

Thomas Egli^{1,2}

Neuer Wind in der mikrobiologischen Analyse von Trinkwasser

Die in der mikrobiologischen Trinkwasseranalytik eingesetzten Plattierungsverfahren sind langsam; Resultate sind z.T. erst nach Tagen verfügbar. Neue durchflusszytometrische Methoden zur Bestimmung der Totalzellzahl und Zellgrösse bewährten sich in der Praxis und wurden deshalb ins Lebensmittelbuch aufgenommen.

Im Umfeld von Robert Koch wurden um 1890 Plattenkultivierungsverfahren und Konzepte entwickelt, die bis heute weltweit die Pfeiler der Hygiene und mikrobiologischen Routineanalytik für Trinkwasser bilden. Die zwei Grundpfeiler sind erstens, die Suche nach Hygiene-«Indikatorkeimen», deren Anwesenheit eine Verschmutzung mit Fäkalien und so eine mögliche Präsenz von Krankheitserregern anzeigen sollen, und zweitens die generelle Beurteilung der mikrobiologischen Wasserqualität anhand der Gesamtzahl mikrobieller Zellen [1, 2]. Dabei ging man davon aus, dass alle in einer Probe aktiven Zellen auf geeigneten festen Nährböden zu einer sichtbaren Kolonie (sog. KBE, koloniebildende Einheiten) heranwachsen. Als «Fäkalienanzeigerkeim» dient dabei weltweit das Darmbakterium *Escherichia coli* (als Hygiene-Standard gilt, dass in 100 ml Trinkwasser *E. coli* nicht nachweisbar sein soll; derselbe Toleranzwert gilt in der Schweiz zusätzlich für fäkale Enterokokken). Der generelle Zustand des Wassers wird über die Zahl der KBE aerober, mesophiler Keime (AMK) beurteilt; sie sollte immer kleiner als 300 KBE/ml sein.

Problematisierung

Beide Methoden haben den Nachteil, relativ langsam zu sein; so erhält man beim Suchen nach *E. coli* ein Resultat erst nach einem Tag, für die AMK-Zahl muss man sich 3 bis 10 Tage gedulden [2, 3]. Sie wurden seit ihrer Einführung nur unwesentlich verbessert, doch während sich die Suche nach *E. coli* bewährte, erkannte man in letzter Zeit, dass die AMK-Methode nur einen verschwindend kleinen Teil (0,01

bis 1%), der anwesenden lebenden Mikroorganismen erfasst [1, 2]. Der in der Schweiz in der Hygieneverordnung festgelegten AMK-Toleranzwerte von 20 (nach Behandlung) und 300 KBE/ml (im Verteilnetz) unterschätzen somit die Zahl der wirklich vorhandenen, aktiven Zellen bei weitem. Deshalb muss heute in vielen Ländern die AMK-Zahl zwar noch bestimmt werden, ist aber kein hygienerelevanter Parameter mehr [2]. Es besteht daher ein echter Mangel an einfachen, in der Praxis robusten und zugleich schnellen und empfindlichen Methoden für die Detektion und Quantifizierung von mikrobiellen Zellen in Trinkwasser.

Lösung Durchflusszytometrie?

Die in der Medizin seit langem verwendete Methode der Durchflusszytometrie (DZ) (Abb. 1) wurde in den letzten Jahren so weiterentwickelt, dass heute auch kleinste planktonische Bakterienzellen, ja sogar Viren, nach geeignetem Anfärben erfasst werden kön-

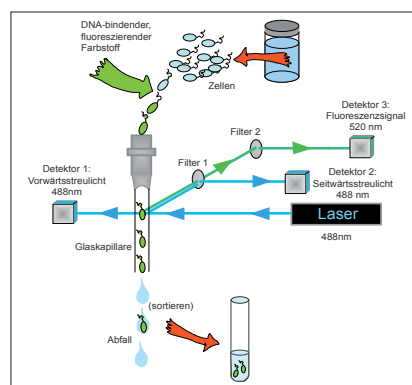


Abbildung 1: Prinzip der Durchflusszytometrie. Nach Anfärben der Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff können, je nach Gerät und gewünschter Präzision, zwischen 1000 und 100 000 Zellen pro Sekunde detektiert werden. Für die Bestimmung der Totalzellzahl und Aufnahme des «Fingerabdrucks» des Wassers, wie im SLMB festgelegt [15], braucht man weniger als einer Viertelstunde. Quelle [15]

Un vent nouveau souffle sur l'analyse microbiologique de l'eau potable

Les méthodes établies d'analyse de l'eau potable reposent en soi sur la mise en évidence d'indicateurs fécaux (*E. coli*, entérocoques) et sur le nombre de germes aérobies mésophiles. Ces méthodes établies résident dans la croissance d'organismes cibles sur des milieux de culture solides pour former une colonie et elles sont par conséquent lentes (>1 jour). C'est pourquoi il existe un besoin urgent de mettre au point des méthodes sensibles plus rapides. D'importants progrès ont été accomplis ces dernières années dans le domaine de la détection de cellules bactériennes et de virus au moyen de la cytométrie en flux (CMF). La CMF permet de déterminer en moins de 15 minutes le nombre total de cellules, leur taille approximative, leur vitalité, ainsi que d'autres caractéristiques cellulaires après coloration avec des agents fluorescents. Même la mesure en ligne du nombre total de cellules est déjà possible. Après avoir fait ses preuves dans la pratique, la détermination par CMF du nombre total de cellules dans l'eau douce, sous la direction de la Société Suisse de l'Industrie du Gaz et des Eaux (SSIGE) et de l'Eawag, a été standardisée et validée, puis intégrée au Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA).

nen. Die DZ bietet zudem eine Vielzahl von weiteren Möglichkeiten zur Detektion von Zellen und ihrer Eigenschaften (Abb. 2, online): In Kombination mit dem durch die Zelle hervorgerufenen Streulicht, oder nach Anfärben mit Aktivitätsfarbstoffen, Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern usw., ermöglicht sie gleichzeitig die Erfassung mehrerer Parameter und die Differenzierung unterschiedlicher Zellen. Dies erlaubte ihren Einsatz zuerst für biotechnologische Fragestellungen [4] und dann auch für solche in der aqua-

1 Abteilung Umweltmikrobiologie, Eawag, Das Wasserforschungsinstitut der Bundes, Dübendorf

2 MICROBES-IN-WATER GmbH, General Wille-Strasse 194, 8706 Feldmeilen

tischen mikrobiellen Ökologie [5,6]; sie ist aber auch anwendbar für hygiene-relevante Fragen, wie z.B. die Detektion und das Wachstumsverhalten spezifischer Krankheitserreger im Wasser

An der Eawag wurden in den vergangenen zehn Jahren eine Reihe von Durchflusszytometrie-Methoden für die schnelle Analyse von Roh- und Trinkwasser entwickelt.

[7–9]. An der Eawag wurden in den letzten Jahren eine Reihe von auf DZ basierenden Methoden für die schnelle Analyse von Roh- und Trinkwasser entwickelt [10–14]. Einige davon haben sich als aussagekräftig und robust genug für die Routineanalytik und die Praxis erwiesen.

Totalzellzahlbestimmung als Basismethode

Als Basismethode und «Arbeitspferd» dient die Bestimmung der Totalzellzahl (TZZ) [10] nach Anfärben mit einem an

Nukleinsäuren bindenden (DNA/RNA) Fluoreszenzfarbstoff. Zur Bestimmung der TZZ in Süßwasser hat sich «SYBR Green I» bewährt [10] (Abb. 3). In Kombination mit dem Seitwärtsstreulicht lassen sich in der «dot plot»-Darstellung zwei Zellgruppen unterscheiden: Grosse, stark grün fluoreszierende und kleinere, nur schwach fluoreszierende Zellen. Solches «clustering» wurde nicht nur in marinen Wasserproben, sondern auch in Süßwasser beobachtet, und sie werden als «low nucleic acid, LNA»- und «high nucleic acid, HNA»-Zellen bezeichnet [5].

Einige Anwendungen in der Praxis

Diese DZ-Methode erlaubt es, gleichzeitig eine Quantifizierung aller mikrobieller Zellen und einen ersten «Fingerabdruck» der anwesenden mikrobiellen Gemeinschaft zu erhalten. Nach einigen Jahren Erfahrung dürfen wir feststellen, dass diese beiden Parameter eine realistische Beurteilung des mikrobiologischen Zustands des Trinkwassers erlauben [11,14,16,17]. Die TZZ

reagiert sehr empfindlich auf mikrobiell abbaubare Verschmutzungen (assimilierbarer, organischer Kohlenstoff, AOC) [10], da 1 µg AOC im Durchschnitt zum Aufwachsen von 10^7 Zellen führt. Es sind vor allem die grossen HNA-Zellen, welche bei solchen Wiederverkeimungen die Überhand gewinnen [11,16–18]. In Abb. 3 ist dies exemplarisch gezeigt für Wasser in einem Verteilnetz, das mit zellarmem Grundwasser gespeist wird und über Nacht stagnierte [18]. Auch die Aufbereitung und Verteilung von aus Seewasser produziertem Trinkwasser kann über den einfachen Parameter der TZZ verfolgt werden (Abb. 4, online). Der Desinfektionsprozess (Ozonung), wie auch das Wiederaufwachsen in den drei biologischen Filtern und die Stabilität der TZZ im Verteilnetz kann mit der DZ-Methode klar beurteilt werden, während die AMK-Methode keine Aussage erlaubt. Auch Hausinstallationen lassen sich auf diese Weise sehr schnell und klar untersuchen.



Das ganze Spektrum, weil Mikrobiologie viele Gesichter hat

Hämatologie, Klinische Chemie, Schnelltests, Infektionsdiagnostik, Urindiagnostik, Mikroskopie, Liquordiagnostik, Zellzahlbestimmung, Histologie, Inkubatoren, Autoklaven und Reinraumtechnik

www.sysmex.ch

Standardisierung und Validierung für das Lebensmittelbuch

Beide Parameter, die Bestimmung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses, erwiesen sich für die Trinkwasseraufbereitung und -verteilung als so robust und aussagekräftig, dass sich frühe Anwender, darunter zwei grosse Wasserversorger der Schweiz, unter der Führung der Eawag und des SVGW (Schweizerischer Verein des Gas- und Wasserfaches) entschieden, die Methode zu standardisieren und validieren. Mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von ca. 5% für die TZZ und ca. 10% für das Verhältnis LNA/HNA-Zellen, fiel die Validierung äusserst erfolgreich aus. Deshalb hat das BAG die TZZ-LNA/HNA-Bestimmung mittels DZ als schnelle Alternative zur traditionellen AMK-Bestimmung (Nr. 56 / E.1) ins Schweizerische Lebensmittelhandbuch (SLMB) aufzunehmen. Die Methode (Nr. 333/1) [15] wird heute vom BAG empfohlen, und ein Handbuch mit Erklärungen und Tipps ist verfügbar [19].

Die Zukunft

Online-Messung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses [20], schnelle Detektion und Quantifizierung von Krankheitserregern innerhalb von ein bis zwei Stunden [7,8], und die Evaluierung von Desinfektionsprozessen vom Rohwasser [21–24], über die Aufbereitung und Verteilung bis ins Haus zum Hahn des Konsumenten, werden heute entwickelt und teilweise auf dem Markt bereits angeboten. Der Autor ist überzeugt, dass die Aufnahme der TZZ-Basismethode in das SLMB erst der Anfang eines Umbruchs in der mikrobiologischen Trinkwasseranalytik darstellt, denn das Potential der DZ-Methodik ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

Korrespondenz:
microbes-in-water@bluewin.ch

Dank

Finanziert wurden unsere Arbeiten primär durch die Eawag, WW Zürich, EU (TECHNEAU), BAFU, BAG, Velux-Stiftung, BAG, das KTI, Evian-Danone, AwwaRF, SVGW, und Nestlé Waters. Ihnen, sowie all meinen Mitarbeiter/-innen und beteiligten externen Partnern, danke ich für die langjährige, fruchtbare Zusammenarbeit.

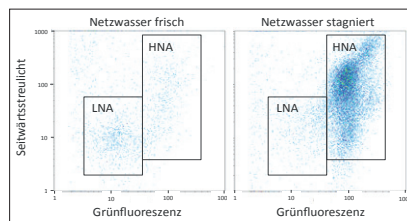


Abbildung 3: Die «dot plot»-Darstellung der DZ-Resultate einer Wasserprobe nach Anfärben mit SYBR Green I (jeder Punkt entspricht einer Zelle) zeigt die Veränderung des Fingerabdrucks eines Grundwassers, das als Trinkwasser direkt ins Netz eingespeist wurde und über Nacht stagnierte. Die Auftragung der Intensität des 488-nm-Laserstreulichts (SSC, side scatter) gegen Grün-Fluoreszenz-Intensität (520 nm) ermöglicht es, grosse, stark fluoreszierende Zellen (HNA) von kleinen, schwach fluoreszierenden Zellen (LNA) zu unterscheiden. Das Aufwachsen der HNA-Zellfraktion nach Stagnation ist klar zu erkennen. Quelle: [19]

Referenzen

Die vollständige Literaturliste und Abbildungen finden Sie online unter: www.sulm.ch/pipette → Aktuelle Ausgabe (Nr. 5-2013)

Michael Huber, Jürg Böni und Alexandra Trkola¹

Molekulare virologische Diagnostik im Wandel

Next Generation Sequencing auf dem Weg in die diagnostische Routine?

Nukleinsäure-Sequenzierungstechnologien der neusten Generation generieren Millionen von Sequenzen in einem Sequenziervorgang. Schon bald könnte diese Technologie zur Beantwortung unterschiedlicher Fragen in die Routine der virologischen und mikrobiologischen Diagnostik Einzug halten.

Der modernen Diagnostik steht eine Vielzahl von Methoden für den direkten Nachweis von Viren zur Verfügung. Herkömmliche Verfahren (Virusvermehrung in Zellkultur, Visualisierung von Viren durch Elektronenmikroskopie, Detektion von viralen Antigenen) wurden zunehmend durch sequenzspezifische molekulare Methoden ergänzt. Sie haben die Diagnostik deutlich verbessert, da sie den Nachweis viraler Nukleinsäuren und damit die Bestimmung von schwach konzentrierten und schwer kultivierbaren Viren ermöglichen. Aus Kostengründen muss sich ein Diagnostiklabor auf spe-

zialisierte Analysen der klinisch wichtigsten Erreger und damit nur auf einen Bruchteil der mehr als 200 derzeit bekannten humanpathogenen Viren [1–3] beschränken. Spezifische molekulare Tests stehen daher nur für ein relativ enges Spektrum von Viren zur Verfügung. Neben dem direkten Virusnachweis ist die Detektion von Mutationen zur sequenzbasierten, d.h. genotypischen Resistenzbestimmung eine weitere wichtige Anwendung der molekularen Diagnostik.

In den letzten Jahren hat die Technologie zur Sequenzierung von Nukleinsäuren gewaltige Fortschritte gemacht. Die neuen Methoden, bekannt als Next Generation Sequencing (NGS), zeichnen sich gegenüber

der traditionellen Sanger Sequenzierung durch einen viel höheren Output an Sequenzen aus. Es sind derzeit verschiedene Verfahren in Gebrauch, die alle auf einem ähnlichen Grundprinzip basieren: Mehrere Millionen von DNA-Molekülen werden auf einem Chip immobilisiert und direkt in situ und individuell sequenziert. Hochdurchsatzsequenziergeräte generieren dabei mehr als 1000 Mio. Sequenzen pro Analyse, die kompakteren Tischgeräten etwa 10 Mio. Vor allem Letztere sind für den Einsatz in der Diagnostik von Interesse, da sie einen kosteneffizienten Einsatz der neuen Sequenzierungstechnologie bei genügend hoher Kapazität erlauben (Tabelle 1). Dieser Technologiesprung eröffnet faszinierende

¹ Dr. Michael Huber, PD Dr. Jürg Böni und Prof. Dr. Alexandra Trkola, Institut für Medizinische Virologie, Universität Zürich