-Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von *L. monocytogenes* bestätigt. So waren weitaus mehr Matratzenstäube der Bauernhofkinder als der Referenzkinder positiv.
8. Die epidemiologische Auswertung der real-time PCR Ergebnisse weist darauf hin, dass die Exposition gegenüber *L. monocytogenes* das Risiko an Asthma zu erkranken möglicherweise deutlich verringert.

6 Summary

The environmental exposure of farm children to microorganisms in dust has become a focus of interest, since microbial exposure on farms has been related to a reduced prevalence of asthma and atopic diseases in children. Previous studies almost exclusively focused on the determination of microbial counts using conventional culturing or the determination of microbial compounds in dusts. Both methods, however, are only limited suitable since they cannot reflect the total microbial diversity of environmental samples. Therefore this study aimed to establish methods for the detection of a multitude of bacterial communities in farming environmental dusts. Since the method should be practical for large-scale epidemiological studies this study secondly aimed to validate this method concerning to reproducibility. The application of this method should answer the questions if mattress dust is a suitable specimen to determine human exposure to microorganisms of the environment and if farm children come in contact to other microorganisms than land children. Finally it should be surveyed to which extent asthma and atopic sensitisation protected farm children were exposed to a certain population of bacteria. The following results were obtained:

1. Using conventional culturing, bacteria of the genera *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. and coliforme bacteria as well as fungi of the genera *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. and *Wallemia* spp. were isolated from mattress- and shed-dusts.
2. Some bacteria for instance *Bacillus* spp. and *Listeria* spp. were found in dusts of childrens' mattresses and sheds indicating a transfer of microorganisms from the shed to the mattress.
3. The validation and application of real-time PCR detection of *L. monocytogenes* in shed- and mattress-dusts showed that this method is very sensitive (detection limit 2 KbE/mg Staub). Thus, compared to conventional culturing much more listeria were detected by this method.
4. The comparison of the application of DGGE and PCR-SSCP for dusts using protocols for soil showed that the diversity of the bands was approximately similar but considerable differences concerning the clearness of the bands

were noticeable. Therefore in this study PCR-SSCP was chosen for the analyses of microbial communities. However, the method had to be modified for the application on dusts.

5. The validation of the PCR-SSCP method for the determination of microorganisms in dusts showed a reproducibility of around 90 %. The sensitivity of the method was 700 cfu/g dust for Gram-positive bacteria and spore forming bacteria containing 30 % spores and 70 cfu/g dust for Gram-negative bacteria.
6. The application of the SSCP-method on mattress- and shed-dusts showed again that microorganisms were transferred from the shed to the mattress. Therefore mattress dust is a suitable specimen for epidemiological studies on the microbial exposure of children in rural areas. Hence, 501 mattress dusts from children of the PARSIFAI-study were analysed with PCR-SSCP. Obvious differences of bandprofiles from farm- and reference children were assessed. Among the conspicuous bands, one was identified as *L. monocytogenes*.
7. Using real-time PCR the results concerning the occurrence of *L. monocytogenes* in the PARSIFAL specimens were confirmed since significantly more mattress dusts from farm-children than from reference-children were positive.
8. The epidemiological analyses of the real-time PCR results indicates that the exposition to *L. monocytogenes* possibly reduces the risk of asthma considerably.

7 Literaturverzeichnis

Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S., 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 4, 553-564.

Adkins B., 2000. Development of neonatal Th1/Th2 function. *Int Rev Immunol* 19, 157-171.

Amann R.I., Ludwig w., Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169.

Beasley R., Crane J., Lai C.K., Pearce N., 2000. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105, 466-472.

Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Cappelier J.M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* 33, 359-370.

Braun-Fahrländer C., Riedler J., Herz U., Eder W., Waser M., Grize L., Maisch S., Carr D., Gerlach F., Bufe A., Lauener R.P., Schierl R., Renz H., Nowak D., von Mutius E., 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 347, 869-877.

Chatzi L., Prokopakis E., Tzanakis N., Alegakis A., Bizakis I., Siafakas N., Lionis C., 2005. Allergic rhinitis, asthma, and atopy among grape farmers in a rural population in Crete, Greece. *Chest* 127, 372-378.

Chrischilles E., Ahrens R., Kuehl A., Kelly K., Thorne P., Burmeister L., Merchant J., 2004. Asthma prevalence and morbidity among rural Iowa schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 113, 66-71.

Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gattermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H., 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1514-1521.

Debarry, 2007. Mögliche Mechanismen der Allergieprävention: Dendritische Zellen als Regulatoren der durch Stallbakterien ausgelösten allergieprotektiven Immunantwort. Dissertation, Christian-Albrecht-Universität Kiel.

Dekio I., Hayashi H., Sakamoto M., Kitahora M., Nishikawa T., Suematsu M., Benno Y., 2005. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *J Med Microbiol* 54, 1231-1238.

Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: Kowalschuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (Hrsg.), *Molecular Microbial Ecology Manual.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 809-838.

Downs S.H., Marks G.B., Mitakakis T.Z., Leuppi J.D., Car N.G., Peat J.K., 2001. Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia. *Clin Exp Allergy* 31, 570-575.

Eduard W., Douwes J., Omenaas E., Heedrik D., 2004. Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax* 59, 381-386.

Ege M.J., Frei R., Bieli C., Schram-Bijkerk D., Waser M., Benz M.R., Weiss G., Nyberg F., van Hage M., Pershagen G., Brunekreef B., Riedler J., Lauener R., Braun-Fahrländer C., von Mutius E., Parsifal Study team, 2007. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1140-1147.

Ernst P., Cormier Y., 2000. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1563-1566.

Farely V., Rainey F.A., Stackebrandt E., 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S ribosomal genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 61, 2798-2801.

Filipiak B., Heinrich J., Schafer T., Ring J., Wichmann H.E., 2001. Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany- results from the MONICA/KORA study Augsburg. *Clin Exp Allergy* 31, 1829-1838.

Frey J.C., Angert E.R., Pell A.N., 2006. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *J Microbiol Methods* 67, 9-19.

Hansen G., Yeung V.P., Berry G., Umetsu D.T., Dekruyff R.H., 2000. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: Role of CD8+ T cells and IL-18. *J Immunol* 164, 223-230.

Harylowicz C.M., O'Garra A., 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5, 271-283.

Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M., 2001. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by new real-time quantitative PCR assay. *Res Microbiol* 152, 37-46.

Hobson P.N., Stewart C.S., 1997. The rumen microbial ecosystem, 2. Auflage, Chapman & Hall Verlag, London.

Holt P.G., 1996. Primary allergic sensitisation to environmental antigens: perinatal T-cell priming as a determinant of responder phenotype in adulthood. *J Exp Med* 183, 1297-1301.

Hong H., Pruden A., Reardon K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69, 52-64.

Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y., 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J Microbiol Methods* 66, 165-169.

ISO 11290-1: 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. Genf: International Organization for Standardization.

ISO 11290-2: 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Genf: International Organization for Standardization.

Kilpelainen M., Terho E.O., Helenius H., Koskenvuo M., 2002. Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 57, 1130-1135.

Kilpelainen M., Terho E.O., Helenius H., Koskenvuo M., 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 30, 201-208.

Klintberg B., Berglund N., Lilja G., Wickman M., van Hage-Hamsten M., 2001. Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a closed birth cohort from Sweden. *Eur Respir J* 17, 1151-1157.

Leynaert B., Neukirch C., Jarvis D., Chinn S., Burney P., Neukirch F., 2001. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1829-1834.

Liu A.H., 2007. Hygiene theory and allergy and asthma prevention. *Paediatr Perinat Epidemiol* 21, 2-7.

Mizuki D., Miura T., Sasaki S., Mizuki M., Madarame H., Nakane A., 2001. Interference between host resistance to *Listeria monocytogenes* infection and ovalbumin-induced allergic responses in mice. *Infect Immun* 69, 1883-1888.

Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C., 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Kowalschuk G.A., De Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D., van Elsas J.D. (Hrsg.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 743-769.

Nocker A., Burr m., Camper A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54, 276-289.

Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., Mc Nicol J.W., Prosser J.I., 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 71, 6784-6792.

Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W., Spoelstra S.F., 2003. Microbiology of Ensiling. In: Buxton D.R. (Hrsg.), *Silage science and technology*, Agronomie monograph no 42, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, S 31-93.

Park J.H., Spiegelman D.L., Burge H.A., Gold D.R., Chew G.L., Milton D.K., Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect* 108, 1023-1028.

Popham D.L., Setlow P., 1993. The cortical peptidoglycan from spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* is not highly cross-linked. *J Bacteriol* 175, 2767-2769.

Prescott S.L., Macaubas C., Holt B.J., Smallacombe T.B., Loh R., Sly P.D., Holt P.G., 1998. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 160, 4730-4737.

Pschyrembel W., Zink C., Dornblüth O., 2007. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 261. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin.

Radon K., Schulze A., Nowak D., 2006. Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood: protection, underreporting or selection? *Allergy* 61, 443-446.

Rappe M.S., Giovannoni S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Ann Rev of Microbiol* 57, 369-394.

Riedler J., Braun-Fahrländer C., Eder W., Schreuer M., Waser M., Maisch S., Carr D., Schierl R., Nowak D., von Mutius E., 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross sectional survey.

Schierl R., Heise A., Egger U., Schneider F., Eichelser R., Nesper S., Nowak D., 2007. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern bavaria. *Ann Agric Environ Med* 14, 129-136.

Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C. C., 2001. Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Env Microbiol* 67, 3557-3563.

Schmidt T.M., 2006. The maturing of microbial ecology. *Int Microbiol* 9, 217-223.

Schram-Bijkerk, D., Doekes, G., Douwes, J., Boeve, M., Riedler, J., Ublagger, E., von Mutius, E., Benz, M.R., Pesshagen, G., von Hage, M., Scheynius, A., Braun-Fahrländer, C., Waser, M., Brunekreef, B., 2005. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. *Clin Exp Allergy* 35, 1272–1278.

Schram D., Doekes G., Boeve M., Douwes J., Riedler J., Ublagger E., von Mutius E., Budde J., Pershagen G., Nyberg F., Alm J., Braun-Fahrländer C., Waser M., Brunekreef B., 2005. Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children. *Allergy* 60, 611-618.

Schwaiger K., Stiersdorfer B., Schmahl W., Lehmann S., Gallien P., Bauer J., 2005. Zum Vorkommen bakterieller ZNS-Infektionen beim Rehwild (*Capreolus capreolus*), Rotwild (*Cervus elaphus*) und Gamswild (*Rupicapra rupicapra*) in Bayern. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 118, 45-51.

Schwieger, F., Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4870-4876.

Sennhauser F.H., Braun-Fahrländer C., Wildhaber J.H., 2005. The burden of asthma in children: a European perspective. *Paediatr Respir Rev* 6, 2-7.

Snell-Castro R., Godon J.J., Delgenès J.P., Dabert P., 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 52, 229-242.

Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., Behr M.A., 2005. Extraktion of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J Clin Microbiol* 43, 2996-2997.

Stanwell-Smith R., 2003. The infection potential in the home and the role of hygiene: historical and current perspectives. *Int J Environ Health Res* 13 Suppl 1, 9-17.

Strachan D.P., 1989. Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J* 299, 1259-1260.

Suzuki M.T., Giovannoni S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62, 625-630.

Taylor A., Verhagen J., Akdis C.A., Akdis M., 2004. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 73-82.

Tebbe C.C., Vahjen W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl Environ Microbiol* 59, 2657-2665.

Van Strien R.T., Engel R., Holst O., Bufe A., Eder W., Waser M., Braun-Fahrländer C., Riedler J., Nowak D., von Mutius E., 2004. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-Acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol* 113, 860-867.

Von Ehrenstein O.S., von Mutius E., Illi S., Baumann L., Bohm O., von Kries R., 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 30, 187-193.

Von Mutius E., 2007. Allergies, infections and the hygiene hypothesis- The epidemiological evidence. *Immunobiology* 212, 433-439.

Von Mutius, 2001. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 18, 872-881.

Von Mutius E., Braun-Fahrländer C., Schierl R., Riedler J., Ehlermann S., Maisch S., Waser M., Nowak D., 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 30, 1230-1234.

Von Wintzingerode F., Göbel U.B., Stackebrandt E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21, 213-229.

Wagner M., Auer B., Trittmittel C., Hein I., Schoder D., 2007. Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses Public Health*, 54, 16-22.

Wagner M.R., Amann H., Lemmer H., Schleifer K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 59, 1520-1525.

Waser M., Schierl R., von Mutius E., Carr D., Riedler J., Eder W., Schreuer M., Nowak D., Braun-Fahrländer C., 2004. Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. *Clin Exp Allergy* 34, 389-397.

Wery N., Pourcher A.M., Stan V., Delgenes J.P., Picard-Bonnaud F., Godon J.J., 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* in sludge evaluated by real-time PCR and culture methods. *Lett Appl Microbiol* 43, 131-136.

Wickens K. Lane J.M., Fitzharris P., Siebers R., Riley G., Douwes J., Smith T., Crane J., 2002. Farm residence and exposure and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 57, 1171-1179.

Young G., Turner S., Davies J.K., Sundqvist G., Figdor D., 2007. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* 33, 1417-1420.

8 Publikationen

- [1] Korthals M, Ege MJ, Lick S, von Mutius E and Bauer J., 2008. Occurrence of *Listeria* spp. in mattress dust of farm children in Bavaria. *Env Res* 107, 299-304.
- [2] Vogel K*, Blümer N*, Korthals M*, Mittelstädt J, Garn H, Ege M, von Mutius E, Gattermann S, Bufe A, Goldmann T, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Hein H and Holst O., 2008. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 122, 307-312.
*gleichberechtigte Erstautoren
- [3] Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E and Bauer J., 2008. Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. *J Microbiol Methods* 73, 49-56.

Veröffent- lichungen	Experimenteller Teil					Manuskript		
	Kulti- vierung	qPCR	SSCP	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> Experimente	Daten- auswertung	Einleitung	M&M	E&D
[1]	KM	KM	-	-	KM	KM	KM	KM
[2]	KM	-	-	VK BN	VK BN KM	VK	VK BN KM	VK BN KM
[3]	-	-	KM	-	KM	KM	KM	KM

KM: Melanie Korthals

BJ: Johann Bauer

VK: Kay Vogel

BN: Nicole Blümer

M&M: Material und Methoden

E&D: Ergebnisse und Diskussion

Publikation 1

Korthals M, Ege MJ, Lick S, von Mutius E and Bauer J., 2008. Occurrence of *Listeria* spp. in mattress dust of farm children in Bavaria. *Environmental Research* 107, 299-304.

Occurrence of *Listeria* spp. in mattress dust of farm children in Bavaria

Melanie Korthals^{a,*}, Markus Ege^b, Sonja Lick^c, Erika von Mutius^b, Johann Bauer^a

^aInstitute of Animal Hygiene, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany

^bUniversity Children's Hospital, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Lindwurmstr. 4, 80337 Munich, Germany

^cFederal Institute for Risk Assessment, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Germany

Received 13 July 2007; received in revised form 11 February 2008; accepted 19 February 2008

Available online 2 April 2008

Abstract

Several epidemiological studies have shown that the farm environment impacts allergy protection mechanisms in children. These associations are not well understood, but it is thought that contact to microorganisms may mediate this effect. For example, heat-inactivated *Listeria* (*L.*) *monocytogenes* have been successfully used as an adjuvant in mouse immunotherapy to modulate airway hyperreactivity and inflammation. In investigating the link between farming lifestyle and prevention of childhood allergy, we examined the prevalence of *Listeria* spp. in dust specimens from the environment of rural children.

A total of 26 farms located in Bavaria (South Germany) were examined. Dust samples taken from mattresses ($n = 63$), cow-sheds ($n = 30$) and swine-sheds ($n = 10$) were qualitatively screened for the presence of viable *Listeria* spp. according to the ISO 11290-1 method and additionally by *L. monocytogenes* specific *iap*-based real-time PCR. Isolates were further characterized by biochemical techniques, serology and multiplex PCR.

Nineteen of 26 farms tested positive for *Listeria* spp. and seven were tested negative. The dominant species found by culturing methods were *L. innocua* ($n = 12$) and *L. monocytogenes* ($n = 8$). Viable *Listeria* spp. were detected in 8% of the mattress dust samples, whereas real-time PCR revealed 60% *L. monocytogenes* positive specimens. Regarding animal sheds, 28% of dust samples showed viable *Listeria* spp., while using real-time PCR found that 28% of specimens were *L. monocytogenes* positive. All strains of *L. monocytogenes* except one (4ab) belonged to the serotype 1/2a.

Our data demonstrate that a substantial number of farm children's beds contain *L. monocytogenes*. The importance of this result regarding the health of children must be evaluated by epidemiological investigations on both the risk of listeriosis and the effects on protection against allergies.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Listeria* spp.; Farm environment; Mattress dust; Real-time PCR; Allergy

1. Introduction

Several epidemiological studies have shown that growing up on a farm has a considerable impact on the development of the immune system, especially regarding protection from asthma and allergic sensitisation (Ege et al., 2006; Lauener et al., 2002; Braun-Fahrlander and Lauener, 2003; Kabesch and Lauener, 2004; Perkin and Strachan, 2006). Due to their complexity, these associations are not understood, but it is assumed that extensive exposure to microorganisms

may mediate this protective effect (Braun-Fahrlander et al., 2002).

Farming families usually live in close contact with animals or have intensive contact with soil through farming activities. They are therefore exposed to higher numbers and diversities of bacteria than non-farming families. Moreover, microorganisms are thought to play a crucial role during the maturation of a child's immune system (Riedler et al., 2001; Braun-Fahrlander et al., 2002). Exposure to different bacterial compounds such as lipopolysaccharides and *N*-acetyl-muramic acid have been associated with protection from childhood allergic diseases (Von Mutius et al., 2000; Braun-Fahrlander et al., 2002; Van Strien et al., 2004). Some bacterial species such as

*Corresponding author. Fax: +49 81 61 71 4516.

E-mail address: melanie.korthals@wzw.tum.de (M. Korthals).

Acinetobacter lwoffii F78 and *Lactococcus lactis* G121, identified in farm cowsheds, are candidates for protection from allergies such as asthma, hay fever and atopic sensitization in children (Debarry et al., 2007; Ege et al., 2007).

Heat-killed *Listeria* (*L.*) *monocytogenes* were successfully used as an adjuvant in immunotherapy to modulate the murine immune responses of airway hyperreactivity and inflammation (Hansen et al., 2000). *Listeria* spp. are ubiquitous microorganisms which are widespread in nature that have been isolated from soil, vegetation, marine sediments and water. Six species are currently known: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* and *L. grayi*. Of these, the species *L. monocytogenes* is of special importance, because it is a pathogen to humans and animals (Ramaswamy et al., 2007).

Listeria spp., especially *L. monocytogenes*, are frequently found in the rural environment (animal sheds, silage and faeces) (Borucki et al., 2005; Nightingale et al., 2004; Skovgaard and Morgen, 1988), so we assumed that farm children might be exposed to these bacteria by playing in this environment. As a consequence, children can transfer dust particles and microorganisms into their homes through their hands, clothes or hair. In the domestic environment little is known on *Listeria* spp. as a part of the microbial flora (Wagner et al., 2007).

In the household environment, mattress dust was chosen as the sample material because of the intense contact of this matrix to one person, reflecting an individual long-term exposure. The prevalence of *Listeria* spp. was investigated using conventional qualitative culturing methods according ISO 11290-1 and *L. monocytogenes* specific LightCycler[®] real-time PCR targeting the *iap* (invasion associated protein) gene with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes (Schwaiger et al., 2005).

2. Materials and methods

2.1. Field samples

Dust samples of mattresses ($n = 63$), cow-sheds ($n = 30$) and swine-sheds ($n = 10$) were collected from 26 farms in Bavaria (South Germany) during Spring 2006 (Table 1). Mattress dusts were collected according to a standard protocol (Schram-Bijkerk et al., 2005). In brief, the head of a vacuum cleaner was cleaned with 70% ethanol and a nylon collection sock was connected to a standard vacuum (Miele S 711, Germany). Blankets and sheets were removed from the bed and the whole area of the mattress was

vacuumed at full power for 3 min. The collection socks were then removed, closed and sealed in a plastic bag. The socks were shipped to the laboratory within 24 h and stored at -20°C . In animal sheds, at least 200 mg (about 2 teaspoons) of sediment dust was taken from various surface areas 0.5–1.5 m above the floor (e.g. shelf, windowsill, etc.) using brushes previously treated with 70% ethanol.

The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained from the children's parents.

2.2. Isolation of *Listeria* spp.

The isolation of *Listeria* spp. was performed according to the ISO 11290-1 reference method for food microbiological quality control. Aliquots of 100 mg of dust samples were added to 1.9 ml of half-Fraser broth (HFB; Merck, Germany) and incubated at 30°C for 48 h. One milliliter was then transferred into 100 ml of Fraser broth (FB) and incubated again for 24 h at 37°C . A total of 100 μl aliquots were streaked directly onto Oxford and Palcam agar (Merck, Germany) and incubated for 48 h at 37°C . Typical *Listeria* spp. colonies—greenish-yellow glistening, iridescent and pointed colonies of about 0.5 mm diameter surrounded by a diffused black zone of aesculin hydrolysis—were chosen for further investigations. Three characteristic colonies of each plate were transferred onto tryptic soy agar plates (TSA) (Oxoid, Germany) containing 5% sheep blood (Fiebig Nährstofftechnik, Germany) and incubated for 24 h at 37°C . All isolates were identified on species level using the API-*Listeria* test kit (Biomérieux, Germany) and by species-specific PCR according to Bubert et al. (1999), Gallien et al. (2000). Serotypes of *L. monocytogenes* were determined using a slide agglutination assay according to Seeliger and Hone (1979). The antisera used (commercially prepared by Denka Seiken Co., Japan) were purchased from Innogenetics GmbH (Germany). Serotypes were verified in parallel with the multiplex PCR recently published by Doumith et al. (2004). Reference strains were: *L. monocytogenes* DSM20600^T serovar 1/2a, *L. monocytogenes* ATCC19112 serovar 1/2c, *L. monocytogenes* SLCC2755 serovar 1/2b, *L. monocytogenes* ATCC19114 serovar 4a, *L. monocytogenes* DSM15675 and ATCC19111 serovar 4b, *L. monocytogenes* NCTC10528 serovar 4ab, *L. innocua* DSM20649^T, *L. ivanovii* DSM20750^T, *L. seeligeri* ATCC35967 and *L. welshimeri* ATCC35897.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR)

2.3.1. Sample preparation

A total of 2.85 ml phosphate buffered saline (PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 41.57 mM, NaCl 0.62 M, KH_2PO_4) was added to 150 mg of dust and shaken at 350 rpm for 30 min. Dust particles heavier than microorganisms were separated by a centrifugation step ($200 \times g$, 3 min). The supernatant was transferred into a 1.5 ml tube and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min to obtain a microorganism pellet, which was subjected to DNA extraction.

2.3.2. DNA extraction

The DNA extraction was performed according to the protocol of Somerville et al. (2005) with minor modifications. The pellet was resuspended in 500 μl Tris-EDTA buffer (Tris 0.010 mM, EDTA 0.001 mM, pH 8.0) and heated for 20 min at 80°C . Lysozyme was added

Table 1
Origin of the field samples taken from different farm types

Group	Cow	Swine	Crop farming	Number of farms sampled	Number of dust samples		
					Mattress	Cow-shed	Swine-shed
1	+	+	+	8	24	8	8
2	+	–	+	11	24	15	–
3	+	+	–	7	15	7	2
Total				26	63	30	10

(final concentration, 1 mg/ml), followed by incubation at 37 °C for 2 h. Ten percent sodium dodecyl sulfate (SDS; final concentration, 1.1%) and proteinase K (final concentration, 0.2 mg/ml) were added, the tubes were vortexed gently and incubated for 20 min at 65 °C. A mixture of *N*-acetyl-*N,N,N*-trimethyl ammonium bromide (CTAB, final concentration, 40 mM) and NaCl (final concentration, 0.1 M) was added, followed immediately by another addition of NaCl (final concentration, 0.6 M). The tubes were gently shaken until the suspension turned milky and were incubated again for 10 min at 65 °C. One volume of chloroform–isoamyl alcohol (24:1) was added and the tubes were gently shaken and then centrifuged in a microcentrifuge at 13,000 × *g* for 5 min at room temperature. The aqueous phase was transferred into a 1.5 ml tube, and 2 µl glycogen (Invitrogen, Germany) and 600 µl ice-cold isopropanol (100%) were added to the tube and gently shaken, followed by centrifugation in a microcentrifuge (VWR, Germany) at 16,000 × *g* for 10 min at room temperature. The pellet was washed in 600 µl of 70% ethanol and centrifuged at 16,000 × *g* for 2 min. The ethanol was removed and the resulting genomic DNA pellet was resuspended in 30 µl nuclease-free water.

2.3.3. Preparation of a quantitative positive control for real-time PCR: spiking of dust samples with *L. monocytogenes* ATTC 7644

Twenty-five mattress dust specimens of 150 mg each were γ -radiated (26 kGy for 22 h) in order to destroy naturally occurring DNA. A 10-fold dilution series of a McFarland 1 *L. monocytogenes* ATTC 7644 suspension in PBS was prepared and 100 µl of each dilution was added to the 150 mg mattress dust specimens. In parallel, colony forming units (cfu) were determined on TSA agar, which ranged from 2×10^4 to 2×10^0 per mg dust (Table 2). The artificially contaminated samples were shaken vigorously and then lyophilized under aseptic conditions.

DNA was extracted as described above. The DNA concentration of the standards was measured using the Nanodrop ND-100 spectrometer (Peqlab, Germany). All quantifications of DNA were based on the calculation that 1 ng of bacterial DNA equals about 3×10^5 copies of the

genome (*L. monocytogenes*, genome size 2.9 Mbp) and contained only one copy of the target *iap*-gene (Hein et al., 2001).

2.3.4. LightCycler[®] real-time PCR for *L. monocytogenes*

The oligonucleotide primers and hybridization probes for PCR targeted the *iap*-gene. Although it is not very well conserved in the genus *Listeria*, *L. monocytogenes* strains contain conserved portions at the 5' and the 3' end, whereas its central regions are highly variable. The primers were used as described by Hein et al. (2001) with minor modifications according to Schwaiger et al. (2005) generating a 175 bp amplification product and using probes (TIB Molbiol, Germany) for the LightCycler[®] system based on the sequence of the *iap*-gene (Fig. 1).

The reaction volume of 20 µl contained a mixture of 2 µl of LC-FastStart Reaction Mix (Roche, Germany), primers 0.4 µM each, FRET probes 0.2 µM each, MgCl₂ 3 mM and 4 µl target DNA. A DNA extract of γ -radiated dust (26 kGy for 22 h) was used as a negative control. A 10-fold dilution series of the spiked dust samples was used as (quantitative) positive control standard (see above).

The standard LightCycler[®] protocol was as follows: an initial activation phase at 95 °C for 10 min; 50 cycles of amplification consisting of a 95 °C denaturation for 10 s, 60 °C annealing for 10 s, and 72 °C extension for 5 s; the quantity of amplified product was monitored in the F2 mode by detection of fluorescence emitted at 640 nm. Melting curve analysis was undertaken from 45 °C to 72 °C with a temperature transition rate of 0.1 °C/s and a rapid cooling phase.

A selection of PCR products was sequenced by Sequiserve (Germany) in order to confirm the detected species *L. monocytogenes*.

2.3.5. Statistical analysis

Concordance between the occurrence of *Listeria* spp. in sheds and mattresses was calculated as kappa coefficient (κ [95%-confidence interval]) of presence of *Listeria* spp. in animal shed dust and presence of *Listeria* spp. in any mattress dust per farm.

Table 2
Detection of *Listeria* spp. in mattress- and shed-dusts by a culture-based method and real-time PCR

Group	Source	Sample	Culture			<i>L. monocytogenes</i> real-time PCR calculated genome copies per 150 mg dust
			<i>L. monocytogenes</i> (serotype)	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	
1	Swine-shed	220 SSt	–	+	–	n.d.
	Mattress	448 K4	–	+	–	n.d.
	Mattress	448 K5	–	+	–	938
	Swine-shed	448 SSt	–	+	–	210
	Cow-shed	484 KS	–	+	–	n.d.
	Swine-shed	776 SSt	–	+	–	n.d.
	Mattress	795 K2	–	+	–	n.d.
2	Cow-shed	133 KS	+(1/2a)	–	+	n.d.
	Mattress	413 K1	+(1/2a)	+	–	435
	Cow-shed	413 KS	+(1/2a)	+	–	218
	Cow-shed	510 KS	+(1/2a)	–	–	450
	Cow-shed	710 KS	–	+	–	n.d.
	Cow-shed	863 KS1	+(1/2a) and +(4ab)	–	–	n.d.
	Cow-shed	863 KS2	+(1/2a)	–	–	n.d.
3	Mattress	187 K3	+(1/2a)	+	–	248
	Cow-shed	969 KS	+(1/2a)	+	–	n.d.

n.d., not detected.

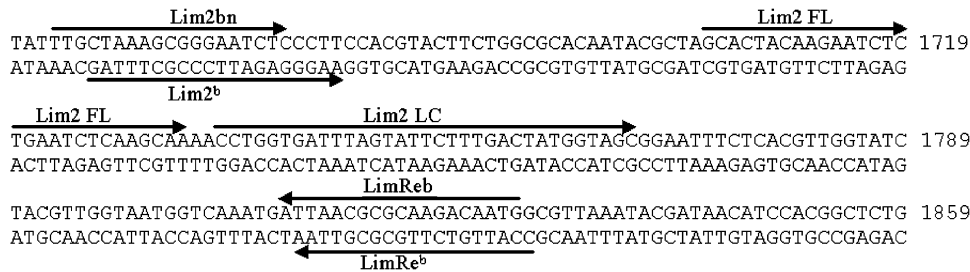


Fig. 1. Sequence of primers (Lim2bn and LimReb) and probes (Lim2 FL and Lim2 LC) of the *iap*-gene designed from Schwaiger et al. (2005) compared to primers (Lim2^b and LimRe^b) according to Hein et al. (2001).

3. Results and discussion

3.1. Culture methods for detection of *Listeria* spp.

Since direct quantitative culturing according to the ISO11290-2 method failed to demonstrate any growth of *Listeria* spp., qualitative culturing could be performed only as is described in ISO 11290-1.

Culturable *Listeria* spp. could be detected in 5 of 63 (8%) mattress samples. Species identification performed with API tests and multiplex-PCR showed the presence of *L. innocua* in 5 mattresses (8%) and of *L. monocytogenes* in 2 (3%) mattresses (Table 2). These findings correspond to data recently published by Wagner et al. (2007), who detected *Listeria* spp. in 8.7% of kitchen dust samples; *L. monocytogenes* was determined in 1.1% of all samples. As expected, shed dust samples showed a significantly higher prevalence of *Listeria* spp. than the domestic area. Eleven of 40 specimens (28%) were *Listeria* spp. positive, *L. monocytogenes* could be identified in 6 shed specimens (15%), *L. innocua* in 7 shed samples (18%) and *L. seeligeri* in one sample only. Determination of the serotypes of *L. monocytogenes* showed in all but one case serotype 1/2a (Table 2). Among 13 described serovars of *L. monocytogenes*, 3 serovars (1/2a, 1/2b and 4b) account for 95% of most findings (Kathariou, 2002). Serovar 1/2a is already known to usually be over-represented when recovered from foods and food processing plants. In one case the very rare serotype 4ab could be isolated from a cow-shed.

3.2. *Iap*-based real-time PCR for *L. monocytogenes*

Real-time PCR was performed since this technique is a highly sensitive and specific method that can quantify the presence of *Listeria* spp. in environmental samples (Gasnov et al., 2005).

Based on the work of Hein et al. (2001), Schwaiger et al. (2005) developed an *iap*-gene based PCR with additionally designed FRET hybridization probes for use in a Light-Cycler[®] real-time detection system which was used in this study. Identification criteria for the amplification of the *iap*-gene were the increase of fluorescence and the accordance of the melting curves with reference melting

Table 3

Traceability of *L. monocytogenes* in spiked dust samples by real-time PCR

Cfu/mg	Cfu per 150 mg dust	Mean value of genome copies per PCR (SD) ^a	Calculated genome copies per 150 mg dust
2×10^4	3×10^6	836,000 (297,855)	6,270,000
2×10^3	3×10^5	59,732 (19,859)	447,990
2×10^2	3×10^4	4193 (1909)	31,448
2×10^1	3×10^3	508 (237)	3810
2×10^0	3×10^2	41 (19)	308

SD, standard deviation.

^aTriplicate measurement.

curves (*L. monocytogenes* ATTC 7644). Due to occasional sequence polymorphisms of single basepairs in the stretch of the hybridization probes, slight shifts in the melting temperature could be observed. Additional sequencing of those samples confirmed the detected species as *L. monocytogenes*.

In order to determine the sensitivity of the real-time PCR, the DNA amount extracted from dust samples spiked with a 10-fold dilution series of *L. monocytogenes* was measured and used as the quantification standard. Real-time PCR experiments were carried out in triplicate (Table 3). The validation showed that this method was able to detect down to 41 copies per PCR reaction on average of the *iap*-gene of *L. monocytogenes*.

An overview of the results obtained from different locations carried out with culturing and real-time PCR is presented in Tables 2, 4 and 5.

Concerning the mattress dust, 38 of 63 (60%) samples tested positive for *L. monocytogenes* (Table 4) using real-time PCR. The genome copy numbers obtained ranged between 15 and 23,420 copies per PCR reaction, corresponding to 113 to 175,650 genome copies per 150 mg dust. Real-time PCR results obtained from shed samples revealed that 12 of 43 (28%) specimens tested positive for *L. monocytogenes*, with copy numbers varying between 22 and 973 per PCR reaction, corresponding to 165 to 7298 genome equivalents per 150 mg dust (Table 4). The negative control dust samples were consistently negative in real-time PCR.

Table 4
Detection of the *L. monocytogenes* specific *iap*-gene in mattress- and shed-dusts by real-time PCR

Group	Number of samples	Positive samples	PCR range copies per 150 mg dust		
			Mattress	Cow-shed	Swine-shed
<i>Mattresses</i>					
1	24	13	35–5233		
2	24	20	26–23,420		
3	15	5	15–121		
Total	63	38	15–23,420		
<i>Sheds</i>					
1	16	4	55–60	28–973	
2	15	6	29–680		
3	9	2	–	22–92	
Total	43	12	55–680	22–973	

Table 5
Occurrence of *L. monocytogenes* in mattress and shed dusts: comparison of the results of enrichment culturing and real-time PCR

Farm type	Real-time PCR/culture			
	+/+	-/-	+/-	-/+
Mattresses	2	25	36	0
Sheds	2	24	10	4
Total	4	49	46	4

+, *L. monocytogenes* positive samples.
–, *L. monocytogenes* negative samples.

3.3. Comparison of results derived from culturing and real-time PCR

From 103 samples (mattresses and sheds), 53 samples gave concordant results with both culture and real-time methods: four samples (2 mattress specimens, 2 shed specimens) tested positive and 49 (25 mattress specimens and 24 sheds specimens) tested negative (Table 5).

A total of 50 samples showed discordant results comparing both techniques. Most of them tested positive with the *iap*-based real-time PCR (36 mattress specimens, 10 shed specimens), but no viable *Listeria* spp. was detected. This is not entirely unexpected. It might be due either to DNA stably bound to dust particles remaining detectable or to an often-discussed dormant state of microorganisms described as viable but non-culturable (VNBC). This metabolic state might be favoured under suboptimal bacterial growth conditions (Besnard et al., 2002).

In contrast to this, only a few samples (4 shed samples) tested negative for *Listeria* spp. according to real-time PCR, but positive for *Listeria* spp. based on our culture method. This might be explained by, for example, a non-

homogenous distribution of *Listeria* spp. throughout the samples or by PCR inhibitory substances like humic acids in the DNA extract coming from soil and particles in the dusts (Von Wintzingerode et al., 1997). In addition, *L. innocua* were isolated in some of the dust samples, but no *L. monocytogenes* (Table 2) were found, although real-time PCR reacted positively to *L. monocytogenes*. Hein et al. (2001) and Bubert et al. (1999) reported that *L. innocua* is frequently found associated with *L. monocytogenes* and therefore considered *L. innocua* as a potential indicator bacterium for the presence of *L. monocytogenes*. Since usually only a few colonies—in our study three colonies—are taken from each enrichment culture plate for further species identification, one should be aware that not all *Listeria* spp. existent in the sample might have been detected.

4. Conclusions

In conclusion, of 26 farms investigated, 14 farms tested positive (culture method and real-time PCR) and seven farms tested negative in both locations (sheds and mattresses) for the occurrence of *L. monocytogenes*. Discordant results were found for five farms, which were either only *Listeria* spp. positive for animal sheds ($n = 3$) or for mattresses ($n = 2$). The concordance of *Listeria* spp. between animal sheds and mattresses was substantial ($\kappa = 0.59$ [0.26–0.9]), thereby rendering the transfer of *Listeria* spp. from the farm environment to the mattresses rather likely. The transfer might involve skin, hair or respiratory tract, but it has to be considered that *Listeria* spp. in home environments may also originate from contaminated food (Wagner et al., 2007). Transmission of certain strains from one location to another still needs to be proved by subtyping of isolates.

Our data demonstrate that mattress dust samples of farm children contained viable *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. seeligeri* and possibly *L. monocytogenes* at a non-culturable state (dead or VBNC) at a substantial prevalence. Hence, the children appear to be continuously exposed to potentially antigenic epitopes of *Listeria* species. Therefore, the immunomodulative properties of the farm environment mentioned at the beginning might occur through *L. monocytogenes* exposure, amongst others. However, the importance of these results regarding the health status of children must be evaluated by further epidemiological investigations on both the risk of listeriosis and allergy prevention effects. Furthermore, high-level epidemiologic studies will help to trace the sources of *Listeria* spp. with respect to distinct farm-related exposures.

Acknowledgments

This work was supported by “Sonderforschungsbereich Transregio 22” from the “Deutsche Forschungsgesellschaft”. We gratefully thank Ms. Barbara Dörr for

excellent technical assistance, Dr. Monika Ehling-Schulz for critical reading of the manuscript. Furthermore, we thank the participating farmers for their cooperativeness.

References

- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F., Cappelier, J.M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* 33, 359–370.
- Borucki, M.K., Gay, C.C., Reynolds, J., McElwain, K.L., Kim, S.H., Call, D.R., Knowles, D.P., 2005. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5893–5899.
- Braun-Fahrlander, C., Lauener, R., 2003. Farming and protective agents against allergy and asthma. *Clin. Exp. Allergy* 33, 409–411.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufer, A., Lauener, R.P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., von Mutius, E., 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347, 869–877.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., Wagner, M., 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4688–4692.
- Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., von Mutius, E., Bufer, E., Gattermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H., 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains, isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1514–1521.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the major serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819–3822.
- Ege, M.J., Bieli, C., Frei, R., van Strien, R.T., Riedler, J., Ublagger, E., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Scheynius, A., Pershagen, G., Benz, M.R., Lauener, R., von Mutius, E., Braun-Fahrlander, C., Parsifal Study Team, 2006. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 817–823.
- Ege, M.J., Frei, R., Bieli, C., Schram-Bijkerk, D., Waser, M., Benz, M.R., Weiss, G., Nyberg, F., van Hage, M., Pershagen, G., Brunekreef, B., Riedler, J., Lauener, R., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., Parsifal Study Team, 2007. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1140–1147.
- Gallien, P., Schönberg, A., Perlberg, K.-B., Protz, D., 2000. *Listeria*. In: Sachse, K., Gallien, P. (Eds.), *Molekularbiologische Nachweismethoden ausgewählter Zoonoseerreger*. BgVV-Heft 02/2000, pp. 113–122.
- Gasanov, U., Hughes, D., Hansbro, P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 851–875.
- Hansen, G., Yeung, V.P., Berry, G., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., 2000. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18. *J. Immunol.* 164, 223–230.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., Wagner, M., 2001. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by new real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbiol.* 152, 37–46.
- ISO 11290-1, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—part 1: detection method. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 11290-2, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—part 2: enumeration method. International Organization for Standardization, Geneva.
- Kabesch, M., Lauener, R.P., 2004. Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *J. Leukocyte Biol.* 75, 383–387.
- Kathariou, S., 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65, 1811–1829.
- Lauener, R.P., Birchler, T., Adamsky, J., Braun-Fahrlander, C., Bufer, A., Herz, U., von Mutius, E., Nowak, D., Riedler, J., Waser, M., Sennhauser, F.H., ALEX Study Group, 2002. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 360, 465–466.
- Nightingale, K.K., Schukken, Y.H., Nightingale, C.R., Fortes, E.D., Ho, A.J., Her, Z., Grohn, Y.T., McDonough, P.L., Wiedmann, M., 2004. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4458–4467.
- Perkin, M.R., Strachan, D.P., 2006. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1374–1380.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M., 2007. *Listeria*—review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40, 4–13.
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129–1133.
- Schram-Bijkerk, D., Doekes, G., Douwes, J., Boeve, M., Riedler, J., Ublagger, E., von Mutius, E., Benz, M.R., Pershagen, G., van Hage, M., Scheynius, A., Braun-Fahrlander, C., Waser, M., Brunekreef, B., 2005. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1272–1278.
- Schwaiger, K., Stiersdorfer, B., Schmahl, W., Lehmann, S., Gallien, P., Bauer, J., 2005. Zum Vorkommen bakterieller ZNS-Infektionen beim Rehwild (*Capreolus capreolus*), Rotwild (*Cervus elaphus*) und Gamswild (*Rupicapra rupicapra*) in Bayern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118, 45–51.
- Seeliger, H.P.R., Hone, K., 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan, T., Norris, J.R. (Eds.), *Methods in Microbiology*, vol. 13. Academic Press, New York, pp. 31–49.
- Skovgaard, N., Morgen, C.A., 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 6, 229–242.
- Somerville, W., Thibert, L., Schwartzman, K., Behr, M.A., 2005. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2996–2997.
- Van Strien, R.T., Engel, E., Holst, O., Bufer, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., von Mutius, E., The ALEX Study Team, 2004. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of *N*-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 860–867.
- Von Mutius, E., Braun-Fahrlander, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlermann, S., Maisch, S., Waser, M., Nowak, D., 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* 30, 1230–1234.
- Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229.
- Wagner, M., Auer, B., Trittemmel, C., Hein, I., Schoder, D., 2007. Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses Public Health* 54, 16–22.

Publikation 2:

Vogel K*, Blümer N*, **Korthals M***, Mittelstädt J, Garn H, Ege M, von Mutius E, Gattermann S, Bufe A, Goldmann T, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Hein H and Holst O., 2008. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, 307-312.

***gleichberechtigte Erstautoren**

Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties

Kay Vogel, MSc,^{a*} Nicole Blümer, PhD,^{e*} Melanie Korthals, MSc,^{f*} Jessica Mittelstädt, PhD,^b Holger Garn, PhD,^e Markus Ege, MD,^g Erika von Mutius, MD,^g Sören Gatermann, MD,^h Albrecht Bufe, MD,ⁱ Torsten Goldmann, PhD,^c Karin Schwaiger, MD,^f Harald Renz, MD,^e Sven Brandau, PhD,^b Johann Bauer, PhD,^f Holger Heine, PhD,^d and Otto Holst, PhD^a Borstel, Marburg, Freising-Weihenstephan, Munich, and Bochum, Germany

Background: Numerous epidemiologic studies have demonstrated an allergy-protective effect of farm life early in childhood. It has been hypothesized that environmental exposure to microbes may contribute to this effect. Because of their small size and thereby their potential for deposition in lower airways of small children, bacterial spores may be candidates for such allergy-protective effects.

Objective: To investigate immune responses elicited by exposure to *Bacillus* spores in experimental settings.

Methods: Animal shed and mattress dusts were analyzed for bacteria and fungi by aerobic and anaerobic growth. *Bacillus licheniformis*, the most prominent microorganism found in these samples, was investigated with respect to spore specific stimulation of pattern recognition receptors, monocyte-derived dendritic cells and T_H-cell polarization *in vitro* as well as to the prevention of asthma development in a mouse model of allergic asthma.

Results: *In vitro*, *B licheniformis* spores activated a T_H1 cytokine expression profile. *In vivo* application of these spores resulted in less spore-specific but long-lasting immune activation preventing eosinophilia and goblet cell hyperplasia; however, they provoked an influx of neutrophils in lung tissue of asthmatic mice.

Conclusion: Bacterial spores may contribute to the allergy-protective properties of farming environments, but their persistence in the lung causes ongoing immune activation in mouse experiments. (J Allergy Clin Immunol 2008; 122:307-12.)

Key words: Allergy protection, animal shed dust, hygiene hypothesis, *Bacillus licheniformis* spores, ovalbumin mouse model

Several epidemiologic investigations identified a protective effect of farm life with respect to asthma, hay fever, and atopic sensitization,^{1,2} which was related to a farming environment, high level exposure of microbial components, contact with farm animals, and gene-environment interactions.³ The risk of developing asthma was significantly reduced when contact with stables and thereby with animal sheds and feeding material such as hay occurred within the first year of life⁴ or even prenatally.⁵ In experimental studies, dust collected from cowsheds reduced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma.⁶

A large variety of microbial exposures is present in stables and barns, but little is known about immune responses elicited by exposures to specific microbial components. Bacterial spores are small (about 1.5 μm in diameter) and can therefore intrude into the lower airways even of young children. Thus, environmental exposure to bacterial spores may at least in part mediate the asthma and allergy protective effect. Sporulation enables such bacteria to survive extreme environmental conditions such as heat and dryness,⁷ including environments like animal shed dust.^{8,9} Furthermore, they are related to farm products like hay⁹ and are therefore present in high concentrations in the air of animal sheds, especially during littering. Moreover, endospore-forming bacteria such as *Bacillus* have been identified in dust samples from animal sheds and farm children's mattresses in Bavaria, south Germany.

It is conceivable that bacterial spores may germinate in the airways and stimulate the immune system not only as a spore but also as a vegetative bacterium. Therefore, the putative protective role of *Bacillus licheniformis* (strain designation, 467) was analyzed for both spores and vegetative cells. In addition, spores were heat-inactivated to abolish their capacity to germinate.¹⁰ An *in vitro* system of dendritic cells (DCs) and T cells as well as an *in vivo* mouse model of allergic asthma were used to assess the ability of *B licheniformis* 467 spores (Blspo) and vegetative *B licheniformis* 467 cells (vegBl) to counterregulate T_H2-driven immune responses¹¹ and the potential for prevention of the development of allergic asthma in mice.

METHODS

Dust sample collection

In a pilot study, dust samples from 24 dairy farms were collected in Bavaria in spring 2006. Samples were taken from 63 school-age farm children's mattresses according to Schram-Bijkerk et al¹² and from 36 animal sheds⁶ on those farms.

From the Divisions of ^aStructural Biochemistry, ^bImmunotherapy, ^cClinical and Experimental Pathology, and ^dInnate Immunity, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences; ^ethe Department of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Medical Faculty, Philipps University, Marburg; ^fthe Faculty of Life and Food Sciences, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan; ^gDr von Hauner Children's Hospital, Ludwig-Maximilians-University of Munich; ^hthe Institute for Hygiene and Microbiology, Department of Medical Microbiology, and ⁱthe Department of Experimental Pneumology, Ruhr-University Bochum.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB Transregio 22 Pulmonary Allergies; Projects A1 [K.V., M.K., M.E., J.B., E.v.M., O.H.], A2 [H.H., O.H.], A18 [N.B., H.R.], and Z2 [H.G.]).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication December 21, 2007; revised April 9, 2008; accepted for publication May 14, 2008.

Available online June 26, 2008.

Reprint requests: Otto Holst, PhD, Division of Structural Biochemistry, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 4a, D-23845 Borstel, Germany. E-mail: oholst@fz-borstel.de.

0091-6749/\$34.00

© 2008 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2008.05.016

Abbreviations used

BAL: Bronchoalveolar lavage
 Blspo: *Bacillus licheniformis* 467 spores
 DC: Dendritic cell
 hiBlspo: Heat-inactivated *Bacillus licheniformis* 467 spores
 MOI: Multiplicity of infection
 NOD: Nucleotide binding oligomerization domain
 TLR: Toll-like receptor
 vegBl: Vegetative *Bacillus licheniformis* 467 cells

The study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from the children's parents.

Microbiological analyses

To obtain pure cultures from dust specimens, 10 mg of each sample were suspended in 190 μ L PBS. Dilutions of this suspension were spread on appropriate media. Three single colonies with typical appearance for *Bacillus* spp were subcultured and isolated for species identification by microscopic and biochemical methods as well as by the use of the API systems (Biomérieux, Germany). Fungi were identified macroscopically and microscopically, using sticky tape preparation with lactophenol blue staining.¹³

Isolation and strain characterization of *Bacillus licheniformis* 467

Bacillus licheniformis strain 467 was isolated on agar plates from a mattress of a farm child involved in this study. Strain characterization was performed following instructions by Relman et al¹⁴ with regard to 16S rDNA PCR and sequencing, and to Logan and Turnbull¹⁵ for further biochemical differentiation. Sequencing results of 16S rDNA were aligned to reference strain *B licheniformis* ATCC 14580 (GenBank entry CP000002) as published by Rey et al.¹⁶ Characteristic sequence similarities with exception of some changes also present in other *B licheniformis* strains were identified.

***Bacillus licheniformis* 467 growth and sporulation**

Bacillus licheniformis 467 was grown in LB medium (Lennox; Roth, Karlsruhe, Germany) at 37°C. vegBl were harvested after 6 hours of cultivation on a rotary shaker in the middle of the exponential growth phase, then washed twice with fresh LB medium to prevent sporulation, and finally lyophilized in aliquots.

Spore preparations were performed by cultivation of *B licheniformis* 467 in LB medium (Lennox) supplemented with 20 mg L⁻¹ MgSO₄ × 7 H₂O and 10 mg L⁻¹ MnSO₄ × H₂O (Merck, Darmstadt, Germany) on a rotary shaker for 60 hours and further sporulation for 3 weeks without shaking. Subsequently, Blspo were purified by heat-inactivation of vegetative cells at 80°C for 30 minutes, followed by density gradient centrifugation using 90% Percoll (GE Healthcare, Freiburg, Germany).¹⁷ Spores were washed 5 times with distilled water, and purity was controlled by Wirtz-Conklin staining¹⁵ (see this article's Methods in the Online Repository at www.jacionline.org). Preparations free of vegetative cells were used for *in vitro* and *in vivo* experiments. Heat-killed spores were obtained by steam sterilization (121°C; 20 minutes; 200 kPa).

Isolation of human PBMCs

Human PBMCs were isolated from citrate-buffered peripheral blood of different healthy donors, independent for each experiment, by gradient centrifugation using Ficoll (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria),¹⁸ and stimulation with the respective form of *B licheniformis* 467 followed. When necessary, cells were separated by counterflow elutriation centrifugation to obtain monocytes and lymphocytes.

Human monocyte-derived DCs

Monocytes were isolated as described, concentrated to 10⁶ cells per mL, and differentiated into immature DCs in the presence of GM-CSF and IL-4

(500 U/mL each; Strathmann Biotech GmbH, Hamburg, Germany) by using RPMI (Cambrex, East Rutherford, NJ) medium containing 10% heat-inactivated FCS (Biochrom AG, Berlin, Germany), 100 U/mL penicillin (PAA Laboratories GmbH), and 100 μ g/mL streptomycin (PAA Laboratories GmbH). Cells were harvested after 5 to 7 days of the culture and stimulated at a multiplicity of infection (MOI) of 1 for bacteria and with 10 ng/mL LPS of *Salmonella enterica* sv Friedenau (kindly provided by Prof Dr Helmut Brade, Research Center Borstel, Germany), followed by the analysis of DC supernatants for the presence of TNF- α , IL-10, and IL-12 (eBioscience Human ELISA Ready-SET-Go! Kit; NatuTech, Frankfurt, Germany).

Mixed leukocyte reaction

Heterologous lymphocytes (2×10^5) were seeded into 96-well round-bottom plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) in a total volume of 100 μ L per well; 2×10^4 , 2×10^3 , and 2×10^2 DCs, stimulated before mixed leukocyte reaction, were added to give final ratios of 1:10, 1:100, or 1:1000 DC:lymphocytes and incubated for 4 days. Cell-free culture supernatants were analyzed by Beadlyte Human Multi-Cytokine Detection System 4 (Upstate; Millipore Corp, Billerica, Mass). As a positive control, we used LPS of *S enterica* sv Friedenau, a strong stimulator of DC maturation,^{19,20} as well as *Mycobacterium bovis* BCG, inducing DC maturation without any T_H-cell polarization.²¹

Animals

Female BALB/c mice age 6 to 8 weeks from Harlan Winkelmann (Borchen, Germany) were kept under pathogen-free housing conditions. Water and an ovalbumin-free diet were supplied *ad libitum*. All experiments were performed according to federal and international guidelines and were accepted and controlled by local authorities (Regierungspräsidium Giessen).

Protocol of allergen provocation

Sensitization and challenge of mice to induce a local allergen provoked inflammatory response in the lungs was performed according to DeBarry et al.²² The detailed application is described in the protocol displayed in this article's Fig E1 in the Online Repository at www.jacionline.org. Intranasal treatment was started 12 days before the first ovalbumin injection, applying vegetative *B licheniformis* 467 cells in fresh LB medium to prevent sporulation, dormant spores, heat-inactivated *B licheniformis* 467 spores (hiBlspo) hindered in germination, or PBS as negative control over the whole process of sensitization and challenge.

Cell analysis of bronchoalveolar lavage fluid

Bronchoalveolar lavage (BAL) analysis was performed 48 hours after the last allergen challenge as described earlier.²³ Total leukocytes were determined with a Casy TT cell counter (Schaefer Systems, Reutlingen, Germany). Cytospin was performed at 300g, and cells were differentially stained with Diff Quick (Dade Diagnostics, Unterschleißheim, Germany). Remaining cell-free BAL fluids were stored at -20°C for further investigations of cytokine levels.

Detection of cytokines in BAL fluid

IFN- γ , IL-10, and IL-5 levels in BAL fluid were determined by using OptEIA ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, Calif).

Lung histology

Lungs were fixed by infusion of a 4% (wt/vol) formaldehyde solution and stored in the same solution. Sections (3 μ m) of paraffin embedded lung tissues were stained with hematoxylin/eosin or periodic acid-Schiff.

Statistical analysis

All data are shown as means \pm SEMs. Significance was analyzed by using Graph Prism software (Graph Pad Software, Inc, San Diego, Calif) and the Student unpaired *t* test. Significant differences were considered at *P* < .05.

For transmission electron microscopy, transfection of human embryonic kidney 293 cells, and airway responsiveness to methacholine, see Methods in the Online Repository.

RESULTS

Microbial flora of animal shed and mattress dusts

To investigate the bacterial composition of animal shed dusts, we analyzed 61 mattress dust and 36 animal shed dust samples of 24 traditional farms in Bavaria. Growth determinations on different agar plates for bacterial and fungal species indicated a great diversity (see this article's Table E1 in the Online Repository at www.jacionline.org). The most prominent microorganisms in settled dust from animal sheds and in mattress dusts were *Bacillus* spp and coliform bacteria. To investigate the transport of animal shed bacteria to the children's mattresses, colony-forming unit numbers in mattress and animal shed dusts were compared for all farms (Table E1). A correlation of colony numbers of all microorganisms in mattress and animal shed dust samples was calculated (see this article's Table E2 in the Online Repository at www.jacionline.org). The genera *Clostridium* and *Enterococcus* showed the highest correlation coefficients, but less than 1/3 of the children were in measurable contact with these microorganisms. Correlation for *Bacillus* spp, present in 97% of all mattress dust samples, was $r = 0.37$ ($P = .0039$). These findings support the idea of a relevant contact of farm children to *Bacillus* spores.

Detailed analysis of *Bacillus* spp in all collected dusts showed the presence of *B licheniformis* in 95% of all samples. In descending order, *Bacillus pumilus* (31%), *Bacillus subtilis* (28%), and *Bacillus cereus* (7%) followed with significantly reduced frequencies. Therefore, *B licheniformis* spores were chosen for further analyses. As expected, electron micrographs of these spores showed a particle size of about 1.5 μm (see this article's Fig E2 in the Online Repository at www.jacionline.org), which enables their inhalation into the lower airways, even in newborns.

Specific immune stimulation by *Bacillus licheniformis* 467 spores in a human *in vitro* system

To investigate whether Blspo as a dormant form of the bacterium was able to stimulate the innate immune system for T_H -cell polarization,²⁰ we analyzed the stimulatory capacity of *B licheniformis* spores on cytokine response of PBMCs. A differentiation between spore-specific results and stimulation by germinated bacteria was achieved by testing spores as well as vegetative cells and hiBlspo, which were no longer able to germinate. Blspo and hiBlspo caused a TNF- α release at comparable levels. In contrast, vegBl induced a significantly higher TNF- α release (Fig 1). Stronger cytokine expression by vegBl was furthermore achieved by stimulation of HEK293 cells transiently transfected with the pattern recognition receptors Toll-like receptor (TLR)-2 or peptidoglycan receptor nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-2 (see this article's Table E3 in the Online Repository at www.jacionline.org).

No germination was microscopically observed in the *in vitro* medium (data not shown). On the basis of these spore-specific results, Blspo and vegBl were compared at an MOI of 1 in the following *in vitro* experiments.

Stimulation of monocyte-derived DCs

Next, dormant spores and vegetative cells were investigated concerning their ability to stimulate human DCs, important for

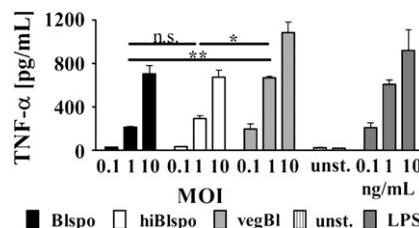


FIG 1. Stimulation of PBMCs by Blspo, hiBlspo, and vegBl. Data show means \pm SEMs of TNF- α measurement in culture supernatant after dose-dependent (MOI) PBMC stimulation for 24 hours of 3 independent experiments from different healthy donors. * $P < .05$; ** $P < .01$. *n.s.*, Not significant; *unst.*, unstimulated.

differential immune responses to bacteria.²⁴ Therefore, the expression of a typical T_H1 -directing cytokine (IL-12p70), a proinflammatory cytokine (TNF- α), and a regulatory cytokine (IL-10)²⁵ was analyzed (Fig 2, A). TNF- α expression and IL-10 expression were increased after stimulation with vegetative bacteria, in comparison with spores. Moreover, the strongest phenotypic maturation of human monocyte-derived DCs (moDCs), resulting in expression of costimulatory molecules such as CD83 and CD86, was achieved by the stimulation with vegetative bacteria (data not shown). In contrast, secretion of IL-12 was detectable exclusively after incubation with Blspo, indicating a spore-specific T_H1 signal.

Polarization of T_H cells

Because Blspo induced a spore-specific cytokine profile in DCs with a weak expression of cytokines, we analyzed the effect of stimulated DCs on T_H -cell polarization and the ability of Blspo to contribute to a counterregulation of allergic T_H2 polarization. As a characteristic cytokine for T_H1 -polarized cells, IFN- γ expression was measured. In contrast with IFN- γ , IL-5 and IL-13 were measured to determine cytokine expression of T_H2 cells responsible for the activation of eosinophils.²⁶ The strongest induction of IFN- γ was observed after maturation of DCs by *B licheniformis* 467 spores (Fig 2, B), whereas IL-5 and IL-13 were not released. In contrast, IL-5 and IL-13 were induced by stimulation with vegetative bacteria.

Effect of intranasal *B licheniformis* pretreatment on asthma induction in mice

To investigate whether the specific immune stimulation found for *B licheniformis* 467 spores *in vitro* was able to prevent the establishment of allergic asthma *in vivo*, we applied a protocol to induce experimental asthma (Fig E1). Spore-specific effects were analyzed by comparison of those spores able to germinate to those hindered in germination by heat-inactivation, as well as to vegetative cells. Analyses of BAL cells showed a significantly decreased number of eosinophils (T_H2 triggered effectors) in all *B licheniformis*-treated groups in contrast with the sham-treated mice (Fig 3, A). Application of vegBl resulted in the strongest reduction of eosinophils with significant differences to the hiBlspotreated group. On the contrary, increased neutrophil numbers (T_H1 triggered effector cells) were confined to treatment with vegBl and spores able to germinate (Fig 3, B).²⁶ In Blspo-treated groups, cell numbers of eosinophils and neutrophils were in between those scores found for mice treated with either vegBl or hiBlspo, indicating ongoing germination. The decrease of lymphocytes after spore treatment showed that spores but not vegBl

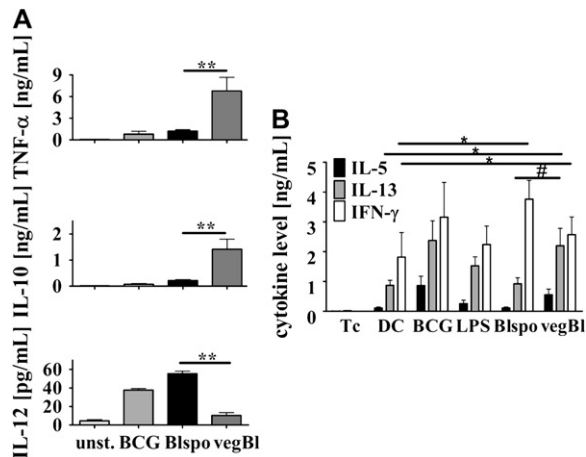


FIG 2. Stimulation of moDCs by *Bacillus licheniformis* 467 (MOI = 1) for 24 hours (A) before mixed leukocyte reaction (B). Cells were isolated from peripheral blood of healthy donors. Results of cytokine measurements are expressed as the mean of 3 independent experiments \pm SEM. BCG, *Mycobacterium bovis*; DC, unstimulated DCs plus leukocytes; LPS, LPS 10 ng/mL; TC, leukocytes alone; unst., unstimulated.

were able to downregulate the specific immune reaction (Fig 3, C) caused by ovalbumin sensitization and challenge.

Lung histology revealed a decrease of peribronchial inflammation and an almost complete prevention of goblet cell hyperplasia by pretreatment with the bacterium in all its forms (Fig 4, A). Despite this observation, airway hyperreactivity to methacholine was only marginally improved by bacterial administration (see this article's Fig E3 in the Online Repository at www.jaci.org). Contrary to this beneficial effect, lung histology showed the formation of multinucleated giant cells by macrophage fusions as a sign for ongoing bacterial clearance in the lung (Fig 4, B).²⁷ This was supported by the increased infiltration of macrophages in the BAL after spore treatment (Fig 3, D).

The cytokine level in the BAL was investigated to clarify the state of inflammation in the airways. Spore treatment led to a 50 \times increase of IFN- γ levels in comparison with sham-treated mice, corresponding with the observed high number of neutrophils in the BAL (Fig 5). On the other hand, hiBlspo and vegBI caused only marginal induction of IFN- γ and IL-10.

To confirm whether the high cytokine levels were caused by an ongoing immune activation, we analyzed lung tissue and BAL cytopins for the presence of Blspo and vegBI. Wirtz-Conklin staining enabled the detection of *B licheniformis* 467 spores in alveolar macrophages independent of heat-inactivation (see this article's Fig E4 in the Online Repository at www.jacionline.org). Vegetative bacteria, on the other hand, could not be detected by any staining method applied, irrespective of a previous treatment with vegetative bacteria or with spores competent in germination. Outside macrophages, neither spores nor vegetative bacteria were found (Fig E4). In this way, even 4 days after the last treatment, an ongoing immune activation was demonstrated by the presence of high cytokine levels and the formation of multinucleated giant cells. The T_H2 cytokine IL-5, responsible for activation of eosinophils, was not significantly reduced in the absence of eosinophils.

DISCUSSION

A clear protective effect of both cowshed dust extract and certain bacteria on the establishment of experimental asthma was shown in recent publications.^{6,22} The basis of our investigations

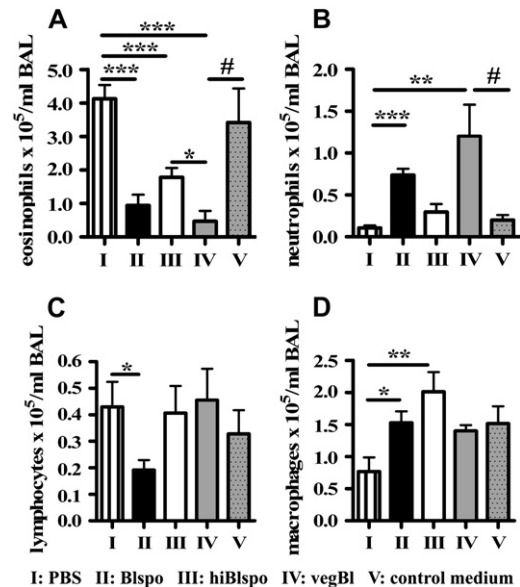


FIG 3. Effect of intranasal treatment with *Bacillus licheniformis* 467 on the airway inflammation of ovalbumin-sensitized and challenged mice (n = 8). Mice BAL fluid was assessed for numbers of total eosinophils (A), neutrophils (B), lymphocytes (C), and macrophages (D). Depicted are means \pm SEMs; significant differences between sham-treated (PBS) mice and bacteria treated mice are indicated by * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$. # indicates significant differences between vegBI-treated mice and control medium-treated mice.

was a detailed analysis of the microbial composition of protective cowshed dusts. We identified a great diversity of microbial species in cowshed and mattress dusts from 24 dairy farms. The genus *Bacillus* showed high colony-forming unit numbers and a significant correlation between the presence in farm children's mattresses and animal sheds on these farms for almost all children involved in the study. Thus, farm children are likely to be exposed to *Bacillus* spp to a substantial extent. The predominant *Bacillus* species was *B licheniformis*, and the isolated strain 467 was investigated in detail, in particular concerning its allergy-protective properties.

The essential role of antigen-presenting cells such as DCs, which link innate and adaptive immunity, consists in its effect on T-cell development.²⁸ DC stimulation by *B licheniformis* 467 mediated by TLR2 and NOD2, as shown for transfected HEK cells, resulted in a spore-specific IL-12 induction after spore stimulation, in contrast with an IL-10 and TNF- α -dominated cytokine expression profile for vegBI. Furthermore, stimulation with these different *B licheniformis* forms led to significant differences in T_H-cell polarization. *In vitro* stimulation with Blspo but not with vegBI resulted in upregulation of the T_H1 cytokine IFN- γ , which itself is known to downregulate T_H2 cytokines.^{29,30} Vegetative cells, in contrast, induced T_H2 cytokine expression (IL-5 and IL-13). These results led to the question whether spore pretreatment could prevent the establishment of allergy-related T_H2 immune responses *in vivo*.

Comparing BAL eosinophil, neutrophil, and macrophage subpopulations after treatment with Blspo of ovalbumin-sensitized mice, the fluid cell numbers were intermediate with respect to vegBI and hiBlspo, indicating spore germination in the airways. A measurement of BAL cytokines supported this hypothesis, because high concentrations of IFN- γ and IL-10 were observed exclusively in mice treated with Blspo able to germinate. In both mice groups treated either with Blspo or with hiBlspo, spores

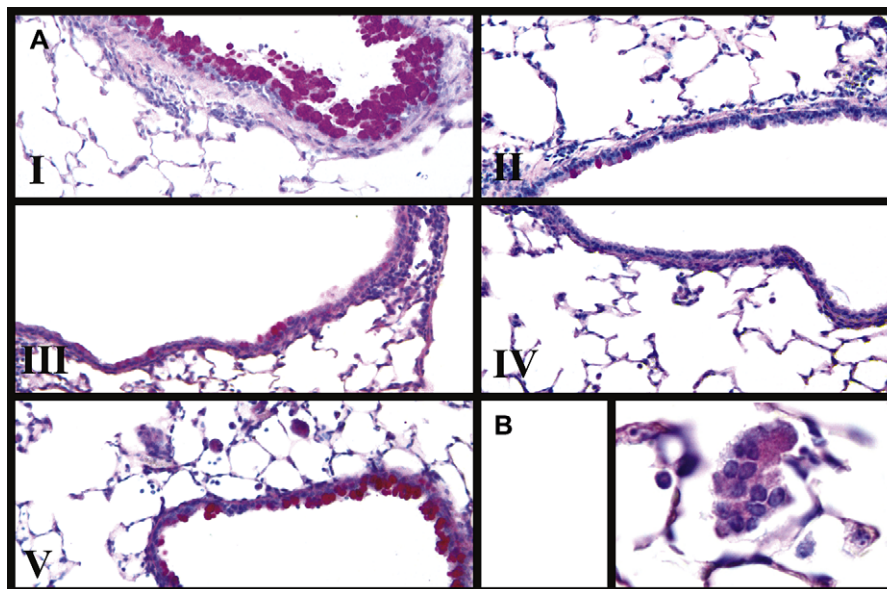


FIG 4. Prevention of goblet cell hyperplasia (A) and fusion of mononuclear cells (B) by *Bacillus licheniformis* 467 treatment. Shown are representative micrographs of mice airways after periodic acid-Schiff staining. A, I, sham-treated mice; II, Blspo-treated mice; III, hiBlspo-treated mice; IV, vegBl-treated mice; V, control medium-treated mice. B, Formation of multinucleated giant cells shown is representative of all *B licheniformis*-treated groups.

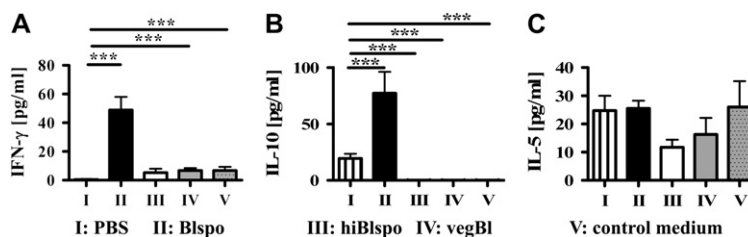


FIG 5. BAL cytokines IFN- γ (A), IL-10 (B), and IL-5 (C) measured after *B licheniformis* 467 treatment of mice sensitized and challenged to ovalbumin ($n = 8$). The determination of cytokine levels was performed by ELISA of BAL fluid. Shown are results as means \pm SEMs for each treated group. Significant differences between sensitized PBS-treated and bacteria-treated mice are indicated by * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$.

were observed in the lung tissue, phagocytosed by increased numbers of alveolar macrophages, even 4 days after the last treatment. However, germination was not demonstrated directly by staining for vegBl. In this way, the *in vivo* results for Blspo-treated mice were not as spore-specific as they were *in vitro*.

IFN- γ is expressed by T_H1 cells to activate cellular defense mechanisms, namely macrophage and neutrophil recruitment. In this case, a direct association in the numbers of neutrophils and macrophages would be expected.³¹ The inverse association we found, with high neutrophil numbers in BAL of mice treated with vegBl and high macrophage numbers in BAL of Blspo-treated mice, indicated 2 different mechanisms of clearance of these cell forms in the lung: on the one hand, a fast clearance of vegBl by neutrophils, and on the other hand, a clearance of spores by macrophages.³² Intermediate results for Blspo indicate slow germination of single spores, activating a moderate but long-lasting immune response. This is supported by the fact that increased IFN- γ levels were measured only in the spore-treated groups. Thus, eosinophilic inflammation in the airways was prevented by shift from a T_H2 triggered allergic response to a process characterized by neutrophil infiltration. Neutrophils are recruited on IL-12 signal by DCs,²⁸ $CD8^+$ T cells, natural killer cells,³³ or

T_H17 cells.²⁶ Other bacteria such as *Acinetobacter lwoffii* or *Lactococcus lactis*²² have been reported to downregulate eosinophilic infiltrations without inducing neutrophil infiltration. This was accompanied by high IL-12 levels after stimulation of moDCs. Thus, through which mechanisms Blspo and vegBl cause neutrophil infiltration must be investigated further.

Bacillus licheniformis 467 spores and vegBl lead to an almost complete absence of mucus-producing goblet cells despite provocation by ovalbumin sensitization and challenge. However, this was not related to airway hyperreactivity. Different pathways may be responsible for this phenomenon: improvement of airway hyperreactivity has been reported to be IL-12-dependent, whereas eosinophilic infiltrations resulted from neutralization of IL-10.³⁴ Because high expression levels of IL-10 were detected in the current study after stimulation of moDCs *in vitro* and in BAL fluid, our data are in line with a beneficial effect of IL-10 on the prevention of eosinophilia. In contrast, beneficial effects of IL-12 were not observed, presumably because of low expression levels *in vitro*. With respect to the effects of *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis*,²² a higher induction of IL-12 expression by moDCs is necessary to reduce airway hyperreactivity. In an inflammatory state, regulatory T cells, induced by IL-10

expression of DC,²⁵ secrete high levels of IL-10, which is acting as an immunosuppressive agent³⁵ and facilitates the clearance of *B licheniformis* in the lung in an IL-12-independent way.

In summary, *B licheniformis* 467 spores did not germinate *in vitro*, leading to a spore-specific T_H1-polarizing cytokine pattern. *In vivo* intranasal application of *B licheniformis* 467 resulted in decreased eosinophilia and a reduction of mucus-producing goblet cells on one side, but to neutrophil infiltration, provoking a T_H1-type inflammation on the other side. In the context of potential asthma prevention by inhalation of spores into the lower airways, the study clarified that there is an effect on the reduction of eosinophilic infiltrations, but not on the improvement of airway hyper-reactivity. However, the *in vitro* spore-specific effects directing to a T_H1 polarization dependent on IL-12 expression were not verified *in vivo*. Inhalation of vegB1 was cleared by neutrophil recruitment, whereas the clearance of spores was processed by accumulated macrophages. In this way, germination of B1spo in the lung led to a delayed but long-lasting immune response.

The aim of the study was to investigate the contribution of bacterial spores to the allergy-protective effect of the animal shed environment, and we could clearly show some immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. It is possible that exposure to a wider range of farm bacteria results in a synergistic effect as indicated by earlier investigations on *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis*; however, this has not been proven to date.

We thank Dr Holger Schultz, Research Center Borstel, and Prof Dr Heinz Fehrenbach, Philipps University Marburg, for scientific advice concerning lung histology. For *in vitro* tests in transfected HEK293 cells, we thank Ina Goroncy and Kirsten Bruderek for helping with DC stimulation. Expression plasmids containing human CD14, human myeloid differentiation factor-2, flag-tagged versions of human TLR2 and human TLR4, as well as NOD1 and NOD2 were kindly provided by Dr D. T. Golenbock (Worcester, Mass), Dr K. Miyake (Kitasato, Japan), Dr P. Nelson (Seattle, Wash), and Dr P. Rosenstiel, (Kiel, Germany). We thank Prof Dr Helmut Brade (Research Center Borstel, Germany) for providing LPS of *S enterica* sv Friedenau and Prof Dr Koichi Fukase (Osaka, Japan) for providing muramyl dipeptide. We thank Heike Kühl and Jasmin Tiebach for help with transmission electron microscopy as well as Anja Spies-Naumann and Thomas Ruppertsberg for technical assistance in mouse experiments.

Clinical implications: This study provides insight into the response to inhaled microbial spores and their potential impact in allergy-protective effects of farm environments for prospective applications of isolated microbial components.

REFERENCES

- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358:1129-33.
- Stern DA, Riedler J, Nowak D, Braun-Fahrlander C, Swoboda I, Balic N, et al. Exposure to a farming environment has allergen-specific protective effects on TH2-dependent isotype switching in response to common inhalants. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:351-8.
- von Mutius E. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:212-6.
- Braun-Fahrlander C. The role of the farm environment and animal contact for the development of asthma and allergies. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1799-803.
- Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Üblagger E, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:817-23.
- Peters M, Kauth M, Schwarze J, Körner-Rettberg C, Riedler J, Nowak D, et al. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* 2006;61:134-9.
- Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, et al. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004;7:204-11.
- Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:117-26.
- Andersson AM, Weiss N, Rainey F, Salkinoja-Salonen MS. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol* 1999;86:622-34.
- Driks A. The dynamic spore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3007-9.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001;1:69-75.
- Schram-Bijkerk D, Doekes G, Douwes J, Boeve M, Riedler J, Üblagger E, et al. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1272-8.
- Larone D. Medical important fungi: a guide to identification, 4th ed. Washington (DC): ASM Press; 2002.
- Relman DA. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: Persing DH, White TJ, Tenover FC, Smith TF, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. Washington, D.C.: ASM Press; 1993. p. 489-95.
- Logan NA, Turnbull PCB. Bacillus and other endospore-forming bacteria. In: Murray PM, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH, editors. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington (DC): ASM Press; 2003. p. 445-60.
- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol* 2004;5:R77.
- Tisa LS, Koshikawa T, Gerhardt P. Wet and dry bacterial spore densities determined by buoyant sedimentation. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:1307-10.
- Wittkowski M, Mittelstadt J, Brandau S, Reiling N, Lindner B, Torrelles J, et al. Capsular arabinomannans from *Mycobacterium avium* with morphotype specific structural differences but identical biological activity. *J Biol Chem* 2007;282:19103-12.
- Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:4524-30.
- Sun J, Walsh M, Villarino AV, Cervi L, Hunter CA, Choi Y, et al. TLR ligands can activate dendritic cells to provide a MyD88-dependent negative signal for Th2 cell development. *J Immunol* 2005;174:742-51.
- Madura LJ, Stabell BC, Fillie Y, van der KD, Aaby P, Yazdanbakhsh M. BCG stimulated dendritic cells induce an interleukin-10 producing T-cell population with no T helper 1 or T helper 2 bias *in vitro*. *Immunology* 2007;121:276-82.
- Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blümer N, von Mutius E, et al. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1514-21.
- Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, et al. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:57-67.
- Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:180-92.
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271-83.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
- Most J, Spott L, Mayr G, Gasser A, Sarti A, Dierich MP. Formation of multinucleated giant cells *in vitro* is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Blood* 1997;89:662-71.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:245-53.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone, I: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005;175:5-14.
- Revsht H, Pynaert G, Grooten J, De Baetselier P, Lipoprotein I. A TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol* 2005;174:1097-103.
- Hong HA, Duc IH, Uyen NQ, Cutting SM. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine* 2004;22:1873-85.
- Vremec D, O'Keefe M, Hochrein H, Fuchsberger M, Caminschi I, Lahoud M, et al. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 2007;109:1165-73.
- Sel S, Wegmann M, Sel S, Bauer S, Garn H, Alber G, et al. Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J Immunol* 2007;178:7805-13.
- Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 2005;202:1459-63.

METHODS

Wirtz-Conklin stain of spores

Bacterial suspensions were prepared on an object slide, heat-fixed, and covered with 5% aqueous malachite green (Merck, Darmstadt, Germany). The covered slide was heated gently to steaming for 5 minutes to enhance dye uptake by bacterial spores, rinsed with water, and counterstained for 1 minute with 1% aqueous safranin (Merck, Darmstadt, Germany). Following safranin removal by washing, the dried slide was examined by light microscopy.

Transmission electron microscopy

Spores and vegetative bacteria were prepared as described in the article. Transmission electron microscopy was performed according to Andr a et al.^{E1} Spores were washed 5 times in distilled water, whereas vegetative bacteria were washed 3 times in PBS. The pellets were fixed in 2% osmium tetroxide for 1.5 hours and washed 3 times with distilled water. Postfixation positive stain was followed by addition of 2% aqueous uranyl-acetate and incubation at 25°C for 1 hour. After washing, the pellet was dehydrated in serial ethanol washes. After the transfer to propylene oxide for 15 minutes, samples were infiltrated at 4°C for 16 hours by a 1:1 mixture of propylene oxide-Epon-resin mix (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Germany), and polymerization followed embedding in an Epon-resin-mix at 60°C for 16 hours. Ultrathin-sections were cut by using a paramyotom. Slices were placed on a copper grid and counterstained in lead citrate in a CO₂-free environment, and micrographs were taken with an EM Zeiss 910 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Transfection of HEK293 cells

HEK293 cells were transfected with the expression plasmids for TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2.^{E2} Twenty-four hours postinfection, cells were washed with PBS and stimulated with either live or lyophilized vegetative

cells of *B licheniformis* 467 spores or heat-inactivated spores for 18 hours. Concentrations of IL-8 in cell-free supernatant were determined by ELISA (Biosource, Solingen, Germany). As positive controls, Pam₃CSK₄ (EMC Microcollection, T bingen, Germany) and muramyl dipeptide,^{E3} kindly provided by Prof Koichi Fukase (Osaka, Japan), were used.

Airway responsiveness to methacholine

Midexpiratory airflow was measured by head-out body plethysmography as described previously,^{E4} and the concentration of β -methacholine responsible for a 50% reduction in midexpiratory airflow was reported.

Statistical analysis

All data are shown as means \pm SEMs. Significance was analyzed by using Graph Prism software (Graph Pad Software, Inc, San Diego, Calif) and the Student unpaired *t* test.

REFERENCES

- E1. Andr a J, Monreal D, Martinez de Tejada G, Olak C, Brezesinski G, Gomez SS, et al. Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. *J Biol Chem* 2007;282:14719-28.
- E2. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesm ller KH, Jung G, Brock R, Ulmer AJ. Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *FEBS J* 2005;272:6354-64.
- E3. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
- E4. Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, et al. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1263-71.

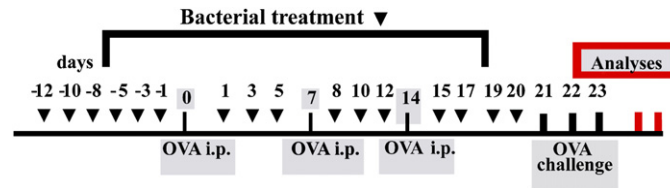


FIG E1. Schematic protocol of the experimental design for mouse experiments. Female BALB/c mice were sensitized at days 0, 7, and 14 by ovalbumin (*OVA*) intraperitoneal (*i.p.*) injections followed by *OVA* aerosol exposure at days 19, 20, and 21. Twelve days before the first *OVA* injection and during the whole sensitization period, mice received *B licheniformis* 467 spores, heat-inactivated *B licheniformis* 467 spores, or vegetative *B licheniformis* 467 intranasally every second day. Mice were analyzed at days 22 and 23 for airway inflammation and lung function.

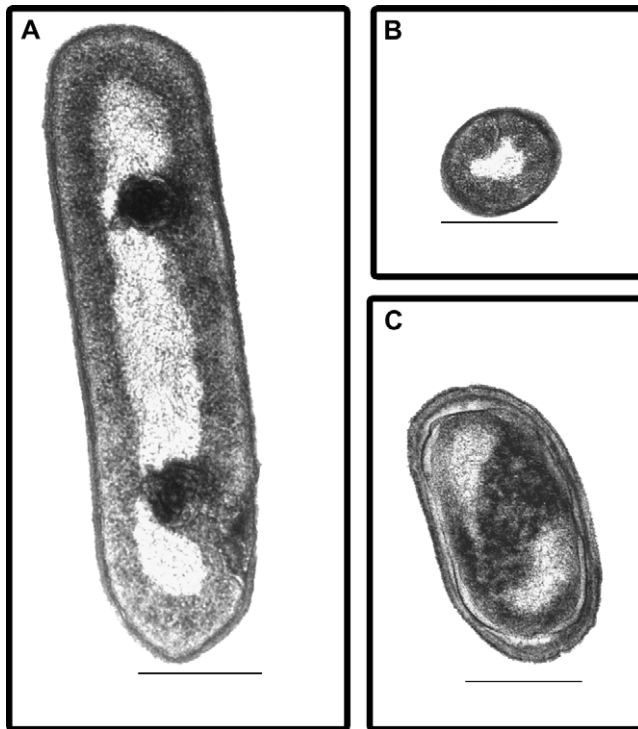


FIG E2. Transmission electron micrograph of *B. licheniformis* 467. The vegetative bacterium, obtained from the log-phase of growth, is shown in longitudinal (**A**) and cross (**B**) sections. **C**, The dormant spore protected by several layers of highly cross-linked proteins and peptidoglycan. Bars indicate 0.5 μm .

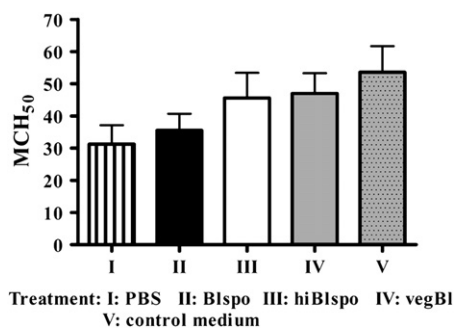


FIG E3. Analyses of lung function by head-out body plethysmography. Mice sensitized and challenged to ovalbumin, during and after bacterial treatment with *B licheniformis* 467 as the indicated forms. Methacholine concentrations that caused 50% reduction in baseline midexpiratory airflow (MCH_{50}) are displayed. No treatment was able to achieve significant increase in airway hyperreactivity.

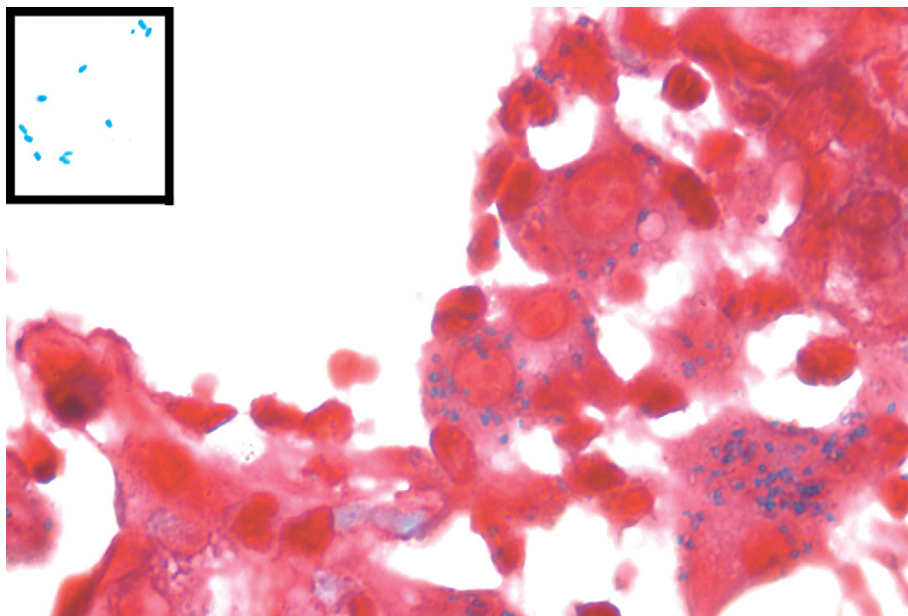


FIG E4. Lung tissue of *B licheniformis* 467 spore-treated mice after Wirtz-Conklin staining phagocytosed by alveolar macrophages. Staining was performed by using paraffin-embedded lung tissue 4 days after the last spore treatment. *Left upper corner* shows *B licheniformis* spores on an object slide. Magnification $\times 1000$. Similar results were obtained by staining lung cytopins of Blspo and hiBlspo.

TABLE E1. Analyses of the microbial flora of cowshed dusts and farm children's mattresses from 24 Bavarian farms (shed/mattress)

Isolated microorganisms	Median/IQR (log)		Shed/mattress			
	mattress dust	Shed dust	+/+	+/-	-/+	-/-
<i>Bacillus</i> spp	5.25/0.87	6.26/0.84	24	0	0	0
Coliform bacteria	5.67/0.94	5.83/0.77	24	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp	3.00/3.30	3.00/3.78	9	7	5	3
<i>Enterococcus</i> spp	3.15/4.47	3.48/3.95	11	7	3	3
<i>Clostridium</i> spp	0.00/3.00	3.00/3.78	9	6	3	6
<i>Aspergillus</i> spp	4.00/1.10	4.88/0.93	23	1	0	0
<i>Mucor</i> spp	3.75/1.00	4.48/1.15	21	2	1	0
<i>Cladosporium</i> spp	0.00/3.74	4.00/5.34	10	4	3	7
<i>Penicillium</i> spp	3.00/4.00	0.00/3.95	8	3	9	4
<i>Wallemia</i> spp	3.48/4.00	4.70/5.35	16	3	4	1

Median logarithmic values of colony-forming units/interquartile range (*IQR*) are shown. Moreover, concordant and discordant results between sheds and children's mattresses on these farms clustered for 24 families are given for the respective microorganisms.

TABLE E2. Correlation of colony numbers of all microorganisms in mattress and animal shed dust samples

Microorganism	N*	Partial correlation coefficient†	P value
<i>Clostridium</i> spp	16	0.55	.0340
<i>Enterococcus</i> spp	20	0.54	.0181
<i>Bacillus</i> spp	61	0.37	.0039
<i>Cladosporium</i> spp	16	0.34	.2212
<i>Wallemia</i> spp	30	0.31	.0990
Anaerobic bacteria	57	0.23	.0841
<i>Mucor</i> spp	48	0.21	.1547
Aerobic bacteria	58	0.19	.1574
<i>Penicillium</i> spp	14	0.14	.6389
<i>Lactobacillus</i> spp	16	0.06	.8271
<i>Aspergillus</i> spp	55	-0.02	.8666
Coliform bacteria	61	-0.17	.2063

The genus investigated in more detail in this study is in boldface text.

*Number of children with measurable exposure to the respective microorganisms in animal sheds.

†Partial correlations are adjusted for family clusters.

TABLE E3. Expression of IL-8 (pg/mL) of transiently transfected HEK293 cells stimulated for 24 hours with *B licheniformis* 467 preparations at a MOI = 1

HEK 293 cells expressing	Blspo	hiBlspo	vegBl	Unstimulated	Positive control*
TLR 2	1245.5 ± 345.1	1253.2 ± 185.47	12,365.5 ± 2273.3	8.2 ± 4.7	5234.5 ± 477.2
NOD2	305.0 ± 102.1	193.5 ± 7.5	1015.4 ± 81.9	156.3 ± 31.5	1103.6 ± 57.6

Vegetative bacteria show higher activation of transfected HEK293 cells than spores do.

*As a positive control for stimulation of TLR2-transfected HEK293 cells, Pam₃CSK₄-^{E2} was used. Positive control for the stimulation of NOD2-transfected cells was muramyl dipeptide.^{E3}

Publikation 3

Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E and Bauer J., 2008. Application of PCR-SSCP of farm children to bacteria in environmental dust. Journal of Microbiological Methods 73, 49-56.

Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust

Melanie Korthals^{a,*}, Markus J. Ege^b, Christoph C. Tebbe^c, Erika von Mutius^b, Johann Bauer^a

^a Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany

^b Dr. von Haunersche Kinderklinik München, Ludwig-Maximilians Universität München, Lindwurmstr. 4, 80337 Munich, Germany

^c Institut für Agrarökologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany

Received 23 October 2007; received in revised form 21 January 2008; accepted 25 January 2008

Available online 5 February 2008

Abstract

The environmental exposure of farm children to microorganisms in dust has become a focus of interest, since microbial exposure on farms has been related to a reduced prevalence of asthma and atopic diseases in children. Previous studies almost exclusively focused on the determination of microbial counts using conventional culturing or the determination of microbial compounds i.e. endotoxins. In this study PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) was modified for characterising bacterial communities in environmental dusts and their sensitivity and reproducibility was validated. A fivefold repeated PCR-SSCP analyses of a well homogenised mattress dust, cow-shed dust, swine-shed dust, chicken-shed dust and a horse-shed dust sample, respectively, showed similarities, based on Pearson correlations, ranging from 89.7% to 95.2%. The reproducibility of day to day variations (five days) and gel to gel variations (five gels) was also around 90%. The detection limit of *Escherichia coli* was 7×10^1 cfu g⁻¹ whereas *Listeria monocytogenes* and *Bacillus licheniformis* containing 30% spores showed visible bands at 7×10^2 cfu g⁻¹. Application of this method to dust samples of 37 sheds and 63 children's mattresses showed that distinct farm environment dusts reflected different SSCP profiles. However, digital analysis of the gels showed that some bands in the profiles of shed- and mattress dusts were found at the same position in the gels. By excision, cloning, sequencing and phylogenetic analyses, these bands were identified as *Corynebacterium tuberculoearicum*, *Corynebacterium mucifaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium linens* and *Arthrobacter* spp, respectively. These results may reflect transfer of microorganisms from animal sheds to mattresses. In conclusion this study demonstrates that PCR-SSCP is a promising method with sensitive detection limits and moderate sample variances to be applied for epidemiological studies characterizing the exposure of farmers using environmental dust.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Environmental exposure; Bacterial communities; PCR-SSCP; Mattress dust; Shed dust

1. Introduction

During recent decades, there has been an increasing interest in the environmental exposure of farmers to dust microorganisms, but results obtained from such studies are still controversial. Several studies with focus on occupational medicine have demonstrated an association of human exposure to airborne bacteria or their components, particularly endotoxins, in animal sheds with respiratory diseases such as organic dust

toxic syndrome, chronic obstructive pulmonary diseases and asthma-like syndrome (Radon, 2006; Radon et al., 2004; Singh and Schwartz, 2005; Linacker and Smedley, 2002). In contrast, farm children who were exposed to animal sheds and farm animals in early life consistently showed lower prevalences of hay fever, atopic sensitization, and with some limitation asthma, than children of the same age not exposed to such an environment which may be induced by the microbial flora (Debarry et al., 2007; Van Strien et al., 2004; Braun-Fahrlander et al., 2002; Riedler et al., 2001; von Mutius et al., 2001). The effect seems to be sustained until adulthood (Leynaert et al., 2006; Radon et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +49 8161 715503; fax: +49 8161 714516.

E-mail address: melanie.korthals@wzw.tum.de (M. Korthals).

A strong limitation of the hitherto existing studies is that they were all based on the analyses of microbial counts to quantify microbial exposures of humans using conventional culturing and measurement of microbial compounds such as endotoxin and *N*-acetyl-muramic acid (Debarry et al., 2007; Lee et al., 2006; Van Strien et al., 2004; Albrecht et al., 2003; Radon et al., 2002; Braun-Fahrländer et al., 2002; von Mutius et al., 2001; Mackiewicz, 1998). Both methods, however, do not reflect the total microbial diversity. Traditional microbiological techniques based on cultivation are limited in their potential to detect environmental microorganisms, since more than 90% of all microorganisms in nature cannot be isolated with common growth substrates and culture conditions (Amann et al., 1995). The determination of microbial compounds is inappropriate because only sub-populations are represented, such as Gram-negative bacteria in the case of endotoxin, which is only a part of the Gram-negative cell wall (Waser et al., 2004).

In addition to cultivation, molecular methods based on PCR-amplified target gene sequences from directly extracted environmental nucleic acids allow detection and characterization of microorganisms. The most suitable prokaryotic gene to study in this context is the 16S rDNA which encodes for ribosomal RNA, present in all living organisms. Genetic profiling methods, i.e., DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Muyzer et al., 1993) and SSCP (single-strand conformation polymorphism) (Schwieger and Tebbe, 1998; Zumstein et al., 2000) open the possibility to visualise the diversity of such amplified genes from environmental DNA and thereby allow to compare the bacterial diversity from different samples independent of or prior to their characterisation by DNA-sequencing. However, in some instances it has been reported that the reproducibility of those methods may be poor (Hong et al., 2007; Nunan et al., 2005) and validations are thus highly desirable before such tools are applied in health-related studies. Hori et al. (2006) noted higher resolution when comparing SSCP as developed by Schwieger and Tebbe (1998) to DGGE, which was also confirmed in our own laboratory (data not shown). Therefore this study aimed at establishing PCR-SSCP to characterize bacterial communities in farming environmental dusts. Since this method should be applied for large-scale epidemiological studies this study secondly aimed at validating this method concerning to reproducibility and sensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Filed samples

During spring 2006, dust samples of 37 sheds and 63 mattresses from 26 farming families were collected at different locations in Bavaria (Southern Germany). Dust specimens from the sheds were taken from sediments using brushes and bags previously treated with 70% ethanol. The whole area of a mattress was vacuumed for 3 min and dust was collected in nylon socks according to a standard protocol (Schram-Bijkerk et al., 2005).

A total of 2.85 ml phosphate-buffered saline was added to 150 mg of dust and shaken at 350 rpm (GFL 3005, Germany) for 30 min. Larger dust particles were collected by low-speed centrifugation (200 ×g, 30 min). The supernatants were

transferred into 1.5 ml tubes and centrifuged at 10,000 ×g for 10 min to obtain a sediment with bacterial cells which were further subjected to DNA extraction.

2.2. Extraction of bacterial DNA

The DNA extraction was performed according to the protocol of Somerville et al. (2005) with minor modifications. After chloroform-isoamylalcohol (24:1) treatment 600 µl of the aqueous phase (upper phase) was transferred in a 1.5 ml tube, 2 µl glycogen (Invitrogen, Germany) and 600 µl icecold isopropanol (100%) were added to the tube and mixed, followed by a centrifugation in a microcentrifuge (VWR, Germany) at 16,000 ×g for 10 min at room temperature. The pellet was washed in 600 µl of 70% (vol./ vol.) ethanol and centrifuged at 16,000 ×g for 2 min in a microcentrifuge. Ethanol was removed and the resulting genomic DNA pellet was resuspended in 30 µl nuclease-free water.

2.3. Modifications of single-strand conformation polymorphism (SSCP)

PCR-SSCP was used as developed by Schwieger and Tebbe (1998) and described in detail by Dohrmann and Tebbe (2004). The method includes a conversion of the double stranded PCR products into single strand by enzymatic removal of one DNA strand, generated during PCR using a phosphorylated primer. For profiling bacterial communities in farming dusts, some modifications were necessary. PCR was performed in a Trio-Thermoblock (Biometra, Germany) using primers Com1 and Com2-Ph as described before (Schwieger and Tebbe, 1998). However, here we used 1.25 U of Hot Star *Taq* polymerase (QIAGEN, Germany) with corresponding 1xPCR buffer comprising 1.25 mM MgCl₂. The PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) as described by Dohrmann and Tebbe (2004). Afterwards, DNA was quantified with Nanodrop ND-100 spectrometer (Peqlab, Germany), a DNA-solution of 26 µl containing 400 ng DNA was prepared and 14 µl with 5 U lambda exonuclease in 1 × exonuclease buffer (New England Biolabs, Germany) was added. Double-stranded PCR products were digested for 45 min at 37 °C as described by Dohrmann and Tebbe (2004). The digestion was stopped using the MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) and columns were eluted with 10 µl of the supplied buffer; afterwards, 8 µl of SSCP loading buffer was added. The purified DNA-single strands were denatured for 2 min at 95 °C and immediately cooled on ice directly before 10 µl of sample were loaded into each well of a native (non-denaturing), temperature controlled, vertical polyacrylamide gel for SSCP electrophoresis.

In order to find the most suitable electrophoretic conditions for SSCP, single-stranded DNA of 10 phylogenetically different bacteria including *Escherichia coli* DSM 1103, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Clostridium perfringens* DSM 756, *Enterococcus faecalis* DSM 20478, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecium* DSM 10477, *Acinetobacter lwoffii*, *Lactobacillus plantarum* WS

1033, *Lactobacillus acidophilus* WS 1617, respectively, were analysed. The samples were electrophoresed in 30 to 40% MDE-gels, (MDE-solution, Cambrex, Belgium) gel with 1× TBE buffer. They were cast in a PerfectBlue Dual Gel System Twin L (Peqlab, Germany) using 0.4-mm spacers and combs. Based on the DNA concentrations of the PCR products, each lane of an SSCP-gel was loaded with the same amount of total single-stranded DNA to increase comparability of the SSCP profiles on a gel with each other. Electrophoresis was performed for 13 to 18 h at 400 V and 20 °C. The gels were silver stained according to Bassam et al. (1991) and dried at room temperature.

Similarities of SSCP profiles of dust bacterial communities were analysed with the GelCompar II software (version 4.6; Applied Maths, Belgium). Individual SSCP patterns were normalised by using a standard containing a mixture of DNA-single strands of *L. monocytogenes*, *B. licheniformis*, *Mycobacterium vaccae*, *Bacillus subtilis*, *L. plantarum* and *E. faecalis*, respectively.

Similarity matrix calculations were based on Pearson correlation coefficients as they could be calculated with GelCompar II. The clustering method for dendrograms of similar groups was UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

In order to determine their DNA sequence, selected bands from SSCP profiles were carefully cut out from the gels by using a sterile, DNA-free scalpel. The DNA was recovered by the crush and soak procedure as described by Peters et al. (2000), re-amplified by PCR with the primers Com1 and Com2-Ph (Schwieger and Tebbe, 1998), purified using the NucleoSpinExtract-Kit (Macherey-Nagel, Germany), ligated into the pGEM-T-vector system (Promega, Germany) and transformed in *E. coli* JM 109 (Promega, Germany) according to a protocol provided by the manufacturer. Clones were cultivated overnight in Luria-Bertania (LB) broth containing ampicillin (final concentration 100 mg l⁻¹). Transformed cells were selected by blue-white screening. The plasmids were extracted with the NucleoSpinPlasmid-Kit (Macherey-Nagel, Germany) and sequenced by cycle sequencing, using the ABI 373048 capillary sequencer with 50 cm capillary length and the Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Germany). The primer for sequencing was M13-21 (5'-3') TGTAACGACGGCCAGT (TIB Molbiol, Germany). The DNA sequences were analysed for their closest relatives using the Ribosomal Database Project II (http://www.rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) for phylogenetic analysis.

2.4. Validation of the PCR-SSCP-procedure for dust analysis

To determine the sensitivity of detection, twenty-one dust specimens of 150 mg each were gamma irradiated (26 kGy for 22 h) in order to degrade the DNA naturally occurring in dust. Seven dilutions of suspensions of *L. monocytogenes* (Gram-positive), of *B. licheniformis* (spore forming bacterium) and *E. coli* (Gram-negative) in phosphate-buffered saline ranging from 10⁸ to 10² cfu ml⁻¹ were prepared, and 10 µl of each dilution was added to the 150 mg mattress dust specimens. The

spore content of the *B. licheniformis*-suspension was determined by quantitative microscopic examination where 30% spores were found.

To validate the reproducibility of the PCR-SSCP technique, a mattress dust, a cow-shed dust, a swine-shed dust, a horse-shed dust and a chicken-shed dust, respectively, were well homogenised, and the DNA of each sample was fivefold extracted and processed for PCR-SSCP. To analyse the day to day variation, DNA of one mattress dust was fivefold extracted every day over a period of 5 days and PCR-SSCP was performed. Gel to gel variation was studied by loading single-stranded DNA of one mattress on 5 SSCP-gels at the same concentration (400 ng) to compare the SSCP profiles among the gels. All similarity profiles were calculated as Pearson correlation coefficients (%) using the GelCompare II software.

2.5. Application

To demonstrate the suitability of PCR-SSCP to characterise different microbial exposures of humans in more detail, dust samples of cow-sheds (*n*:24), swine-sheds (*n*:10), chicken-sheds (*n*:2) and horse-sheds (*n*:1) as well as of children's mattresses (*n*:63) of 26 farms were analysed. Densitometric curve analyses using the GelCompare II software was used to analyse similarities of the SSCP profiles. Conspicuous bands were excised from the gel, cloned and sequenced as described above.

3. Results and discussion

3.1. Adaptation of SSCP-electrophoresis conditions

In general, resolution for discriminating different PCR products with SSCP was best at 16 h running time and 31.7%

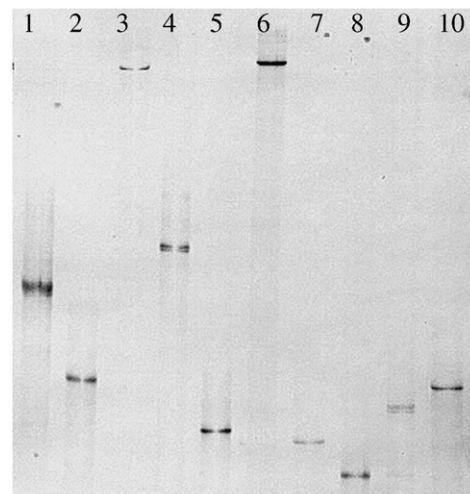


Fig. 1. SSCP profiles obtained from different bacterial species after PCR amplification a partial region of the DNA encoding the 16S rRNA gene. The following species were analysed: *Escherichia coli* DSM 1103 (lane 1), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (lane 2), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (lane 3), *Clostridium perfringens* DSM 756 (lane 4), *Enterococcus faecalis* DSM 20478 (lane 5), *Bacillus licheniformis* (lane 6), *Enterococcus faecium* DSM 10477 (lane 7), *Acinetobacter lwoffii* (lane 8), *Lactobacillus plantarum* WS 1033 (lane 9), *Lactobacillus acidophilus* WS 1617 (lane 10).

MDE concentration (data not shown). Using these conditions, PCR products of 10 phylogenetically different bacteria (phylotypes) expected in farm environments led to single- or double bands in different positions (Fig. 1). The majority of PCR products in our investigation amplified from the pure cultures were found to be single-bands. These products were different in electrophoretic mobility, most probably due to sequence differences causing different conformations under non-denaturing conditions (Dohrmann and Tebbe, 2004). However, single sequences can also cause double bands due to conformational isomers. Other double bands may have resulted from the presence of more than one operon with intra-operon sequence variations even within one phylotype (Schmalenberger et al., 2001).

3.2. Validation of the PCR-SSCP-procedure for dust analysis

Validations of the SSCP method were regarded as indispensable before applying the technique in field studies on health-related topics. Reproducibility of gel-based genetic profiling techniques, i.e., DGGE or SSCP has previously been questioned (Hong et al., 2007; Nunan et al., 2005), but actual validations are still missing. Therefore, the present study tested both sensitivity and reproducibility of SSCP-profiling of partial 16S rRNA gene sequences.

The detection limit for the Gram-negative bacterium *E. coli* was 70 cfu g⁻¹, whereas a total of 700 cfu g⁻¹ dust was necessary for the detection of *B. licheniformis* containing 30%

spores and the Gram-positive bacterium *L. monocytogenes*, respectively. Compared to Gram-negative bacteria, the substantially higher detection limit for Gram-positive bacteria was possibly caused by an incomplete cell lysis because of the more resistant Gram-positive cell wall (Von Wintzingerode et al., 1997). Consequently, DNA of Gram-positive bacteria may be underrepresented in genetic profiles. On the other hand more rigorous cell lysis conditions may cause highly fragmented nucleic acids from Gram-negative cells (Von Wintzingerode et al., 1997) and thus would also induce bias. The sensitivity of the detection of spore forming bacteria might be influenced by their structure. It is obvious that bacterial spores are more difficult to lyse than vegetative cells as spores possess an extremely resistant outer cortex which may hamper release of DNA (Popham and Setlow, 1993; Von Wintzingerode et al., 1997).

Still this method provides advantages over conventional culturing, as it can detect non cultivable bacteria. Conventional culturing definitively does not reflect the whole range of microbial diversity (Wagner et al., 1993). Furthermore, the SSCP method in this study was as sensitive as the culturing method without a prior enrichment procedure (data not shown). This is an important advantage, since, e.g., mattress dust usually is limited to about 150 mg per mattress.

A fivefold repeated analyses of a well homogenised cow-, swine-, chicken- and horse-shed dust sample, respectively, showed highly similar profiles for each replicate (Fig. 2). The average similarity calculated as Pearson correlation coefficients

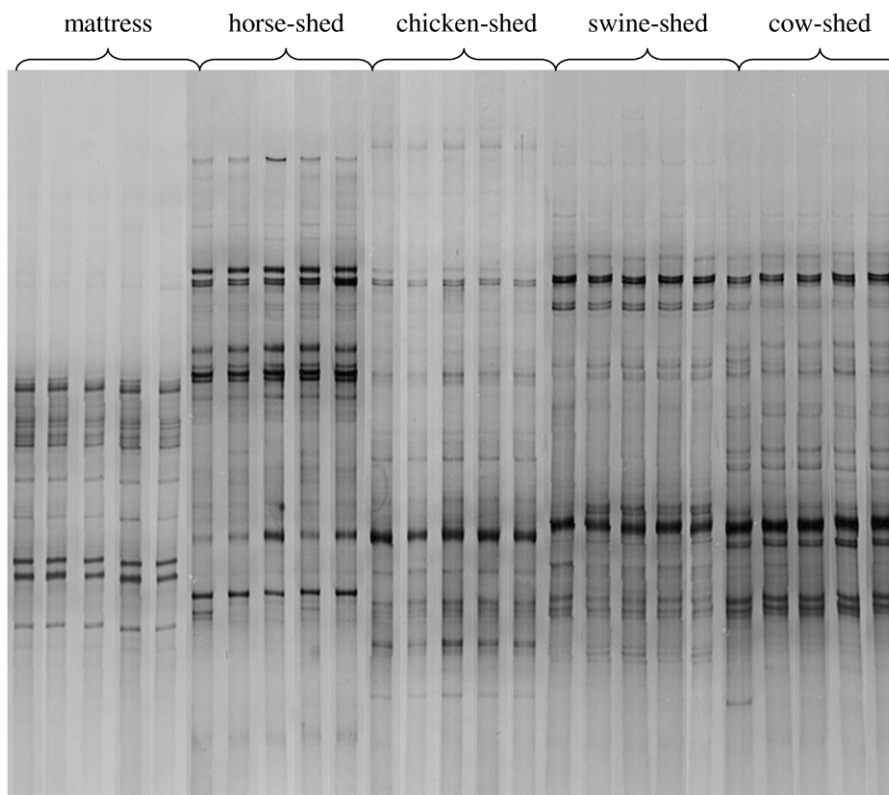


Fig. 2. SSCP profiles from one mattress dust, one horse-shed-, one chicken-shed-, one swine-shed- and one cow-shed-dust. DNA of all dusts were extracted in quintuples and processed for PCR-SSCP.

Table 1

Similarities of SSCP profiles from one mattress dust, one horse-shed dust, one chicken-shed dust, one swine-shed dust and one cow-shed dust calculated as Pearson correlation coefficients (%)

Dust types	Similarity (%)
Mattress dust	95.2 (SD=2.6)
Horse-shed dust	92.9 (SD=4.9)
Chicken-shed dust	89.7 (SD=6.2)
Swine-shed dust	92.9 (SD=3.0)
Cow-shed dust	90.4 (SD=6.2)

DNA of all dusts were extracted in quintuples and processed for PCR-SSCP. Each sample of one dust type was compared with the other samples of the same dust type. Data are shown as average similarities for each dust type.

was above 89% when comparing the five replicate samples from the same dust type with each other (Table 1). Similar high reproducibility values were obtained when one mattress dust was processed for DNA extraction and SSCP analyses over a five day period and profiles of each day were compared, showing 87.2% similarity on average (Table 2). Comparing one mattress dust SSCP-profile on five different gels, the reproducibility was slightly lower but again close to 90% on average (Table 3).

Several studies revealed that the limitation of PCR-based methods is mostly related to inefficient lysis of the bacterial cells and incomplete DNA release (Farrelly et al., 1995; Suzuki and Giovannoni, 1996). Dust is an inhomogenic substrate containing various biotic and abiotic components. Inorganic particles or organic matter affect lysis efficiency and may interfere with subsequent DNA purification and enzymatic steps (Von Wintzingerode et al., 1997). In this study the similarity between the experiments was consistently around 90%. In other words inter-experiment variation was about 10% which is a moderate limit. This low variability makes SSCP an ideal tool to compare larger numbers of samples for environmental exposure studies. But it has to be considered that these reproducibility results are shown for a special dust matrix which does not mean that the same bacterial flora might be fully detected in another dust matrix. To get further evidence for the reproducibility of the present method, additional experiments will be necessary. A possible experiment should e.g. be using the bacterial flora of mattress dust spiked on DNA-free dusts of a cow-shed, swine-shed, chicken-shed and horse-shed to study whether all species of the mattress dust flora are detectable in the other dust matrices as well or if some of the species get lost by matrix effects.

Table 2

Similarities of SSCP profiles of one mattress dust processed by DNA extraction and SSCP analysis on five different days

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Day 1	100				
Day 2	78.7	100			
Day 3	92.2	89.7	100		
Day 4	92.0	88.0	93.2	100	
Day 5	86.3	81.2	86.5	84.6	100

Data are shown as Pearson correlation coefficients (%).

Table 3

Similarities of SSCP profiles from DNA of one mattress dust processed for SSCP analysis and loaded on five different gels

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5
Gel 1	100				
Gel 2	84.5	100			
Gel 3	91.7	95.8	100		
Gel 4	80.6	75.2	92.3	100	
Gel 5	87.3	90.2	92.1	73.2	100

Data are shown as Pearson correlation coefficients (%).

3.3. Application

To demonstrate different microbial exposures on a farm, dust samples of cow-sheds ($n=24$), swine-sheds ($n=10$), chicken-sheds ($n=2$), horse-sheds ($n=1$) and children's mattresses ($n=63$) of 26 farms were analysed by PCR-SSCP. Settled dust was used since previous studies revealed that it can pass into the airborne dust fraction when activities inside the stables occur: Schierl et al. (2007) found that the endotoxin concentrations in settled dust followed the same pattern of median endotoxin concentrations, and minimal and maximal values as the inhalable endotoxin fraction in airborne dust for all animal species. According to Makino and Cheun (2003) microorganisms are dispersed in the air in small droplets comparable to aerosol, spore or dust, but most of them are sediment within short time. In the context of large-scale epidemiological bacterial exposure studies, settled dust can be sampled more easily, without elaborate technical equipment and in a more cost-effective way than dispersed dust. With respect to bacterial compositions, airborne dust samples of animal sheds show substantially higher variations over time than samples of settled dust (Schierl et al., 2007). Furthermore most previous epidemiological studies were performed on settled dust, rendering SSCP analyses of settled dust sample more comparable.

Fig. 3 representatively demonstrates 2 of the 26 farms where bands related to specific environments can be discerned. As already demonstrated in Fig. 2, distinct farm environment dusts reflected different SSCP profiles which consisted of 15 to 20 distinguishable bands for each sample, indicating the high potential of this technique to detect different bacteria from environmental dust. Exposure patterns of dust are affected by animal species, housing conditions, feeding management, seasonal climate conditions and diurnal activities (Schierl et al., 2007). In animal houses the main major contributors to bacterial contaminated organic dusts are animal faeces and bacteria-contaminated plant materials (Radon et al., 2002). Examples are silage, cattle and pig manure slurry which all contain a highly diverse bacterial population (Pahlow et al., 2003; Hobson and Stewart, 1997; Snell-Castro et al., 2005). Profiles of farm child's mattress dusts can probably be affected by the human skin containing a high distinct bacterial flora (Dekio et al., 2005), the child's personal cleanliness (Waser et al., 2004), or by children allowing their pets to stay in bed (Waser et al., 2004). Furthermore the outdoor environment might influence the bacterial community in children's mattress

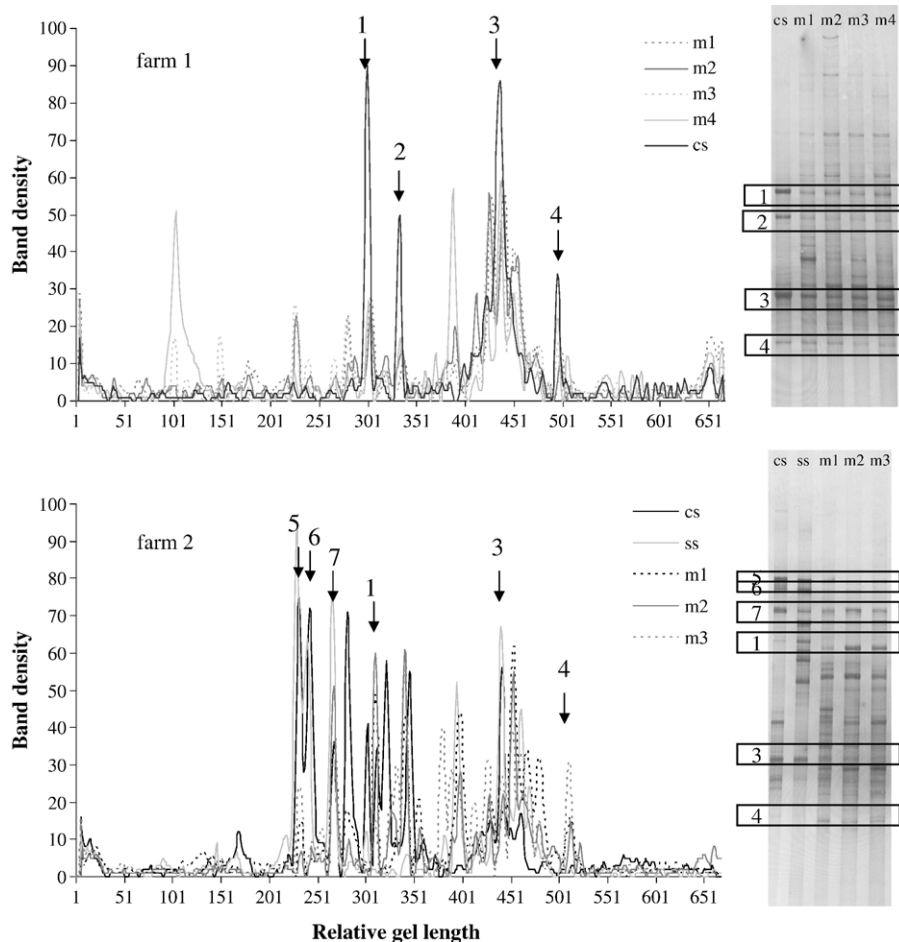


Fig. 3. Representative densitometric curve analysis (a) and SSCP-gel (b) from environmental dusts of 2 farms. Cs=cow-shed, ss=swine-shed, m=mattress. 1=*Corynebacterium tuberculostearicum*, 2=*Corynebacterium mucifaciens*, 3=*Staphylococcus epidermidis*, 4=*Acinetobacter lwoffii*, 5=*Brevibacterium iodinum*, 6=*Brevibacterium linens*, 7=*Arthrobacter* spp.

dust by helping with harvesting, staying in barns and by playing in the sheds. Children might probably carry dust loaded with bacteria on clothes and with their hair into the indoor environment (Waser et al., 2004). A possible transfer of bacteria is shown in Fig. 3, where specific bands present conspicuous in animal shed dust were also found visible in mattresses at the same position in the gel. This finding is in line with Waser et al. (2004) who found a dose-dependent association between the child's activity on the farm and indoor home endotoxin levels. It is likely that children carry dust loaded with bacteria with their hair, clothes and skin from the sheds to the indoor environment.

Using PCR-SSCP, cloning and sequencing of the bands occurring at the same position opens the possibility to identify the bacterial species, which might be transferred from the sheds to the home environment—in this case mattress dust. By excision, cloning, sequencing and phylogenetic analyses of the bands, bacteria from sheds and mattresses were identified as *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Corynebacterium mucifaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *A. lwoffii*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium linens* and *Arthrobacter* spp. (Fig. 3). *A. lwoffii* isolated from cow-sheds was already shown to have an asthma preventive potential in a mouse model (Debarry et al., 2007). However, not all of these species were

detected on all farms but the occurrence of bands having the same position in the sheds as well as in the mattresses was observed for each farm. This finding opens the possibility to use PCR-SSCP performed for mattress dust samples in large-scale epidemiological studies on bacterial exposure of farm children. Additionally mattress dust samples can be taken from the control groups like non-farming children as well.

4. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates the applicability of PCR-SSCP for assessing the diversity of bacteria found in dust samples from farm environments. By selection of specific SSCP-bands, cloning and sequencing the method allows the assignment of bacteria to closest relatives, as they can be found in public databases like the Ribosomal Database Project, Genbank or the EMBL database. PCR-SSCP therefore opens new possibilities to explore the bacterial exposure of farmers and their children much more precise than the hitherto applied methods. In combination with real-time PCR targeting the species of interest, the method may become even more powerful in the future. The health-related effect of the farm specific bacteria on asthma and allergies could be tested in *in vivo*

exposure experiments. Since a recent study (Schram-Bijkerk et al., 2005) revealed that mould components might offer some protection against atopic wheeze in children, the application of PCR-SSCP to fungi and their spores in dust might be interesting for future studies as well.

Acknowledgements

This work was supported by “Sonderforschungsbereich Transregio 22“ from the Deutsche Forschungsgesellschaft. We gratefully thank Ms. Barbara Dörr and Ms. Cornelia Oehme from Technische Universität München for excellent technical assistance. Furthermore we thank Dr. Anja Dohrmann from FAL for giving hints to the SSCP-technique.

References

- Albrecht, A., Redmann, T., Nuchter, H., Bonner, B.M., Kaleta, E., Kampfer, P., 2003. Airborne microorganisms in a rearing henhouse for layers during vaccination. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 110, 487–493.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80–83.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R.P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., von Mutius, E., 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347, 869–877.
- Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H., 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1514–1521.
- Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahora, M., Nishikawa, T., Suematsu, M., Benno, Y., 2005. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *J. Med. Microbiol.* 54, 1231–1238.
- Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: Kowalschuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 809–838.
- Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and rrm gene copy number on PCR amplification of 16S ribosomal RNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2798–2801.
- Hobson, P.N., Stewart, C.S., 1997. *The rumen microbial ecosystem*. 2nd ed. Chapman & Hall, London.
- Hong, H., Pruden, A., Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Methods* 69, 52–64.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods* 66, 165–169.
- Lee, S.-A., Adhikari, A., Grinshpun, S.A., McKay, R., Shukla, R., Reponen, T., 2006. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 118–130.
- Leynaert, B., Guilleud-Bataille, M., Soussan, D., Benessiano, J., Guenegou, A., Pin, I., Neukirch, F., 2006. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 658–665.
- Linacker, C., Smedley, J., 2002. Respiratory illness in agricultural workers. *Occup. Med. (Lond.)* 52, 451–459.
- Mackiewicz, B., 1998. Study on exposure of pig farm workers to bioaerosols, immunologic reactivity and health effects. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5, 169–175.
- Makino, S., Cheun, H., 2003. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J. Microbiol. Methods* 53, 141–147.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W., Prosser, J.I., 2005. Links between plant and rhizosphere bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6784–6792.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling. In: Buxton, D.R. (Ed.), *Silage science and technology*, Agronomy monograph no 42, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, pp. 31–93.
- Peters, S., Koschinsky, F., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 930–936.
- Popham, D.L., Setlow, P., 1993. The cortical peptidoglycan from spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* is not highly cross-linked. *J. Bacteriol.* 175, 2767–2769.
- Radon, K., 2006. The two sides of the “endotoxin coin”. *Occup. Environ. Med.* 63, 73–78.
- Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Monso, E., Weber, C., Hartung, J., Donham, K., Palmgren, U., Nowak, D., 2002. Air containments in different European farming environments. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9, 41–48.
- Radon, K., Peters, A., Praml, G., Ehrenstein, V., Schulze, A., Hehl, O., Nowak, D., 2004. Livestock odours and quality of life of neighbouring residents. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11, 59–62.
- Radon, K., Schulze, A., Nowak, D., 2006. Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood: protection, under-reporting or selection? *Allergy* 61, 443–446.
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., ALEX Study Team, 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129–1133.
- Schierl, R., Heise, A., Egger, U., Schneider, F., Eichler, R., Nesser, S., Nowak, D., 2007. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern bavaria. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14, 129–136.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3557–3563.
- Schram-Bijkerk, D., Doekes, G., Douwes, J., Boeve, M., Riedler, J., Ublagger, E., von Mutius, E., Benz, M.R., Pesshagen, G., von Hage, M., Scheynius, A., Braun-Fahrlander, C., Waser, M., Brunekreef, B., 2005. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1272–1278.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4870–4876.
- Singh, J., Schwartz, D.A., 2005. Endotoxin and the lung: insight into the host-environment interaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 330–333.
- Snell-Castro, R., Godon, J.J., Delgenès, J.P., Dabert, P., 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 229–242.
- Somerville, W., Thibert, L., Schwartzman, K., Behr, M.A., 2005. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2996–2997.
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630.
- Van Strien, R.T., Engel, E., Holst, O., Bufe, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., von Mutius, E., ALEX Study team,

2004. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of *N*-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 860–867.
- von Mutius, E., Braun-Fahrlander, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlemanns, S., Maisch, S., Waser, M., Nowak, D., 2001. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* 30, 1230–1234.
- Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleiffer, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520–1525.
- Waser, M., Schierl, R., von Mutius, E., Maisch, S., Carr, D., Riedler, J., Eder, W., Schreuer, M., Nowak, D., Braun-Fahrlander, C., 2004. Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. *Clin. Exp. Allergy* 34, 389–397.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism. *Environ. Microbiol.* 2, 69–78.

9 Danksagung

Ich danke...

...meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer für die exzellente Betreuung, für das Vertrauen, eine innovative Methode etablieren zu dürfen, für die Möglichkeit der Neugestaltung der Labore, für die Übertragung der Leitung eines kleinen Teams und für die Förderung der wissenschaftlichen Karriere.

...Prof. Dr. Erika von Mutius für die äußerst spannende Thematik, für die zahlreichen, beratenden Meetings und für das Vertrauen, das Thema anders als beantragt bearbeiten zu dürfen. Ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit.

...Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Übernahme des Koreferates, für die frühe Förderung meines Interesses an Mikrobiologie, für die äußerst freundliche Aufnahme und lehrreiche Zeit als Hiwi und für den Erhalt des Oskar-Karl-Forster Stipendiums.

...Prof. Dr. Heinrich Meyer für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen und Herrn PD Dr. Michael Pfaffl für die Erlaubnis im S1 Labor der Physiologie tätig sein zu dürfen.

...Dr. Markus Ege für viele, viele kooperative Gespräche, hilfreichen Ideen, Korrekturen von Manuskripten und für die statistische Auswertung der SSCP-Gele.

...dem SFB/TR 22 der DFG für die Finanzierung des Projektes.

...MSc Kay Vogel vom Forschungszentrum Borstel für die tolle Kooperation im SFB.

...PD Dr. Monika Ehling-Schulz für beratende Gespräche.

...Prof. Dr. Christoph Tebbe, Dr. Anja Dohrmann und Dominik Neumann für die freundliche Aufnahme am FAL und die Einführung in die SSCP-Technik.

...Prof. Dr. Jean-Charles Munch und Dr. Alexandra Hagn für die Einführung in die DGGE-Technik.

...allen Mitarbeiter und Mitdoktoranden des Instituts für das nette Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit. Besonders herzlich danke ich Barbara Dörr für die exzellente, unermüdliche Hilfe und Organisation im Labor und Conny Oehme für das Erstellen vieler, vieler SSCP-Gele. Christoph Gottschalk danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen.

...unserer Sekretärin, Frau Margret Laubmeier für ihre hilfsbereite Art bei organisatorischen Problemen insbesondere was Reisekosten betraf.

...Herrn Stöwer vom Radiochemischen Institut der TUM für die Bestrahlung von Stäuben.

...Dr. Jörg Meyer von der Universität Duisburg-Essen für das Design von Spacern und Kämmen für die SSCP-Kammern.

...all meinen Freunden insbesondere Astrid Bauer, Christoph Bauer, Dr. Susanne Mayringer, Dr. Bettina Schiffer, Gaby Forster, Dr. Katja Patzner, Dr. Juliana Macuhova und Bettina Rößler für die Geduld beim Zuhören und die aufmunternden Worte.

...Prof. Dr.-Ing. Georg Mayer und Margherita Mayer für die Motivation an meinen Zielen festzuhalten und für die liebevolle Aufnahme in die Familie.

...Jan-Peter Mayer für viele Ratschläge, für die liebevolle Unterstützung, für die Aufmunterungen und für die wundervollen gemeinsamen Jahre.

Zu guter Letzt danke ich meinen lieben Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen, für das Ermöglichen der langjährigen Ausbildung nach meinen Wünschen und für den Rückhalt, den sie mir geben.

10 Curriculum Vitae

PERSONAL DETAILS

Address: Heckenstallerstr. 16
85354 Freising, Germany
Date of Birth: 19th December 1977
Place of Birth: Kleve, Germany
Nationality: German

EDUCATION

08/1988 – 06/1997 Städtisches Gymnasium Kalkar
08/1984 – 06/1988 Josef Lörcks Grundschule Kalkar

UNIVERSITY EDUCATION

Since 07/2005 PhD Student at the Chair of Animal Hygiene, Technische Universität München
10/2000 – 04/2005 Ökotrophologie (nutrition and food science) student, Technische Universität München

EMPLOYMENT AND TRAINING

08/2003 – 04/2004 Unilever R&D Vlaardingen, the Netherlands
03/2003– 07/2003 Institute of Animal Hygiene, Technische Universität München
11/2001 – 10/2002 Institut for Microbiology, Technische Universität München
02/2001 Subject group for microbiological biotechnology, Technische Universität München
02/2000 – 10/2000 Chair of Biological Chemistry, Technische Universität München
09/1999 – 01/2000 Milupa GmbH
08/1997 – 06/1999 Training as Biological Technical Assistant, Rheinische Akademie e.V. Köln

PUBLICATIONS

Korthals M, Ege MJ, Lick S, von Mutius E, Bauer J, 2008. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in mattress dust of farm children in Bavaria. *Env Res* 107, 299-304.

Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E, Bauer J, 2008. Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the microbial exposure of children. *J Microbiol Meth* 73, 49-56.

Vogel K[#], Blümer N[#], **Korthals M**[#], Mittelstädt J., Garn H, Ege, M, von Mutius Gatermann S, Bufe A, Goldmann D, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Heine H, Holst O, 2008. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 122, 307-312.

[#]contributed equally

POSTER AND PRESENTATIONS

Korthals M, Ege M, von Mutius E, Bauer J. PCR-SSCP: a new approach to identify potentially allergy-protective microorganism in dust. Symposium SFB/TR22 Castle of Rauschholzhausen, Germany, 24th – 27th October 2007, Poster 1.

Vogel K, Blümer N, **Korthals M**, Mittelstädt J., Garn H, Ege, M, von Mutius Gatermann S, Bufe A, Goldmann D, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Heine H, Holst O. Allergy protective properties of *Bacillus licheniformis* spores from farming environments. Symposium SFB/TR22 Castle of Rauschholzhausen, Germany, 24th – 27th October 2007, Poster 2.

Ege M, **Korthals M**, Bauer J, von Mutius E. Specific mattress dust PCR-SSCP bands are inversely associated with asthma and atopic sensitization in school-age children. Symposium SFB/TR22 Castle of Rauschholzhausen, Germany, 24th – 27th October 2007, Poster 3.

Korthals M, Ege M, von Mutius E, Bauer J. PCR-SSCP: a suitable method to determine microbial communities in environmental dust. BAGECO 9, Wernigerode, Germany, 23th – 27th June 2007, Poster 215.

Korthals M, Ege M, von Mutius E, Bauer J. Comparison of the microbial community in mattress- and shed dust using PCR-SSCP. 2nd Swiss Microbial Ecology Meeting, Belinzona, Switzerland, 28th – 30th September 2006, Poster P-NAE12.

Korthals M. Differentiation of the microbial exposure of farm children using PCR-SSCP. SFB TR 22 Meeting, Tutzing, Germany, 19th – 21st September 2006.

Korthals M. Untersuchungen zur mikrobiellen Umweltexposition von Kindern im bäuerlichen Milieu. Colloquium, FAL, Germany, 5th May 2006.

Korthals M. Protektive Faktoren aus der mikrobiellen Umweltexposition im bäuerlichen Milieu. SFB TR Meeting, Borstel, Germany, 16th – 17th December 2005.

