

Vergleich von Kulturverfahren und molekularbiologischen Verfahren für die Trinkwasserüberwachung

27. Wasserhygienetage Bad Elster, 07.02.2019

Dr. Beate Hambsch, Dr. Michael Hügler

TZW

ÜBERSICHT

- 1 Trinkwasserüberwachung**
Anforderungen und gesetzliche Regelungen
- 2 Mikrobiologische Verfahren**
Kultur und Molekularbiologie
- 3 Forschungsergebnisse**
Einsatz molekularbiologischer Verfahren in WVU
- 4 Identifizierung**
Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren
- 5 Zusammenfassung**

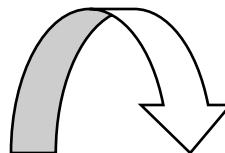
TRINKWASSERÜBERWACHUNG

Zielsetzung bei der Trinkwasserversorgung

Versorgung aller Abnehmer
mit seuchenhygienisch
einwandfreiem Wasser

=

Vermeidung
trinkwasserbedingter
Erkrankungen



Prävention:
breite Anzeigenbasis
für potentielle Anwesenheit
von Krankheitserregern

Fäkalindikatorprinzip

sensitive Anzeige fäkalen
Verunreinigungen, als
potentielle Anwesenheit
fäkalen Krankheitserreger,
mittlerweile gesetzlich
festgelegtes hygienisch-
mikrobiologisches
Kontrollsystem, weltweit.

TRINKWASSERÜBERWACHUNG

TrinkwV § 4 Allgemeine Anforderungen

- (1) Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass
- Schädigung der menschlichen Gesundheit nicht zu besorgen
 - genussstauglich
 - rein

Anforderung gilt als erfüllt, wenn Einhaltung

- bei Wassergewinnung, -aufbereitung und –verteilung
mindestens allgemein anerkannte Regeln der Technik
- Anforderungen §§ 5, 6, 7 und 7a dieser Verordnung

TRINKWASSERÜBERWACHUNG

TrinkwV § 5 Mikrobiologische Anforderungen

- (1) Krankheitserreger nicht in Konzentrationen, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen
- (2) Grenzwerte in Anlage 1 Teil I (mikrobiologische Parameter) dürfen nicht überschritten werden
(*E. coli*, Enterokokken 0 /100mL)
- (4) Konzentrationen von Mikroorganismen, die das Trinkwasser verunreinigen ..., sind zu minimieren.
- (5) - Mikrobielle Belastungen des Rohwassers, die zu einer übertragbaren Krankheit führen können ⇒ Aufbereitung evtl. einschl. Desinfektion, nach allgemein anerkannten Regeln der Technik
- In Leitungsnetzen, sofern 1 und 2 nur durch Desinfektion einzuhalten, Vorhaltung einer hinreichenden Desinfektionskapazität

MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

Klassische Kulturverfahren

- empfindlich
(1 Bakt. / 100 mL, 0,5 ÷ 4 pg (10^{-12} g) C/L)
- robust
- standardisiert
- quantifizierbar
- nur lebende Zellen werden erfasst

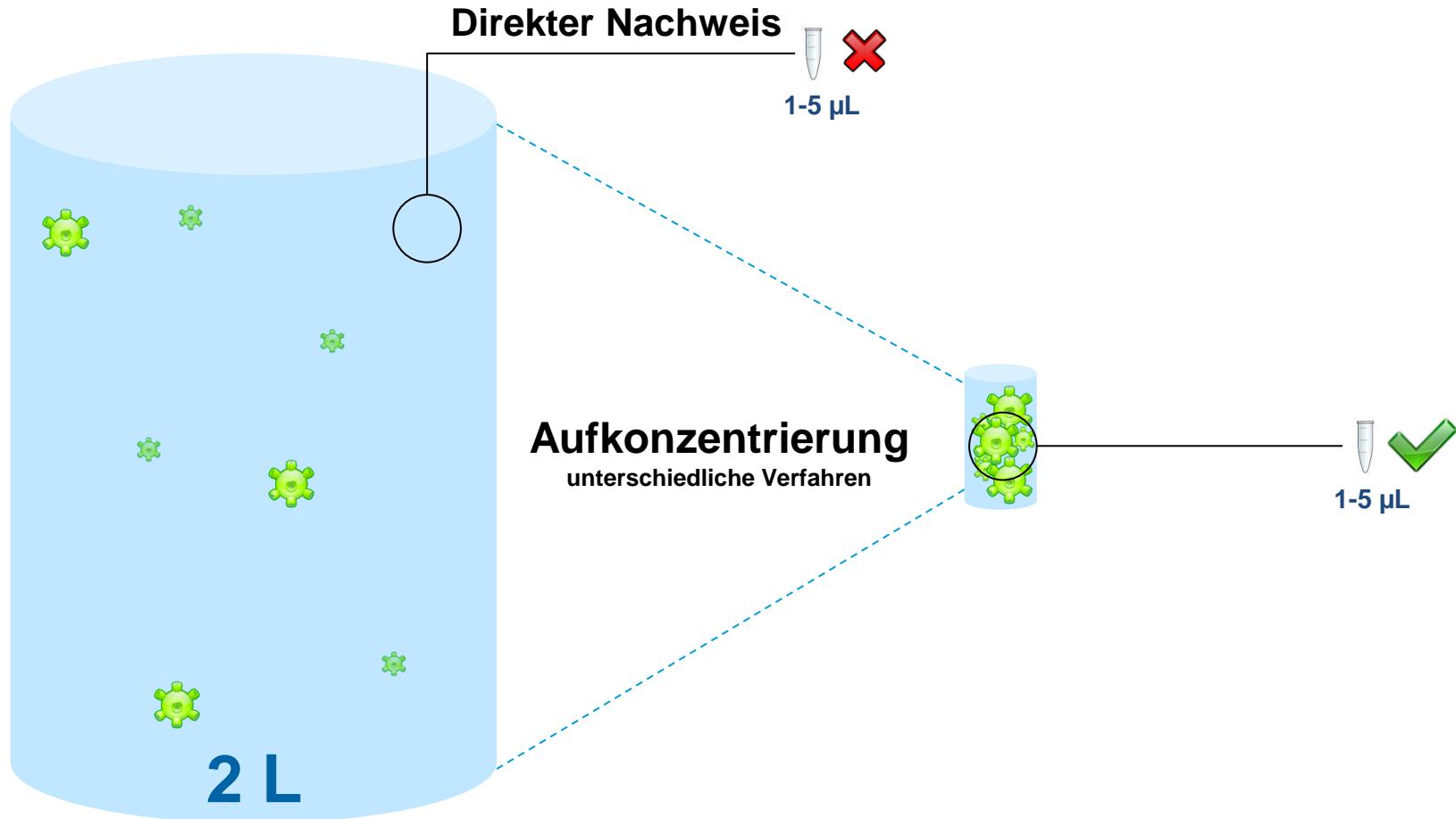
aber

- Zeitbedarf der Inkubation
 - E. coli* / coliforme Bakterien 1d
 - Clostridium perfringens* 1d
 - Enterokokken 2d
 - Pseudomonas aeruginosa* 2-5d
 - Legionella* spp. 10d

Molekularbiologische Verfahren

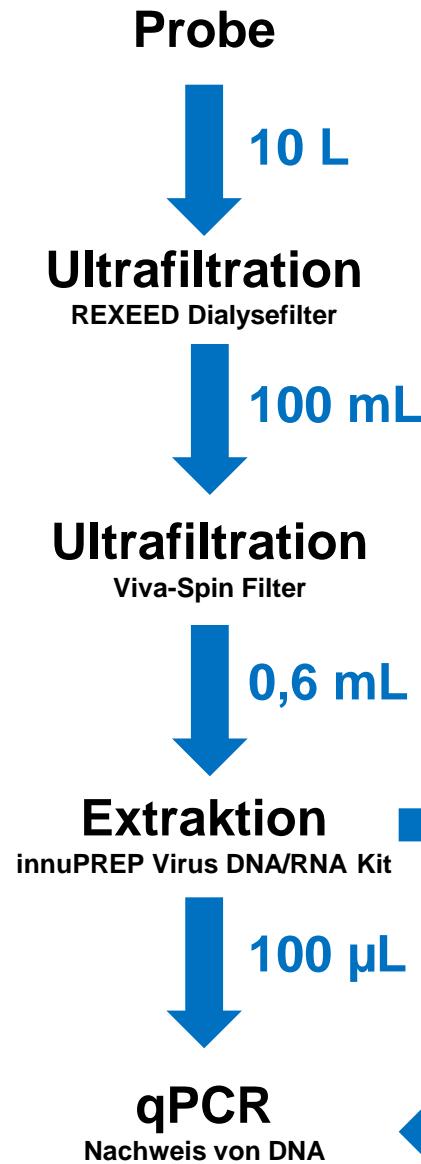
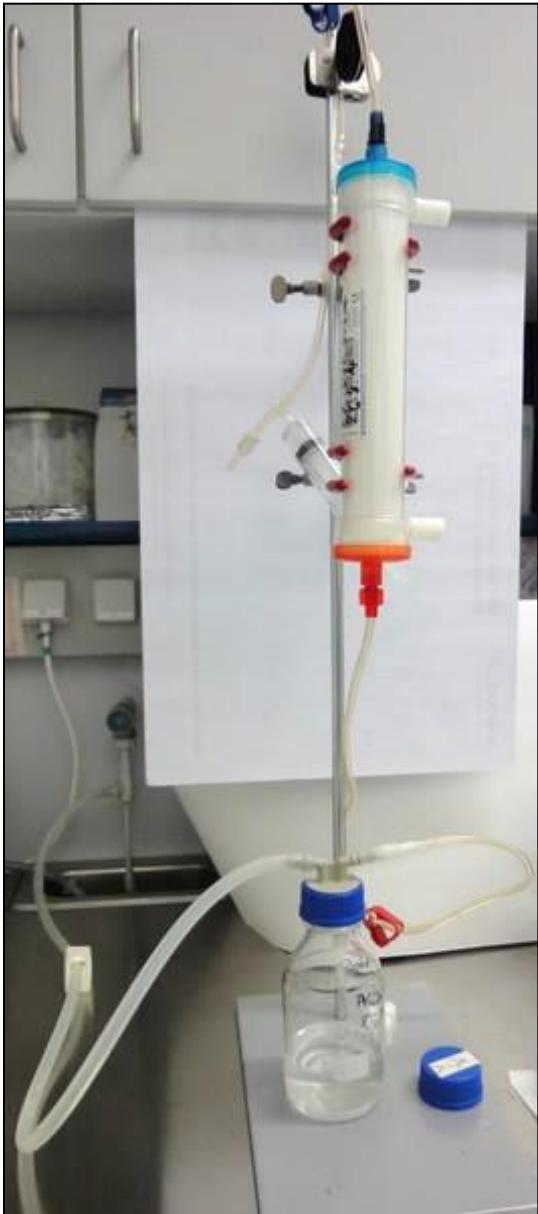
- Keine Kultivierung erforderlich
- PCR (qualitativ und quantitativ)
- FISH (qualitativ und quantitativ)
- MALDI-TOF MS (qualitativ)
 - + geringer Zeitbedarf
 - + hohe Spezifität
 - + Erfassung nicht kultivierbarer Mikroorganismen (PCR, FISH)
- Voranreicherung erforderlich
- Unterscheidung tot/lebend durch zusätzliche Schritte (PCR)

MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN



qPCR: Problem der Nachweisgrenze (Sensitivität)

MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN



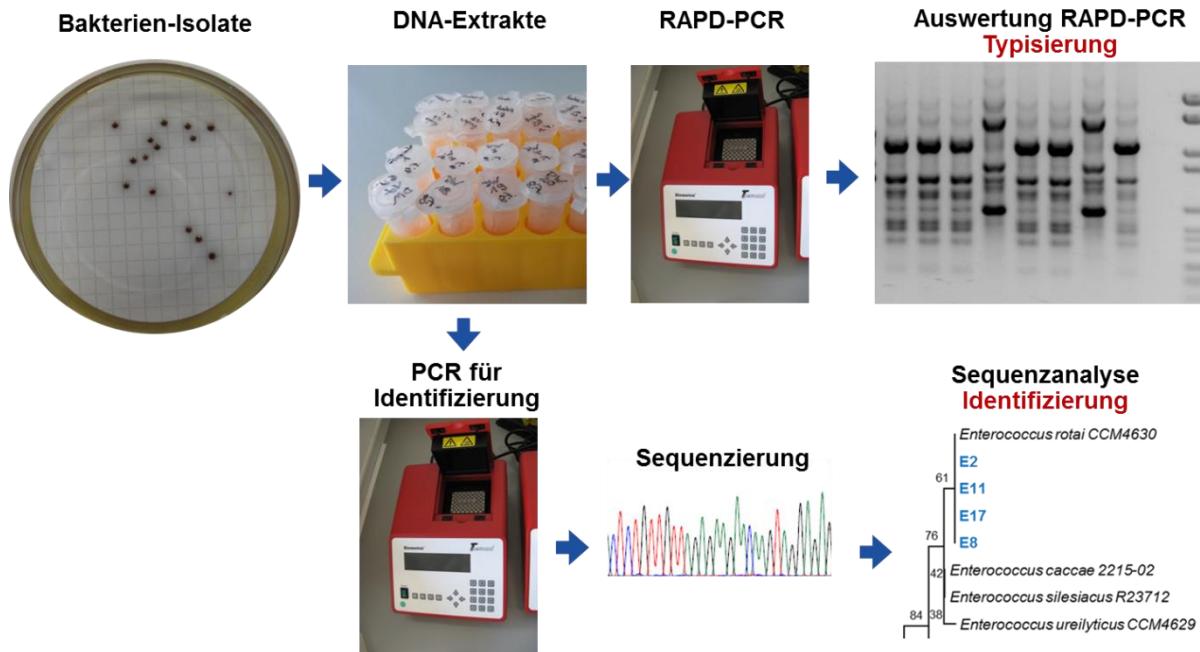
qPCR: Problem der Nachweisgrenze

Reverse Transkription
Bei RNA-Viren: RNA \rightarrow DNA

MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

Molekularbiologische Methoden

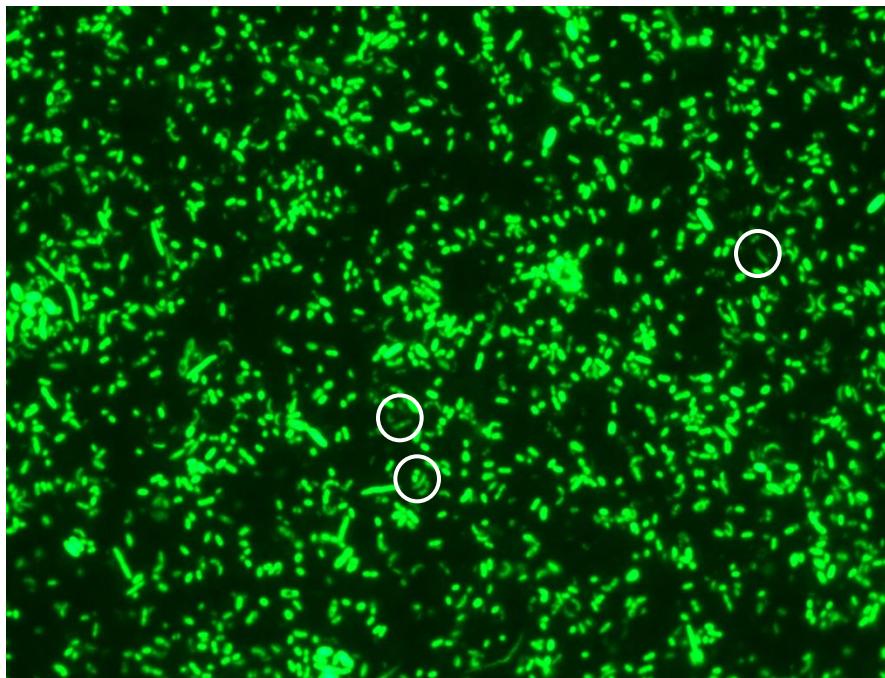
- PCR-basierte Methoden
 - Quantifizierung (qPCR)
 - Identifizierung und Typisierung von Bakterien
 - (Bakterielle Gemeinschaftsanalyse)



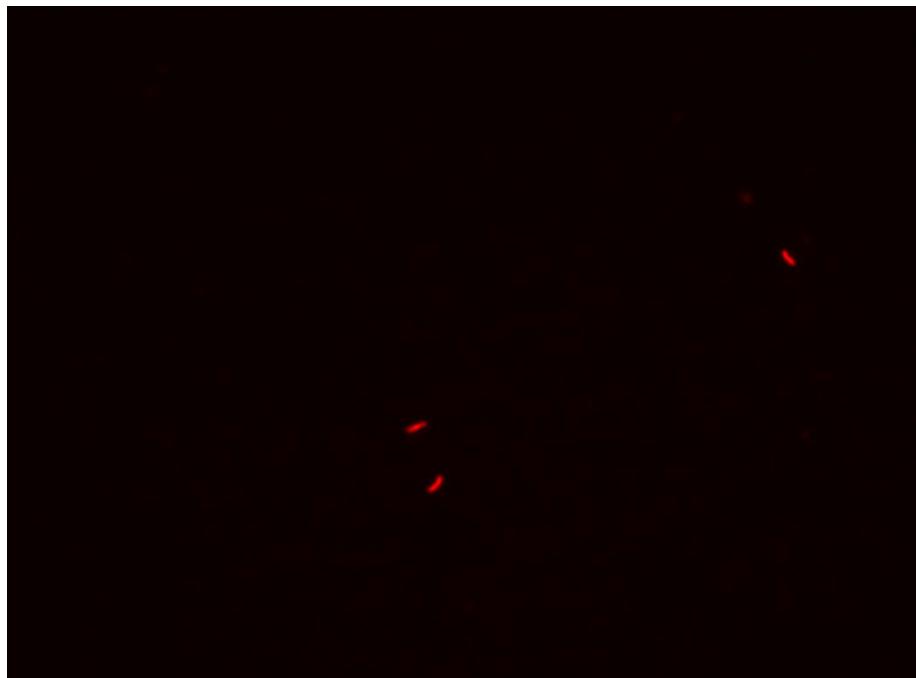
MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

Molekularbiologische Methoden

- FISH: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
 - Nachweis und Quantifizierung



Sonde EUB (*Eubacteria*)

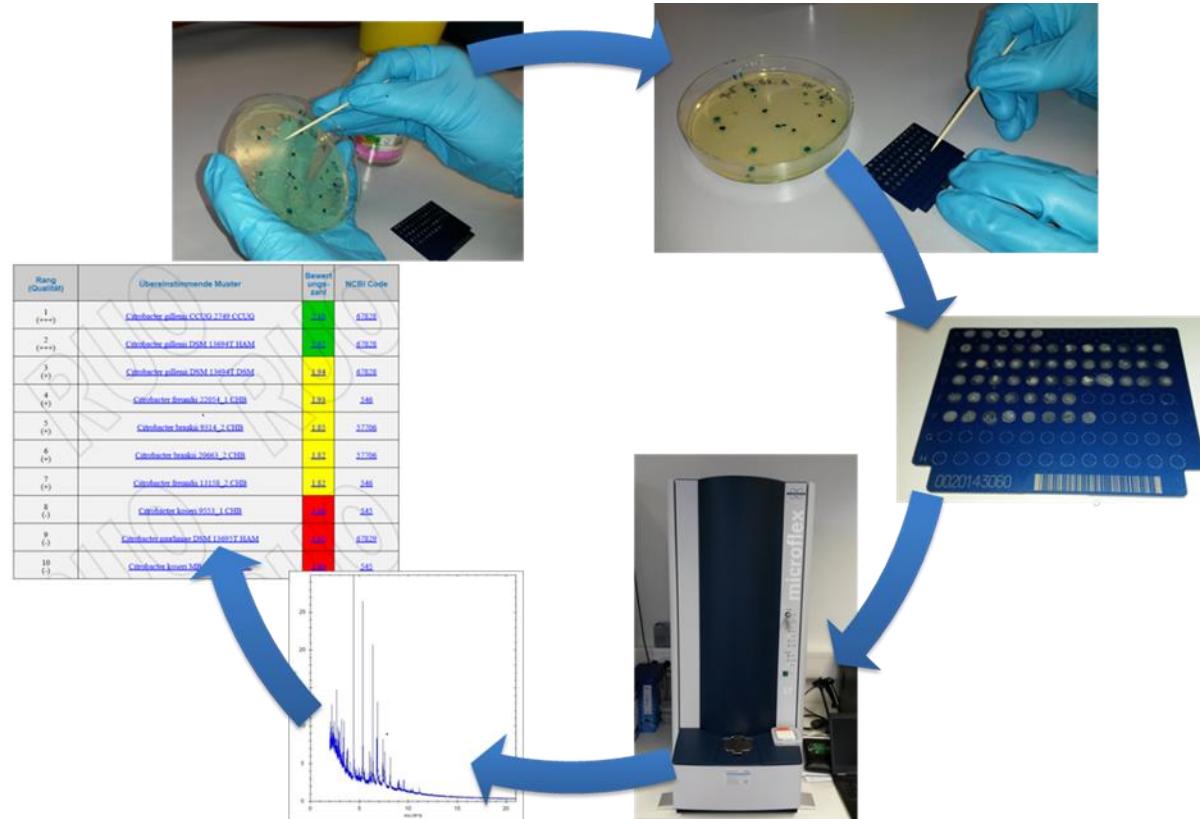


Campylobacter-spezifische Sonde

MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

Molekularbiologische Methoden

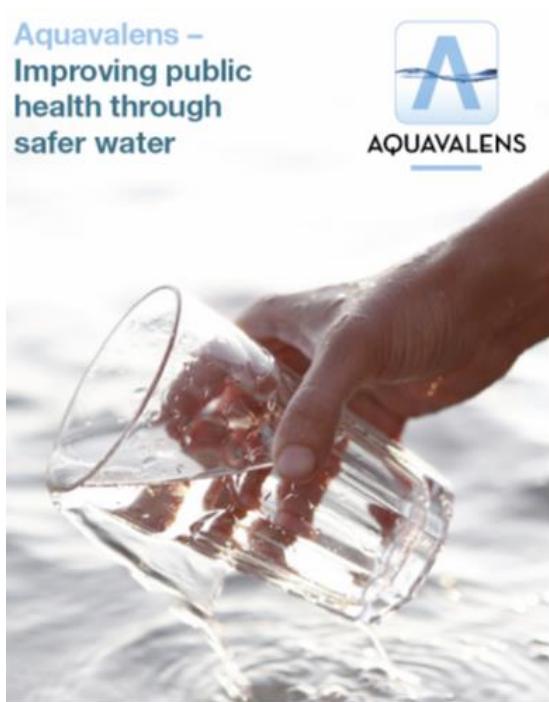
- Identifizierung über MALDI-TOF-MS



FORSCHUNGSERGEBNISSE

AQUAVALENS

Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used in food preparation



- FP 7
- 8,9 Mio €
- 2013 – 2018
- 40 Partner
- 13 Länder

www.aquavalens.org

FORSCHUNGSERGEBNISSE

AQUAVALENS

- Verbesserung der Sicherheit des Europäischen Trinkwassers durch die Entwicklung **schneller Nachweismethoden** für Viren, Bakterien und Parasiten in Wasser
- Entwicklung von geeigneten Plattformen, die die aktuellsten Erkenntnisse in Bezug auf **molekulare Techniken** nutzen
- Das Projekt soll einen Beitrag zur **schnelleren und routinemäßig einsetzbaren Detektion von wasserbürtigen Pathogenen** leisten und die Bereitstellung hygienisch unbedenklichen Wassers für den menschlichen Gebrauch und zur Herstellung von Lebensmitteln verbessern.

FORSCHUNGSERGEBNISSE

AQUAVALENS Ziel des WP10

Implementierung und Erprobung der zuvor entwickelten
Plattformen und Analysentechnologien für die
**Untersuchung realer Wasserproben in 4 großen WVU
(je 1 x Spanien, Großbritannien, Deutschland, Dänemark)**

Messprogramm 13 Monate, mind. monatlich,
Rohwasser, Prozesswasser, aufbereitetes Wasser, Netzwasser

Molekulare Methoden: PCR, FISH

Kulturmethoden: zur Verifikation, wo möglich



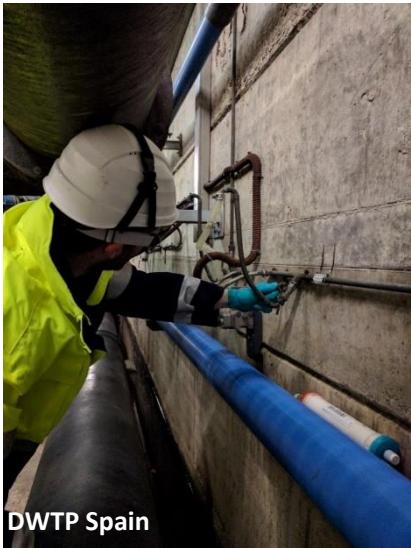
Universitat
de Barcelona

Technical
University of
Denmark



FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Messkampagnen (Primärarreicherung)



FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Molekulare Technologien und Verifikation



WP10 work: Aquavalens techniques
Detection techniques and verification
analyses



PCR

- **Viruses**
 - Ceeram kits: *Norovirus GI, GII* and Hepatitis A virus
- **Bacteria**
 - GPS kits: *E. coli*, *Campylobacter* spp, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp, *L. pneumophila*
- **Protozoa**
 - Ceeram kits: *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp
 - GPS kits: *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *T. gondii*

FISH and microscopy techniques

- Total cell count (DAPI staining)
- Viable cell count (FISH)
- *E. coli* (FISH)
- thermophilic *Campylobacter* (FISH)

Verification analyses

- *E. coli*
- Coliform bacteria
- *Campylobacter* spp
- *C. perfringens*
- Somatic coliphages
- Enterococci
- *P. aeruginosa*
- *L. pneumophila*
- *Giardia* spp
- *Cryptosporidium* spp

Minimum parameters

WP10-Large Systems
January 2018

CETAQUA
WATER TECHNOLOGY CENTER

wrc

TZW
Technologizentrum
Wasser

Aigües de
Barcelona

Nordwand

The James
Hutton
Institute

vermicon
solutions for microbiology

microLAN
On-line Biomonitoring Systems

GPS
On-line Biomonitoring

U
Universitat
de Barcelona

Technical
University of
Denmark

DTU

TZW

FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Primärreicherung



Rexeed (Dead-End Ultrafiltration)

Wiederfindung von *E. coli*, coliformen Bakterien und *Campylobacter* (Ergebnisse deutsches WVU)

Sampling point	Parameter	July 2016			July 2017		
		Direct sample	Rexeed™ sample	Recovery %	Direct sample	Rexeed™ sample	Recovery %
MPN/L	MPN/L		MPN/L	MPN/L		MPN/L	
RW	<i>E. coli</i>	700	585	83,5	240	127	52,9
RW	coliform bact.	11200	7658	68,4	4110	2717	66,1
RW	<i>Campylobacter</i>	7	4	57,1	6	5,2	86,6
FS1	<i>E. coli</i>	50	14	28,0	74	90	122
FS1	coliform bact.	660	375	56,8	930	867	93,2
FS1	<i>Campylobacter</i>	<1	1,1	n.a.	2	2,9	145
AKF1	<i>E. coli</i>	<10	<0,03	n.a.	<10	0,03	n.a.
AKF1	coliform bact.	<10	0,4	n.a.	<10	1,4	n.a.
AKF1	<i>Campylobacter</i>	<1	<0,04	n.a.	n.t.	<0,06	n.a.

FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Primärreicherung: Rexeed Filtration

- gutes Werkzeug (Wiederfindung und Anreicherung) für Viren und Bakterien in Prozess- und aufbereitetem Wasser, nicht jedoch für stark belastete Rohwässer
- erst die Primärreicherung ermöglicht die molekularen Methoden qPCR und FISH
- im Eluat der Primärreicherung können auch die Kulturverfahren angewendet werden (Herabsetzung der Nachweisgrenze).
- keine Probleme mit Verstopfung bei Filtration von bis zu 1000 L Trinkwasser



FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Sekundär-anreicherung und DNA-Extraktion

Zweiter Konzentrierungsschritt

- Notwendig für PCR-Methoden
- Centricon®Plus- 70, VivaSpin 15R filters, PEG-precipitation

Extraktion der DNA bzw. RNA

- Wiederfindung der bakteriellen DNA and viralen RNA bei der Extraktion (z. B. mit NucliSENS®) zufriedenstellend
- DNA-Konzentration im DNA-Extrakt stark schwankend



FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 Vergleich PCR-Nachweis und Kultur

- Bakterien nachweis *E. coli*
- In 3 der 4 WVU nachweisbar
- Übereinstimmung mit Verifikation (Kultur) zufriedenstellend
- Falschpositive 8%, Falschnegative 6%

		Aquavalens method	
Number of comparisons	213	Positive	Negative
		Positive	Negative
Verification method	Positive	33%	6%
	Negative	8%	52%

FORSCHUNGSERGEBNISSE

WP10 PCR-Detektion, Ergebnisse

Viren

- Virus-Nachweise in den ersten Aufbereitungsschritten (spanisches und deutsches WVU → hochbelastetes Flusswasser als Rohwasser). Kein Nachweis in dänischem WVU (Grundwasser) und Großbritannien.
- Punktuelle Nachweise in niedrigen Konzentrationen im Leitungsnetz

Bakterien

- *E.coli* and *Campylobacter* spp: Nachweis in Rohwässern und Reduktion durch den Aufbereitungsprozess.
- Einige wenige niedrige Positivnachweise im Leitungsnetz, negativ mit Verifikationsmethoden (möglicherweise tote / inaktivierte Zellen)

Protozoen

- In der Regel **keine Positivnachweise mit PCR**, da das Untersuchungsvolumen zu klein ist (Einsatz von 1-5 µL)

FORSCHUNGSERGEBNISSE

Zusammenfassung

- Anwendung der neu entwickelten molekularen Methoden über 13 Monate (Juli 2016-August 2017) in 4 großen Wasserversorgungen
- Rexeed-Filtration (bis 1000 L) sehr gute Primärreicherung mit guter Wiederfindung für alle Mikroorganismen, auch bei Kulturmethoden
- PCR-Methoden: zusätzlich Sekundärreicherung und DNA-Extraktion erforderlich
- PCR-Nachweise von *E. coli*, Campylobacter und Noroviren und Abnahme durch die Aufbereitung messbar (nicht Parasiten)
- FISH-Nachweis und Abnahme in der Aufbereitung bei den Parametern Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und thermophile Campylobacter
- Molekulare Methoden erfordern Voranreicherungsschritte und sind deshalb zumindest für “einfache” Parameter wie *E. coli* nicht schneller.

IDENTIFIZIERUNG

Warum Identifizierung in Trinkwasserproben?

Grenzwertüberschreitung im Trinkwasser:

- Nachweis von *E. coli*, coliformen Bakterien, Enterokokken
- Maßnahmen: Abkochgebot, Desinfektion etc...
- Ursachenforschung



Identifizierung kann bei Ursachenforschung hilfreich sein!

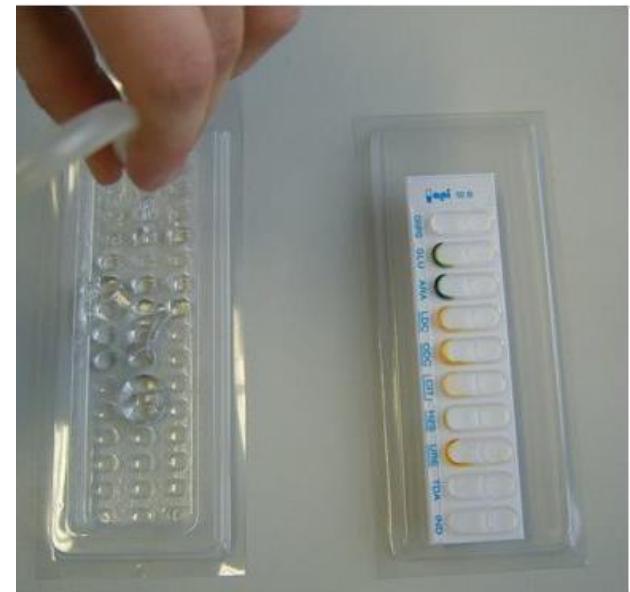
Identifizierung sinnvoll (z. T. von GA gefordert):

bei coliformen Bakterien (Unterscheidung fäkal / nicht fäkal),
bei Enterokokken (z. T. auch Nachweis von nicht fäkalen Spezies)

IDENTIFIZIERUNG

API®

- *API® 10:*
miniaturisiertes System zur Bakterienidentifizierung durch standardisierte biochemische Reaktionen
- Beimpfung der Röhrchen:
mit zu identifizierender Reinkultur
- feuchte Inkubationswanne:
für die Streifen zur Inkubation bei 36°C
- Zuordnung der Ergebnisse mithilfe
einer Datenbank



<http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/ue4.pdf>

IDENTIFIZIERUNG

API®

Vorteile

- einfache Handhabung
- kostengünstig, keine hohen Anschaffungskosten

Nachteile

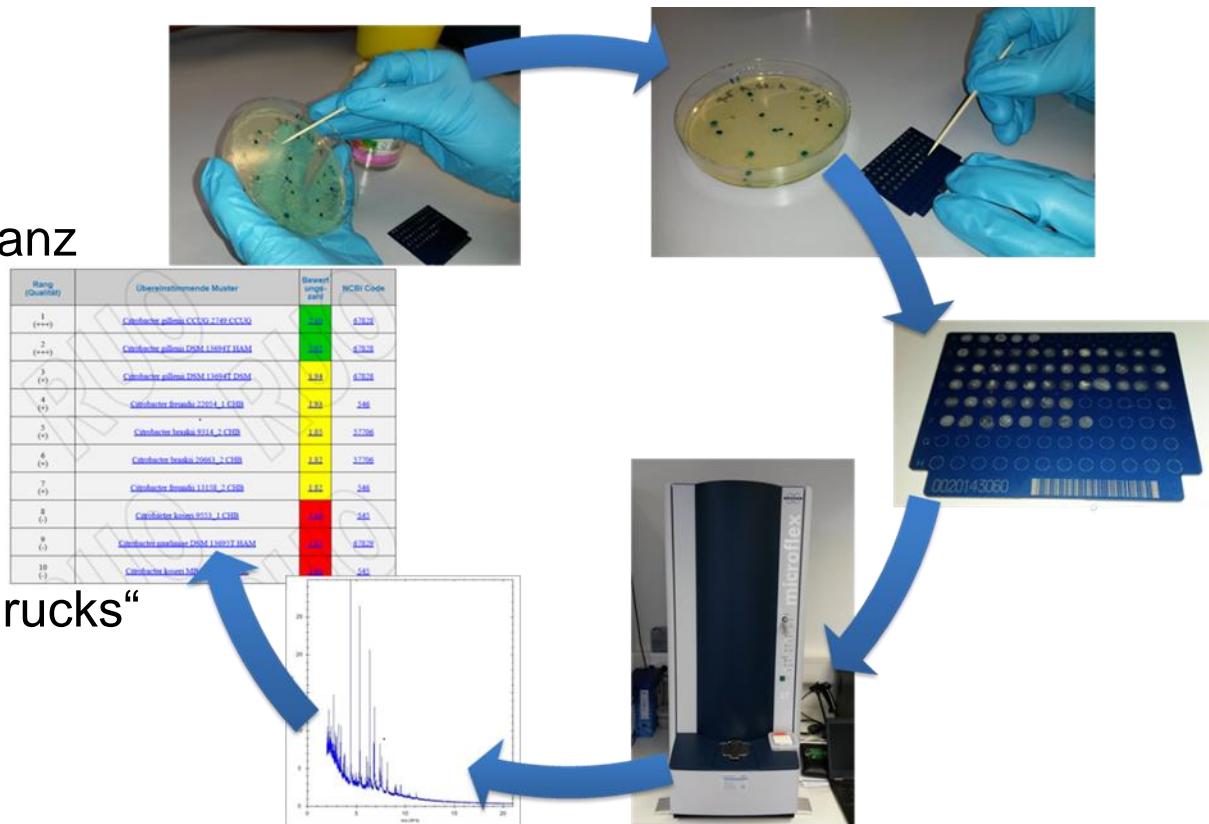
- Identifizierung von Bakterienarten nur möglich, wenn die Stämme in der Datenbank enthalten sind
- v. a. medizinische Anwendungen

IDENTIFIZIERUNG

MALDI-TOF-MS

„Molekularer Fingerabdruck“ von Bakterien

- Auswahl einer Kolonie
- Mischen mit Matrixsubstanz auf dem Probenteller
- Aufnahme eines Massenspektrums (Proteinmuster)
- Abgleich des „Fingerabdrucks“ mit einer Datenbank



IDENTIFIZIERUNG

MALDI-TOF-MS

Vorteile

- schnell
- unkompliziert
- geringe Verbrauchskosten

Nachteile

- bisher keine Klassifizierung von Subspezies
- nur so gut wie die Datenbank
- hohe Anschaffungskosten
- für Umweltproben noch keine umfangreiche Datenbank

April 2019 Beginn eines
DVGW-Forschungsvorhabens am TZW

IDENTIFIZIERUNG

Sequenzanalyse

Vorgehensweise

- Reinkultur als Kolonie
- Kolonie-PCR
- Sequenzierung
- Sequenzanalyse

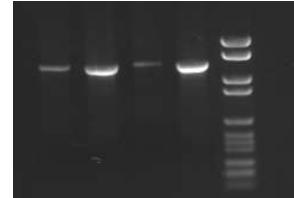
Varianten

- funktionelle Gene, wenn 16S rRNA nicht ausreichend zur Differenzierung
- Sequenz Gesamtgenom (langwierig, teuer), z. B. bei EHEC-Ausbruch

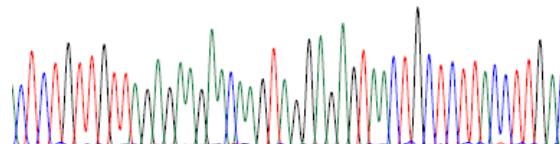
1. Isolierung



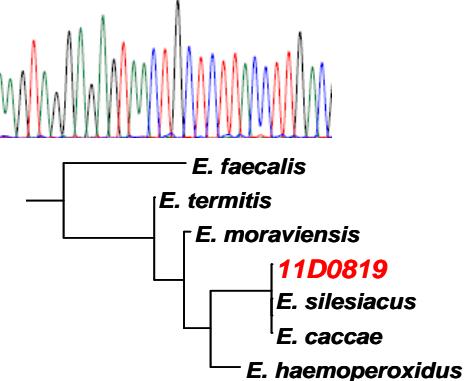
2. PCR 16S rRNA Gen



3. Sequenzierung



4. Sequenzanalyse



IDENTIFIZIERUNG

Sequenzanalyse

Vorteile

- immer eindeutige Sequenz
- Einordnung von neuen / unbekannten Isolaten möglich
- „Gold Standard“ der Identifizierung

Nachteile

- hoher Arbeitsaufwand
- Sequenzanalyse erfordert Erfahrung
- Zeitdauer im Stundenbereich
(Kultur, Kolonie-PCR, Sequenzierung, Sequenzanalyse)

Schlussfolgerungen

- Wahl der Methodik muss der Problemstellung angepasst sein
- im Trinkwasser z. B. zur Ursachenforschung sinnvoll
- wenn Faktor Zeit entscheidend: MALDI-TOF-MS
- wenn hohe Genauigkeit gefordert: Sequenzierung
- medizinische Fragestellungen: häufig MALDI-TOF-MS,
da hierfür bereits umfassende Datenbankeinträge vorliegen
- Fachexpertise zur Befundbewertung erforderlich

ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologische Methoden (quantitativ)

- zur allgemeinen Trinkwasserüberwachung (Indikatoren, quantitativ) derzeit noch nicht geeignet: zu unempfindlich, zu störäpfällig, nicht standardisiert
- in Sondersituationen einsetzbar bzw. zum direkten Nachweis von Krankheitserregern (qPCR oder FISH)
- wenn kultureller Nachweis nicht möglich ist (z. B. bei einigen Viren)
- wenn kultureller Nachweis erschwert ist (z. B. durch störende Begleitflora bei *Pseudomonas aeruginosa*)
- wenn kultureller Nachweis sehr lange dauert (z. B. bei Legionellen oder bei *Campylobacter*)

ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologische Methoden (qualitativ)

- Identifizierung, wenn bereits Kolonien vorliegen
- wenn Identifizierung zur Ursachenforschung gefordert
- mögliches Identifizierungsverfahren aus Kolonie:
Sequenzanalyse nach PCR (sehr genau)
- mögliches Identifizierungsverfahren aus Kolonie:
MALDI-TOF-MS (sehr schnell)

VIELEN DANK

Für die Förderung im Rahmen des
EU-Projektes Aquavalens und mehrerer DVGW-Projekte

Für Ihre Aufmerksamkeit!



Dr. Beate Hambisch

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser
Karlsruher Straße 84
76139 Karlsruhe
T 0721 9678-220 / F 0721 9678-101
beate.hambisch@tzw.de