

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Band: 87 (1996)
Heft: 1

Artikel: Viren und Parasiten im Trinkwasser : Risiken und Prävention = Viruses and parasites in drinking water : risk assessment and prevention
Autor: Metzler, Alfred / Regli, Walter / Leisinger, Markus
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982069>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 19.11.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Viren und Parasiten im Trinkwasser: Risiken und Prävention*

Viruses and Parasites in Drinking Water: Risk Assessment and Prevention

Key words: Enteric viruses, Parasites, Water, Detection, Risk assessment

*Alfred Metzler, Walter Regli, Markus Leisinger, Harald Heider,
Katharina Schweizer und Ayub Tabisch*

Arbeitsgruppe für Umwelthygiene, Veterinär-medizinische Fakultät,
Universität Zürich, Zürich

Einleitung

Wasser, das für den menschlichen Gebrauch bestimmt ist, soll gemäss bestehenden Empfehlungen und Vorschriften frei von Krankheitserregern sein. Bei der mikrobiologisch-hygienischen Untersuchung von Wasser stützt man sich in der Regel auf bakteriologische Kriterien, die bei Trinkwasser (TW) die Bestimmung der aerob-mesophilen Gesamtkeimzahl in 1 ml Probe und den Ausschluss coliformer bzw. fäkal-coliformer Keime sowie jenen von Enterokokken in jeweils 100 ml Probe umfassen. Nachdem die Praxis gezeigt hat, dass bakteriologische Untersuchungen alleine nur bedingt geeignet sind, allenfalls bestehende Verunreinigungen mit enteropathogenen Viren und Parasiten aufzuzeigen, werden zunehmend weitergehende Kontrollmassnahmen ergriffen. So soll die Qualitätskontrolle bei TW in der Bundesrepublik Deutschland, gestützt auf EG-Richtlinien, durch Untersuchungen auf Enteroviren vervollständigt werden (1). Indessen findet man in den genannten Richtlinien keine methodischen Vorschriften. In einer EG-Vorschrift aus dem Jahre 1975, die mikrobiologische Qualität natürlicher Badegewässer betreffend, wird verlangt, dass in 10 l Wasser keine Enteroviren nachweisbar sein dürfen (2). Neben Empfehlungen für anzuwendende notwendige Aufkonzentrierungsverfahren (Filtration, Flockung, Zentrifugation) lässt die einschlägige Vorschrift ebenfalls offen, wie der Virusnachweis geführt werden soll. In den USA wurde 1989 eine neue Verordnung in Kraft gesetzt (3), die eine veränderte mikro-

* Vortrag gehalten an der 28. Arbeitstagung der Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, Zürich, 23. November 1995

biologisch-hygienische Beurteilung und Behandlung von aus Oberflächenwasser gewonnenem TW beinhaltet. Der neue Verordnungstext berücksichtigt speziell, dass enteropathogene Viren und insbesondere noch zu beschreibende Protozoen (*Giardia duodenalis* und *Cryptosporidium parvum*) gegen die Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel teilweise ausserordentlich resistent sind. Dieser Umstand führt dazu, dass die genannten Krankheitserreger durch bestehende TW-Aufbereitungsverfahren nicht gleichermaßen effizient unschädlich gemacht werden, wie dies beispielsweise bei *E. coli* der Fall ist. Wie von Botzenhart (4) ausführlich dargelegt, stützt sich die neue US-Verordnung und deren Begründung auf Konzepte, die in der EG-Richtlinie über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch nicht enthalten sind. Dies sind insbesondere

1. die Abkehr von *E. coli* als Qualitätsindikator für desinfiziertes Wasser,
2. die Festlegung eines Desinfektionszieles in Form einer Reduktionsrate von 99,99% für Viren und 99,9% für Dauerformen von Protozoen,
3. die Einführung einer Risikoabschätzung für TW-bedingte Infektionskrankheiten zur Begründung des Desinfektionszieles und
4. die Beurteilung des Aufbereitungs- und Desinfektionsverfahrens anhand physikalischer und chemischer Parameter anstelle von mikrobiologischen Untersuchungen, insbesondere durch den Nachweis, dass eine bestimmte Desinfektionsmittelkonzentration C für eine bestimmte Einwirkungszeit T gewirkt hat (CT-Konzept).

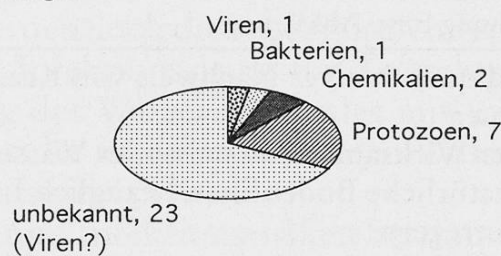
In unserem Land werden vornehmlich Grundwasser-, Oberflächenwasser- und Quellwasser-Vorkommen für die TW-Versorgung genutzt. Da eine Kontamination dieser TW-Ressourcen mit Krankheitserregern nicht auszuschliessen ist, erscheint eine Risikobeurteilung angebracht. Diese sollte insbesondere regionale Gegebenheiten (wie die Beschaffenheit der natürlichen Bodenfilter sowie Art und Ausmass der bestehenden Belastungen) berücksichtigen. Die nachstehenden Ausführungen vermitteln zunächst die Grundlagen für die Durchführbarkeit von Risikoanalysen bei mit Krankheitserregern kontaminiertem TW. Dann werden einige, mit kontaminiertem TW zusammenhängende Krankheitsausbrüche im Ausland und deren Hintergründe vorgestellt und schliesslich sollen erste Ergebnisse von Felduntersuchungen diskutiert werden, die von der Arbeitsgruppe für Umwelthygiene (5) erzielt wurden.

Risikoabschätzung

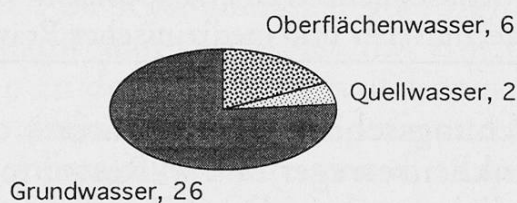
Allgemein handelt es sich um Verfahren zur Abschätzung und Quantifizierung von unerwünschten Ereignissen, wobei man das numerische Risiko (R) aus dem Produkt von möglichem Schadenumfang (S) und der Eintrittswahrscheinlichkeit (p_t) innerhalb einer bestimmten Zeitspanne berechnet. Die praktische Ermittlung bestehender Risiken basiert entweder auf empirischen Verfahren durch Ableitung aus eigenen bzw. fremden Erfahrungswerten oder auf theoretisch-analytischen Methoden, denen gezielte Untersuchungen zugrunde liegen. Da die Werte für S und p_t in der Regel nicht exakt angegeben werden können, zieht man den Begriff Risikoabschätzung jenem der Risikoanalyse zumeist vor.

Die in Abbildung 1 festgehaltenen Informationen können als Beispiel für eine Risikoabschätzung betrachtet werden, bei der Erfahrungswerte aus dem Ausland für eine Beurteilung der bei uns möglicherweise herrschenden Situation herangezogen werden. So traten in den USA in den Jahren 1991 bis 1992 insgesamt 34 recherchierte und gemeldete Krankheitsausbrüche auf, die im Zusammenhang mit kontaminiertem TW standen (6). Dabei wurden insgesamt 17500 erkrankte Personen ermittelt. Als Ursache der 34 Ausbrüche ermittelte man in je einem Fall Viren bzw. Bakterien, in zwei Fällen chemische Verunreinigungen und in sieben Fällen Protozoen. In 23 Fällen blieb die wahrscheinlich infektiöse Ursache unerkannt, wobei man davon ausgeht, dass es sich in der Mehrzahl dieser Fälle um Infektionen mit enterischen Viren handelte (zu den enterischen Viren zählt man alle Viren, die im Magen-Darm-Trakt eine primäre Vermehrung erfahren und häufig Gastroenteritis, gelegentlich auch systemische Krankheiten und Hepatitis verursachen). Bezüglich der Herkunft der inkriminierten Trinkwässer stellte man in zwei Fällen Quellwasser, in sechs Fällen Oberflächenwasser und in 26 Fällen Grundwasser fest. Die dritte Datengruppe zeigt, dass in zehn Fällen unbehandeltes Grundwasser und in 17 Fällen eine mangelhafte Aufbereitung, zumeist von Oberflächenwasser, als Infektionsquelle ermittelt wurde. Schliesslich stellte man fünfmal eine sekundäre Verunreinigung des TWs im Verteilernetz fest, und in zwei Fällen konnten die ursächlichen Mängel nicht festgestellt werden. Die erste Datengruppe ist ein starker

Aetiologie



Ressource



Ursache

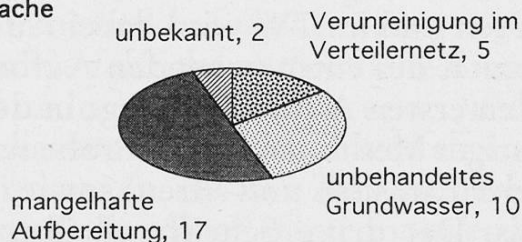


Abb. 1. Epidemiologische Hintergründe bei 34 durch kontaminiertes Trinkwasser verursachten Krankheitsausbrüchen: USA, 1991–1992, rund 17 500 Krankheitsfälle (6)

Hinweis auf die Bedeutung enterischer Viren und Protozoen als TW-vermittelte Krankheitserreger, während die zweite Datengruppe zeigt, dass TW-Ressourcen ungeachtet ihrer Herkunft durch Kontaminationen gefährdet sind. Die dritte Datengruppe zeigt, dass Grundwasser häufiger als allgemein angenommen einer Desinfektion bedarf. Schliesslich fällt auf, dass eine nicht seltene Ursache für TW-vermittelte Krankheitsausbrüche in technischen Unzulänglichkeiten bei der Wasseraufbereitung liegt. Die letztgenannte Situation wurde dramatisch deutlich, nachdem im Jahre 1993 in Milwaukee, USA, eine mit Durchfallssymptomen einhergehende Epidemie auftrat, die durch mit Protozoen (*C. parvum*) kontaminiertes TW verursacht worden war. Von der Epidemie waren rund eine halbe Million Personen betroffen (7, 8).

Bei der Beurteilung der in Abbildung 1 wiedergegebenen Daten und der in den USA geltenden Forderung, wonach bei der TW-Aufbereitung eine Reduktion von 99,99% bei Enteroviren und eine solche von 99,9% bei Protozoen gewährleistet sein muss, ergeben sich verschiedene grundsätzliche Fragen, für deren Beantwortung theoretische und analytische Untersuchungsmethoden herangezogen werden müssen, die ihrerseits die Grundlage für eine objektive Risikoabschätzung darstellen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Grundlagen für mikrobiologische Risikoabschätzungen bei Trinkwasser und Trinkwasser-Ressourcen

	Art der Untersuchung bzw. Abklärung
1.	Qualitativer und quantitativer Nachweis von Krankheitserregern in Wasservorkommen
2.	Überprüfung der Wirksamkeit bestehender Wasseraufbereitungsprozesse, einschliesslich natürliche Bodenfilter, bezüglich Inaktivierung/Elimination von Krankheitserregern
3.	Bestimmung von Expositionsraten
4.	Abklärung der Konsequenzen einer Exposition
5.	Formulierung technischer und medizinischer Präventionsmassnahmen

Beim ersten Untersuchungsschritt geht es darum, qualitativ und quantitativ aufzuzeigen, welche Krankheitserreger in TW-Ressourcen und im TW selbst vorkommen. Dabei sind örtliche und zeitliche Gegebenheiten durch ein sinnvolles Monitoring aufzuzeigen. Der Vergleich bestehender Belastungen mit Viren und Parasiten in TW-Ressourcen und im TW wird dabei Auskunft über die Inaktivierungs-/Eliminationskapazität des entsprechenden Aufbereitungsprozesses geben. Der Kernpunkt der beiden ersten Aktivitäten liegt in der Entwicklung einfacher, schneller und kostengünstiger Methoden für die Probenvorbereitung (Aufkonzentrierung und Reinigung der Parasiten und Viren) sowie im qualitativen und quantitativen Erregernachweis. Der dritte Schritt soll über die Anzahl der Erreger Auskunft geben, welche von exponierten Individuen in einem gegebenen Zeitraum aufgenommen werden. Im nächsten Schritt muss geklärt werden, welche Konsequenzen die Aufnahme von Krankheitserregern für das betroffene Individuum und

die exponierte Population zur Folge hat. Bei entsprechenden Abklärungen sind sowohl Eigenschaften des Agens (Anzahl infektiöse Einheiten und deren Virulenz) als auch der exponierten Population (Immunstatus, Konstitution) zu berücksichtigen. Grundsätzlich stellt sich weiterhin die nicht leicht zu beantwortende Frage nach der minimalen infektiösen Dosis. Allgemein geht man davon aus, dass hierzu bei den meisten enterischen Protozoen und Viren nur wenige infektiöse Partikel notwendig sind (9–11). An dieser Stelle sind ergänzend zwei Szenarien zu unterscheiden, die man als technische Pannen (kurzdauernde, jedoch starke Kontamination des TW's) bzw. Folgen einer sogenannten «low level exposure» (andauernde, jedoch geringgradige Kontamination des TW's) umschreiben kann. Der geschilderten Epidemie in Milwaukee lagen offensichtlich technische Unzulänglichkeiten bei der TW-Aufbereitung zugrunde, wobei kurzfristig eine grosse Anzahl von *Cryptosporidium*-Oozysten in das Verteilernetz gelangten. Bezüglich «low level exposure» hat die WHO (11) auf mögliche volksgesundheitliche Konsequenzen hingewiesen, die anhand des nachstehenden Rechenbeispiels nachzuvollziehen sind:

Eine Stadt mit 10^6 Einwohnern erhalte behandeltes, jedoch nicht vollständig virusfreies TW, das noch 1 infektiöse Einheit pro 20 l enthält. Angenommen jede Person trinke täglich 1 l Wasser, dann nehmen pro Tag mindestens 5×10^4 Personen eine infektiöse Einheit auf. Nimmt man weiter an, dass bei 1% der exponierten Personen eine Infektion resultiert, werden täglich 5×10^2 Personen infiziert. Vorausgesetzt, dass von den infizierten Personen deren 2% erkranken, werden täglich 10, d. h. jährlich 3650 Personen erkranken. Zusätzlich zu diesen manifest Erkrankten werden auch die subklinisch infizierten Ausscheider (rund 180×10^3) nicht nur ein Infektionsrisiko für Kontaktpersonen darstellen, sondern auch zur Belastung des Wasserkreislaufes mit Viren beitragen. Insgesamt können die Virusausscheider im entsprechenden Wasserversorgungsgebiet eine endemische Situation aufrechterhalten.

Nachdem Expositions- und Infektionsrisiken bestimmt sind, wird es im letzten Schritt einer Risikobeurteilung darum gehen, gegebenenfalls als notwendig erachtete Präventionsmassnahmen zu formulieren. Hierzu gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten. Einerseits kann man versuchen, das Ausmass der Kontamination durch gezielte Massnahmen an der Quelle zu reduzieren. Andererseits wird man versuchen, bestehende Kontaminationen durch geeignete Methoden der TW-Aufbereitung zu reduzieren. Schliesslich könnte man die exponierte Population präventiven Impfungen unterziehen. In der Praxis werden zumeist die beiden erstgenannten Möglichkeiten umgesetzt. So wird man einerseits anstreben, das Ausbringen hoffremder (Klärschlamm) und hofeigener Dünger gezielten Vorschriften zu unterziehen (Art, Menge sowie zeitliche und örtliche Einschränkung der Verwendung). Wo angezeigt, wird andererseits Grund- und Quellwasser geeigneten chemischen und/oder physikalischen Desinfektionsverfahren (z. B. Chlorung, Ozonung, UV-Bestrahlung) unterzogen. Bei der TW-Aufbereitung aus Oberflächenwasser ist eine entsprechende Behandlung immer notwendig, wobei neben chemischen und physikalischen Desinfektionsverfahren verschiedenen Filtrationstechnologien eine praktische Bedeutung zukommt. Bei der Desinfektion von Wasser muss berücksichtigt werden, dass sich parasitäre Dauerstadien und enterische Viren

gegenüber gebräuchlichen Desinfektionsverfahren teilweise bemerkenswert resistent verhalten (4). Bei den Viren beobachtet man zudem, dass sie, wegen ihrer Kleinheit (25–80 nm Durchmesser), natürliche und technische Filter leicht durchdringen können. Ein nicht zu unterschätzendes diagnostisches Problem stellt die in den USA umgesetzte Überlegung dar, wonach 100 000 l Trinkwasser höchstens 0,7 Giardia-Zysten enthalten dürfen, wenn das jährliche Infektionsrisiko von 1:10 000 Konsumenten nicht überschritten werden soll. Ein Parasitennachweis in dieser Größenordnung ist aus naheliegenden Gründen nicht mehr praktikabel. Entsprechend will man die Forderung durchsetzen, dass die in Rohwässern bestehende Parasitenbelastung durch den Aufbereitungsprozess um 99,9% reduziert wird. Im gleichen Zug sollen vorhandene enterische Viren um 99,99% dezimiert werden.

Intestinale Protozoen als Trinkwasserkontaminanten

Flagellaten der Gattung *Giardia* parasitieren vorwiegend im Dünndarm, wobei sie Durchfall und weitergehende Krankheitserscheinungen hervorrufen können (12). Die Infektion erfolgt durch perorale Aufnahme der widerstandsfähigen Zysten, die von Giardiaträgern mit den Fäzes ausgeschieden werden. Die Übertragung der infektiösen Zysten (11 x 15 µm messend) erfolgt zumeist über direkte oder indirekte Kontakte zwischen Ausscheidern und Rezipienten, dann aber auch via Trink- und Badewasser sowie durch kontaminierte Lebensmittel. Die Bedeutung des letztgenannten Infektionsweges, obwohl immer wieder hervorgehoben, bedarf der weitergehenden Abklärung. Der Lebenszyklus von *Giardia* ist einfach und umfasst zwei Stadien. Im Dünndarm siedelt sich der exzystierte Trophozoit mit Hilfe seiner Sauggrube an der Schleimhaut an und vermehrt sich durch asexuelle Teilung. Abgelöste Trophozoiten, die mit dem Darminhalt bewegt werden, erfahren im Dickdarm einen Reiz zur Umwandlung zu umweltresistenten Zysten. Als Erreger der Giardiose des Menschen, der Haus- und Nutztiere sowie zahlreicher anderer Säugetiere und Vögel gilt *G. duodenalis*. Anlässlich einer koprologischen Untersuchung von Nutztieren in der Schweiz erwiesen sich 216 von 815 Kälbern (26,6%), 114 von 382 Schaflämmern (29,8%) und 4 von 20 Ziegenlämmern als *Giardia*-Ausscheider (13). Beim Menschen stellte man zwischen 2,4 und 11,6% Ausscheider fest (12). Neuere Erkenntnisse bestätigen die von der WHO vertretene Meinung (14), wonach die Giardiose zu den Zoonosen zählt. Bei epidemiologischen Beurteilungen muss neben der regional unterschiedlich hohen Prävalenz bei Mensch und Tier berücksichtigt werden, dass infizierte Individuen widerstandsfähige *Giardia*-Zysten mit den Fäzes zeitweilig in grosser Zahl ausscheiden. Bei infizierten Tieren wurden bis zu 10^8 ausgeschiedene Zysten pro Tier und Tag festgestellt und in Siedlungsabwässern gelegentlich erhebliche Mengen von Zysten ermittelt.

Hibler und *Hancock* (15) geben eine umfassende Übersicht über aktuelle Aspekte der von kontaminiertem Wasser ausgehenden Giardiose des Menschen. Die

Untersuchung von Wasserproben auf das Vorhandensein von Giardia-Zysten ist anspruchsvoll und kann mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden kaum routinemässig durchgeführt werden. Diesem Wunsch stehen ein grosser Zeitaufwand, die hohen Kosten sowie die Notwendigkeit von geschultem Personal entgegen. Die noch heute empfohlene Referenzmethode (16, 17) für den Nachweis von Giardia-Zysten in Wasserproben umfasst eine Aufkonzentrierung von bis zu mehreren hundert Liter umfassenden Wasserproben mit Hilfe von Filterkerzen, die nachfolgende Elution des in den Filtern zurückgehaltenen partikulären Materials, einen Reinigungsschritt (z. B. Flotation über Saccharosekissen) und schliesslich den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Zysten. Dieser wird zumeist in situ an auf Membranfiltern fixierten Parasiten durchgeführt. Eine erhöhte Spezifität des Nachweises kann durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern erreicht werden.

Protozoen der Gattung *Cryptosporidium* sind bei Mensch und Tier weltweit verbreitet, wobei *C. parvum* als Zoonoseerreger gilt (12, 14). Bei 275 in der Schweiz untersuchten gesunden und an Durchfall erkrankten Kälbern betrug die Rate der Ausscheider 9%, beziehungsweise 32% (18). Untersuchungen zur globalen Prävalenz des Infektionserregers weisen auf eine altersabhängige Immunitätsentwicklung in grossen Teilen der untersuchten Bevölkerungsgruppen hin. Zusammen betrachtet folgt, dass *Cryptosporidium*-Oozysten ubiquitär verbreitet sind, so dass Kontaminationen von Wasservorkommen durchaus möglich sind. Während sich die *Cryptosporidiose* bei immunkompetenten Personen meist als harmlose, selbstlimitierende Darminfektion von wenigen Tagen Dauer manifestiert, kann sie bei immungeschwächten Patienten einen schweren, langdauernden und therapieresistenten Verlauf nehmen. Bei Kälbern und gelegentlich bei Schaflämmern ist der manifeste Verlauf der *Cryptosporidiose* von klinischer Bedeutung. Die Übertragung der kleinen rundlichen (4–6 µm), umweltresistenten und infektiösen Oozysten geschieht auf analogem Weg wie bei *Giardia* angeführt, wobei insbesondere die Möglichkeit zur Übertragung mit Wasser von Bedeutung ist. Der Lebenszyklus von *C. parvum* ist relativ komplex. Er umfasst eine mitotische Teilungsphase (Schizogonie), die Differenzierung zu sexuellen Stadien mit nachfolgender Befruchtung (Gamogonie) und die nach erfolgter Bildung der *Cryptosporidium*-Oozysten auftretende Sporulation (Sporogonie). Der Nachweis der kleinen, indifferenten *Cryptosporidium*-Oozysten in Wasser ist vergleichsweise anspruchsvoll. Im wesentlichen werden jedoch analoge Methoden wie bei *Giardia*-Zysten angewandt.

Eine Übersicht über aktuelle Aspekte der Kontamination von Wasser mit *Cryptosporidien* und deren Kontrolle ist bei Rose (19) zu finden. Oftmals versuchte man *G. duodenalis* und *C. parvum* mit der gleichen (Referenz-)Methode nachzuweisen (20–25). Dabei wurden zumeist erheblich mehr *Cryptosporidium*-Oozysten als *Giardia*-Zysten festgestellt. In Anbetracht der Schwierigkeiten des Nachweises von *C. parvum* und *G. duodenalis* in Wasser hat es nicht an Versuchen gefehlt, nach Markern (Indikatoren) zu suchen, die das Vorhandensein der beiden Parasiten aufzeigen würden. Andererseits wurden verbesserte Methoden für die Aufkonzentrierung und Reinigung der beiden Parasiten entwickelt. Die Befunde

bezüglich Markern sind teilweise widersprüchlich (20–25) und lassen wenig Hoffnung, dass dereinst brauchbare Indikatoren gefunden werden könnten. Für die verbesserte Aufkonzentrierung von Wasserproben wurden bisher Flockungsreaktionen (24, 26) und Filtrationsmethoden (25, 27) mit Erfolg eingesetzt. Für die Identifikation der beiden Parasiten wurde schliesslich FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) herangezogen, wobei es durchwegs als notwendig erachtet wurde, die FACS-Ergebnisse fluoreszenzmikroskopisch zu bestätigen (24, 28, 29). Kürzlich wurde eine vielversprechende Methode für den molekularbiologischen Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten in Umweltproben veröffentlicht (30). Ein bisher ungelöstes Problem beim Nachweis enteropathogener Protozoen ist der naheliegende Wunsch zur Abklärung der Infektiosität isolierter Zysten und Oozysten. Zur Abklärung entsprechender Fragen bieten sich Vitalfarbstoffe, das gezielte Exzystieren *in vitro* und die Infektion von Zellkulturen oder Versuchstieren an.

Nachweis enterischer Parasiten in Wasservorkommen der Schweiz

Unter Verwendung von Filterkerzen wurden im zweiten Halbjahr 1992 Wasserproben aus Oberflächengewässern der Ostschweiz aufkonzentriert (jeweils 400 l) und mit Hilfe der Referenzmethode (16, 17) weiter bearbeitet. Nach erfolgter Elution wurde das partikuläre Material über einem Saccharosekissen durch Zentrifugation gereinigt, mittels Filtration auf Membranfiltern deponiert, *in situ* mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert und schliesslich fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. *Giardia*-Zysten wurden in 9 und *Cryptosporidium*-Oozysten in 11 der 18 untersuchten Gewässern festgestellt, wobei die Anzahl der in 100 l Wasser ermittelten Zysten (0–75) deutlich niedriger ausfiel als bei den Oozysten (0–383). Diese Befunde decken sich mit solchen, die in Nordamerika erhoben wurden (19).

Nachdem die ersten Erfahrungen gezeigt hatten, dass mit der Referenzmethode keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden konnten, suchte man nach Alternativmethoden (24, 29). Durch Flockung von Wasserproben mit Aluminiumsulfat, gefolgt von einer Partikelreinigung durch Flotationszentrifugation und in Kombination mit FACS-Analyse und fluoreszenzmikroskopischer Bestätigung gelang der Parasitennachweis im Vergleich zur Referenzmethode mit wesentlich verbesserter Sensitivität und Spezifität. In der Periode März bis Juni 1993 wurde dann eine weitere Serie von Felduntersuchungen durchgeführt, die zu nachstehendem Ergebnis führte. Bei 11 beziehungsweise 8 der 15 untersuchten Oberflächengewässer wurden *Giardia*-Zysten, beziehungsweise *Cryptosporidium*-Oozysten nachgewiesen. Dabei fand man je 20 l untersuchte Wasserprobe zwischen 0 und 29 *Giardia*-Zysten und zwischen 0 und 23 *Cryptosporidium*-Oozysten. Besonders stark belastet zeigten sich die Flüsse Thur und Glatt sowie ein häufig zum Baden benutzter Kleinsee. Wie schon in der ersten Versuchsserie konnten keine Korrelationen zwischen den parasitologischen Ergebnissen und turbidimetrischen sowie

bakteriologischen Befunden festgestellt werden. Die Feststellung, wonach in der zweiten Versuchsreihe rund zweimal mehr Giardien als Cryptosporidien ermittelt wurden, wurde mit der verbesserten Spezifität der Alternativmethode erklärt. Prinzipiell zu berücksichtigen sind allerdings auch jahreszeitliche und lokal wirk-same Unterschiede.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den bisher untersuchten Oberflächengewässern der Ostschweiz sowohl Giardia-Zysten als auch Cryptosporidium-Oozysten häufig feststellbar sind. Es bleibt offen, wie weit solche Belastungen eine unmittelbare Gefährdung von Badenden bedeuten und Kontaminationen von Grund- und Quellwasservorkommen zur Folge haben. Ein einzelner Versuch in dieser Richtung zeigte, dass das bakteriologisch zu beanstandende Quellwasser eines landwirtschaftlichen Betriebes tatsächlich mit beiden Parasiten verunreinigt war.

Enterische Viren als Trinkwasserkontaminanten

Bisher konnten wasservermittelte Virusinfektionskrankheiten nur vereinzelt durch gesicherte ätiologische Abklärungen festgestellt werden (6). Hieraus könnte man ableiten, dass dem Vehikel Wasser keine praktische epidemiologische Bedeutung zukommt und dass demzufolge keine weitergehenden Untersuchungen angezeigt sind. Eine solche Beurteilung berücksichtigt jedoch nicht jenes Risiko, das insbesondere aus den bereits besprochenen «low level exposures» resultiert. Darüber hinaus gilt für unser Land und benachbarte Staaten, dass zweckdienliche epidemiologische Erhebungsdaten zumeist fehlen. Die mit dem Untersuchungs- und Meldewesen der USA erzielten Daten lassen für die dortigen Verhältnisse den Schluss zu, dass enterische Virusinfektionen als Folge von Trinkwasserkontaminationen nicht nur vorkommen, sondern häufiger sein dürften als bisher angenommen wurde (Abb. 1). Risikoabschätzungen im Zusammenhang mit viruskontaminiertem TW stellen ein schwieriges Unterfangen dar, da der qualitative und quantitative Erregernachweis auch mit modernen Methoden aufwendig und kostenintensiv bleibt. Die Komplexität epidemiologischer Abklärungen bei enterischen Viren im Vergleich zu den parasitären Protozoen Giardia und Cryptosporidium erscheint insofern vereinfacht, indem die Viren nur ausnahmsweise zoonotische Eigenschaften aufweisen, d. h. dass bestehende Speziesbarrieren kaum durchbrochen werden. Der Virusnachweis in Umweltproben umfasst zwei wesentliche Phasen, die Probenvorbereitung und der eigentliche Virusnachweis (31). Da Infektionsrisiken auch bei geringem Ausmass einer Kontamination nicht auszuschliessen sind, müssen die Nachweismethoden darauf ausgerichtet sein, geringe Virusbelastungen aufzuzeigen. Dabei wird man je nach erwartetem Umfang der Viruskontamination mehr oder weniger umfangreiche Wasserproben untersuchen müssen. Der Ersatz konventioneller Methoden für den Virusnachweis, wie Zellkulturtechniken oder Tierversuche, durch solche der Molekularbiologie, wie beispielsweise Hybridisierung mit markierten Gensonden oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bringt

einige wirksame Fortschritte (32). Diese liegen insbesondere darin, dass das Ergebnis des Virusnachweises innerhalb kurzer Zeit vorliegt. Voraussetzung hierzu ist allerdings die Verfügbarkeit virusspezifischer Sonden und Primer, die ihrerseits auf bekannten Sequenzdaten des viralen Genoms basieren. Mit Hilfe der hochempfindlichen PCR ist es theoretisch möglich, einzelne Viruspartikel nachzuweisen. Bevor jedoch zum Virusnachweis geschritten werden kann, müssen die im Wasser vorhandenen Viren in einem ersten und wichtigen Schritt aufkonzentriert werden (33). Hierzu werden zumeist Verfahren der Filtration eingesetzt, wobei die von den Filtermembranen zurückgehaltenen Viruspartikel in einem zweiten Schritt eluiert werden müssen. Hierzu verwendet man häufig eine Lösung von kompetitiv wirksamem Fleischextrakt, wobei der pH-Wert auf 8–10 eingestellt wird. Bei diesem Arbeitsschritt ist mit Virusverlusten in der Größenordnung von 10–30% zu rechnen. In der Regel ist es notwendig, das primäre Viruseluat bei tiefem pH-Wert sekundär auszuflocken, ein Erfordernis, das zumeist mit zusätzlichen Virusverlusten verbunden ist (34). Schliesslich müssen häufig ebenfalls angereicherte Enzyminhibitoren bzw. zelltoxische Substanzen durch Reinigung der Viren bzw. der viralen Nukleinsäuren entfernt werden (35).

Das Spektrum der enterischen Viren, die mit Wasser übertragen werden können, ist relativ gross (Tabelle 2). Am besten untersucht sind die Enteroviren, einschliesslich Hepatitis-A-Virus (HepAV), und die Rotaviren. Den in der Tabelle 2 aufge-

Tabelle 2. Enterische Viren des Menschen, die häufig in Wasser festgestellt werden

Virusgruppe	Serotypen	Partikeldurchmesser	Art der Nukleinsäure	Krankheit
Enterovirus				
Poliovirus	3	25 ¹	ss(+)RNA ²	(Kinder-) Lähmung
Coxsackievirus				
A	24	25	ss(+)RNA	Myokarditis
B	6	25	ss(+)RNA	Myokarditis
Echovirus	34	25	ss(+)RNA	Meningitis
Enterovirus	4	25	ss(+)RNA	Enteritis, Konjunktivitis
Hepatovirus				
HepAV	1	25	ss(+)RNA	Hepatitis
Calicivirus				
Calicivirus	1	27	ss(+)RNA	Gastroenteritis
Norwalk agent	5	25	ss(+)RNA	Gastroenteritis
HepEV	1	27	ss(+)RNA	Hepatitis
Astrovirus	4	27	ss(+)RNA	Gastroenteritis
Adenovirus	2	75	ds(-)DNA	Gastroenteritis
Reovirus				
Reovirus	3	90	ds(-)RNA	Unbekannt (orphan)
Rotavirus	7	90	ds(-)RNA	Gastroenteritis

¹ Nanometer, nm

² Einzelstrang (ss), Doppelstrang (ds), virale Nukleinsäure funktioniert als mRNA (+), virale Nukleinsäure muss zunächst transkribiert werden (-).

fürten Viren ist die relative Kleinheit, das Fehlen einer Hülle und die ikosaederförmige Struktur des Kapsids, die den Viren eine verhältnismässig grosse Tenazität verleiht, gemeinsam. Beim Nachweis der RNA-Viren mittels PCR muss in einem vorangestellten Arbeitsschritt immer eine komplementäre DNA (cDNA) durch Verwendung einer reversen Transkriptase synthetisiert werden. Anschliessend folgen die enzymatische DNA-Amplifikation und die Identifikation des Amplifikationsproduktes. Ausgesuchte Abschnitte des ersten Amplifikationsproduktes werden häufig in einer zweiten PCR-Runde amplifiziert. Dieser Schritt verbessert die Empfindlichkeit des Nachweises und dient gleichzeitig der Bestätigung des primär erzielten Untersuchungsergebnisses. Der Umstand, dass die meisten Enteroviren am 5'-Ende der RNA eine etwa 700 Basen umfassende, nicht translatierte Sequenz mit teilweise stark konservierten Regionen aufweist, wurde für das Design von Primern genutzt, mit deren Hilfe die meisten Enterovirus-Serotypen erfasst und teilweise weitergehend typisiert werden können (36–38).

Der Umstand, dass die Caliciviren und Astroviren des Menschen bisher nicht *in vitro* gezüchtet werden konnten, hat die Entwicklung von Gensonden für deren Nachweis verzögert. Moderne Klonierungs- und Sequenzierungstechniken werden hier jedoch zunehmend für die Entwicklung nützlicher Werkzeuge für den Nachweis dieser Viren herangezogen (39, 40). Die 3 Serotypen von Reovirus sind bei Mensch und Tier weit verbreitet. Obwohl klinisch von untergeordneter Bedeutung (*respiratory, enteric, orphan*) kommt dieser Virusgruppe eine umweltrelevante Indikatorfunktion zu, da sie in verschiedenen Wasservorkommen auffallend häufig festgestellt werden (41). Rotaviren werden aufgrund antigenetischer Merkmale des Kapsidproteins VP6 in verschiedene Serogruppen unterteilt. Von klinischer Bedeutung sind insbesondere die Viren der Gruppe A, bei der 14 Serotypen unterschieden werden (Tabelle 3). Wie bereits ausgeführt, weisen auch die Rotaviren eine weitreichende Speziesspezifität auf, wengleich diese Eigenschaft nicht absolut ist (42).

Tabelle 3. Wirtsspektrum der 14 bekannten Serotypen der Rotaviren der Gruppe A

Serotyp	Hauptwirt	Nebenwirte
1	Mensch	Rind
2	Mensch	Rind
3	Mensch	Rind, Schwein, Pferd, Hund, Katze und andere
4	Mensch	Schwein
5	Schwein	Pferd
6	Rind	Mensch
7	Geflügel	
8	Mensch	
9	Mensch	
10	Rind	Mensch
11	Schwein	Rind
12	Mensch	
13	Pferd	
14	Pferd	

Beim Nachweis von Rotaviren in Umweltproben messen wir der auch mit PCR möglichen Virustypisierung (43) eine Bedeutung für die Aufdeckung von Kontaminationsquellen zu (Landwirtschafts- und Siedlungsabwässer). Hier ist es möglich, durch Amplifikation ausgewählter Sequenzen des für das Kapsidproteins VP7 kodierenden Gensegmentes entsprechende Informationen zu bekommen.

Mit den heute zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Nachweismethoden für enterische Viren sind die Ergebnisse innerhalb kurzer Zeit zu erhalten. Dieser Umstand findet seinen Niederschlag in einer stetig wachsenden Zahl von Publikationen, die über viruskontaminierte Umweltproben (Wasser, Schalentiere) berichten. In der Schweiz fanden *Gilgen et al.* (44) mit Hilfe der PCR in sieben von 40 untersuchten Oberflächengewässern Enteroviren. Diese vorerst bedenklich erscheinende Feststellung muss im Lichte einer objektiven Risikobeurteilung weitergehend überprüft werden. Es wird insbesondere notwendig sein, den Virusnachweis quantitativ zu führen und gleichzeitig aufzuzeigen, ob mit den nachgewiesenen Viren eine Infektiosität verbunden ist. Der letztgenannte Aspekt wird durch neuere Befunde deutlich, wonach Poliovirus nach desinfektionsbedingtem Infektiositätsverlust mit molekularbiologischen Methoden während einer gewissen Zeit nachweisbar bleibt (45, 46). Gegenwärtig bieten sich für den Nachweis infektiöser Viren ausschliesslich Zellkultursysteme, allenfalls Versuchstiermodelle an.

Nachweis enterischer Viren in Wasservorkommen der Schweiz

Bei unseren Bemühungen des Virusnachweises in Wasser konzentrierten wir uns auf drei methodische Aspekte. Zunächst war eine neue, einfache und billige Methode für das Aufkonzentrieren von Viren in Wasserproben zu entwickeln (47), sodann war die PCR für den diagnostischen Schritt zu etablieren und schliesslich sollten Zellkulturen herangezogen werden, um auch infektiöses Virus nachweisen zu können.

Im Laboratorium wurden Wasserproben (1 l) in abnehmenden Konzentrationen entweder mit Poliovirus, Rotavirus oder HepAV kontaminiert. Nach Konditionierung mit 0,5 mM AlCl_3 wurde mit Eisessig angesäuert (pH-Wert 3,5) und 0,2 ml einer Aufschwemmung von SiO_2 zugegeben. Anschliessend rührte man die Proben während 20 min, zentrifugierte kurz und wusch die sedimentierte SiO_2 -Matrix mit konditioniertem Wasser. Danach behandelte man die gewaschene Matrix mit einem Guanidinium-Isothiozyanat (GIT) enthaltenden Lysispuffer. Die bei diesem Schritt freiwerdenden Nukleinsäuren binden unter den angewandten Bedingungen an die SiO_2 -Matrix, während Proteine in Lösung gehen und solchermaßen aus dem Ansatz entfernt werden können. Die viralen Nukleinsäuren können nunmehr mit Wasser eluiert und nachfolgend mit Hilfe von reverser Transkription und PCR amplifiziert werden. Die primären PCR-Produkte identifizierte man in mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen. Eine zweite «semi-nested» PCR-Runde mit dem primären Amplifikationsprodukt bezweckte einerseits die Verbesserung der

Sensitivität und andererseits die Bestätigung der Spezifität der ersten PCR-Runde. Mit Hilfe des angeführten Verfahrens gelang es, jeweils zwischen 0,1 und 10 infektiöse Einheiten der verwendeten Viren nachzuweisen. Die Überprüfung der entwickelten Methode an Umweltproben mit einem hohen Anteil an Schwebstoffen (geklärtes Abwasser) bestätigte die Brauchbarkeit des neuen Verfahrens, indem auch hier kleinste zugesetzte Virusmengen erfolgreich nachgewiesen werden konnten.

In den Sommer- und Herbstmonaten des Jahres 1995 wurden nunmehr unterschiedliche Wasservorkommen mit Hilfe der angeführten Methodik auf das Vorhandensein enterischer Viren, insbesondere von Enteroviren und Rotaviren, untersucht (Tabelle 3). Die definitive Beurteilung der grossen Anzahl positiver Befunde muss weitergehenden Risikoabklärungen überlassen bleiben. Während die nachgewiesenen Enteroviren, wegen der Spezifität der benutzten Primer, menschlichen Ursprungs sein müssen, kann über den Ursprung der Rotaviren vorläufig noch nichts Abschliessendes ausgesagt werden. Überraschend hoch fielen die positiven Ergebnisse in Grundwasservorkommen aus. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass die Viren wegen deren Kleinheit natürliche Bodenfilter leicht passieren (v.a. in Karstgebieten) und ausserdem in bakterienarmen Böden eine vergleichsweise geringe Inaktivierung erfahren.

Tabelle 4. Nachweis enterischer Viren in Wasservorkommen der Nordostschweiz

Gewässerart	Enteroviren	Rotaviren
Flüsse, Seen, Weiher	6/18 ¹	7/18
Gereinigtes Abwasser	7/ 8	7/ 7
Grundwasser	6/ 9	9/ 9
Brunnen	2/ 4	3/ 4
Total	21/39 (54%)	26/38 (68%)

¹ Anzahl mit Virusnachweis/Anzahl untersucht.

Gegenwärtig intensivieren wir unsere Bemühungen, infektiöse Viren aus Umweltproben durch Verwendung von Zellkulturen nachzuweisen. Hierdurch sollen die mit molekularbiologischen Methoden erzielten Screening-Ergebnisse objektiviert werden. Die Umsetzung dieser Absicht wird dadurch erschwert, dass bisher keine Zelllinien bekannt sind, die das ganze Spektrum der enterischen Viren abdecken. Erfreulicherweise haben die bisherigen Erfahrungen gezeigt, dass das beim Einsatz von Zellkulturen häufig auftretende Problem der Toxizität von Umweltproben mit der praktizierten Virusaufkonzentrierungsmethode ausgeschaltet werden kann. In einer beschränkten Anzahl von Versuchen ist es bisher gelungen, Reo- und Rotaviren in Wasserproben aus einem Vorfluter durch Verwendung von Zellkulturen nachzuweisen.

Ausblick

Mit der Etablierung eines Instrumentariums für den qualitativen Nachweis enterischer Viren und Parasiten in Wasser sind erste Voraussetzungen für die Durchführung von Felduntersuchungen erfüllt. Auf der Grundlage gezielter Untersuchungen ist es nunmehr möglich, lokal gültige Risikobeurteilungen voranzutreiben. Es ist absehbar, dass zumindest der Nachweis enterischer Viren mit Hilfe der neuen und einfach durchzuführenden molekularbiologischen Methoden auch in das Analysenangebot öffentlicher und privater Dienstleistungsbetriebe aufgenommen werden kann. Eine Zusammenarbeit zwischen spezialisierten Einrichtungen erscheint jedoch angebracht, da bei positiven Screening-Befunden der Nachweis bestehender Infektionspotentiale wünschbar erscheint. Zukünftige Forschungsaktivitäten werden sich mit dem quantitativen Nachweis der gesuchten Krankheitserreger und deren Infektionspotential sowie mit der weiteren Suche nach geeigneten chemisch-physikalischen Parametern für die mikrobiologisch-hygienische Beurteilung von Wasservorkommen auseinandersetzen müssen.

Dank

Für finanzielle Unterstützung danken die Autoren dem Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), dem Bundesamt für Veterinärwesen (BVet), der Hermann-Klaus-Stiftung in Zürich, der Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich, dem Schweiz. Verein des Gas- und Wasserfaches, der Wasserversorgung Zürich sowie dem Schweiz. Nationalfonds (5002-038280).

Zusammenfassung

In der Nordostschweiz wurden verschiedene Gewässerarten auf das Vorkommen pathogener Parasiten (*Giardia* und *Cryptosporidium*) und enterischer Viren (Enteroviren, Rotaviren) untersucht. Dabei wurden einige der gesuchten Krankheitserreger nicht nur in verschiedenen Oberflächengewässern, sondern auch in Grundwasservorkommen und in Trinkwasser festgestellt. Das Kernstück der laufenden Arbeiten bestand in der Erarbeitung einfacher, sensitiver und spezifischer Methoden für die Probenvorbereitung (Konzentrierung, Reinigung) sowie die Identifikation der gesuchten Krankheitserreger. Danach sollten ausgesuchte Wasserproben mit Hilfe der etablierten Techniken auf das Vorkommen der gesuchten Kontaminanten untersucht werden. Die vorliegende Publikation behandelt in einem ersten Teil die grundsätzlichen Erfordernisse für die Durchführbarkeit von Risikobeurteilungen bei mit Krankheitserregern kontaminiertem Wasser. Dabei werden im Ausland gemachte Erfahrungen zur Veranschaulichung des Sachverhaltes herangezogen. Der zweite Teil der Arbeit widmet sich den spezifischen Eigenschaften der bekanntesten, mit Wasser übertragenen Krankheitserreger. Schliesslich werden erzielte diagnostische Verbesserungen aufgezeigt und die Ergebnisse der bisherigen Felduntersuchungen diskutiert.

Résumé

La présence de parasites pathogènes (*Giardia* et *Cryptosporidium*) et de virus entériques (entérovirus, rotavirus) a été recherchée dans plusieurs types d'eau du nord-est de la Suisse. Quelques-uns des agents infectieux recherchés ont été trouvés non seulement dans différentes eaux de surface, mais aussi dans la nappe phréatique et dans l'eau de boisson. L'idée maîtresse des travaux était d'établir des méthodes simples, sensibles et spécifiques pour la préparation des échantillons (concentration, purification) et pour l'identification des agents infectieux recherchés. Puis, dans un deuxième temps, d'analyser au moyen des techniques établies un choix d'échantillons d'eau quant à la présence des contaminants précités. La présente publication traite dans sa première partie des conditions fondamentales permettant la praticabilité de l'évaluation des risques de l'eau contaminée par des agents infectieux. Pour l'illustration de la situation, on a eu recours à des expériences faites à l'étranger. La deuxième partie du travail traite des propriétés spécifiques des agents infectieux les plus connus transmis par l'eau. Pour finir, les résultats obtenus pour l'amélioration du diagnostic sont présentés et les résultats des essais sur terrain sont discutés.

Summary

Different water sources, located in the north-eastern part of Switzerland, were evaluated with respect to the occurrence of pathogenic parasites (*Giardia* and *Cryptosporidium*) and enteric viruses (enteroviruses, rotaviruses). Some of these agents were found not only in different surface water types but also in groundwater, and even in drinking water. The primary task of the ongoing study was the establishment of simple, sensitive and specific procedures for sample preparations (concentration, purification) and identification of the target agents. Established methods were then to be used for the effectuation of field studies. The first part of the article focusses on those informations that are necessary to effectuate meaningful health risk assessments with results from field studies. This topic is treated by using relevant published data from another country. The second part reviews specific properties of those infectious agents that are best known as waterborne disease inducing agents. This is followed by a presentation of achieved diagnostic improvements and a discussion of the results from the preliminary field studies.

Literatur

1. *Anonym*: Richtlinie des Rates vom 15. Juli 1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EWG). Amtsblatt der europ. Gemeinschaft vom 30. August, Nr. L 229/11 (1980).
2. *Anonym*: Richtlinie des Rates vom 05. 2. 1975 über die Qualität der Badegewässer (76/160/EWG). Amtsblatt der europ. Gemeinschaft vom 8. Dezember, Nr. L 31/1 (1975).
3. *Anonymous*: Drinking water: national primary drinking water regulations: filtration, disinfection, turbidity, *Giardia lamblia*, viruses, Legionella, and heterotrophic bacteria. Federal Register **54**, 27486–27541 (1989).
4. *Botzenhart, K.*: Die Beherrschung mikrobiologischer Belastungen bei der Oberflächenwasseraufbereitung nach der SWTR (USA). gwf-Wasser/Abwasser **135**, 201–206 (1994).

5. Metzler, A.: Arbeitsgruppe für Umwelthygiene: Porträt der interdisziplinären Fachgruppe der Institute für Veterinär bakteriologie, Parasitologie und Virologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich. *Swiss Vet.* **12/10**, 5–12 (1995).
6. Moor, A.C., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Highsmith, A.K. and Juranek, D.D.: Surveillance for waterborne disease outbreaks – United States, 1991–1992. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **42**, 1–22 (1993).
7. Edwards, D.D.: Troubled waters in Milwaukee. *ASM News* **59**, 342–345 (1993).
8. Mackenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and Davis, J.P.: A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *New Engl. J. Med.* **331**, 161–167 (1994).
9. Dupond, H.L., Chappel, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B. and Jakubowski, W.: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New Engl. J. Med.* **332**, 855–859 (1995).
10. Ward, R.L. and Akin, E.W.: Minimum infective dose of animal viruses. *CRC Critical Rev. Environ. Control* **14**, 297–310 (1984).
11. Anonymous: Human viruses in water, wastewater and soil. WHO Tech. Rep. Series 639 (1979).
12. Eckert, J., Jacquier, P. und Weber, R.: Intestinale Protozoen – neue Aspekte. *Internist* **31**, 386–398 (1990).
13. Taminelli, V. und Eckert, J.: Häufigkeit und geographische Verbreitung des Giardia-Befalles bei Wiederkäuern in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **131**, 251–258 (1989).
14. Anonymous: Parasitic zoonoses. WHO Tech. Rep. Series 637 (1979).
15. Hibler, C.P. and Hancock, C.M.: Waterborne giardiasis. In: McFeters, G.A. (ed.), *Drinking water microbiology. Progress and recent developments*, pp. 271–293. Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg 1990.
16. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Trussell, R.R. (eds.): *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 17th ed., pp. 9/196–9/203. Am. Public Health Assoc., Washington, DC 1989.
17. Rose, J.B., Landeen, L.K., Riley, K.R. and Gerba, C.P.: Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3189–3196 (1989).
18. Spillmann, S.K., Eckert, J., Merk, W. und Frey, R.: Zum Vorkommen von Cryptosporidien bei Kälbern in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **128**, 111–118 (1986).
19. Rose, J.B.: Occurrence and control of *cryptosporidium* in drinking water. In: McFeters, G.A. (ed.), *Drinking water microbiology. Progress and recent developments*, pp. 294–321. Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg 1990.
20. Rose, J.B., Gerba, C.P. and Jakubowski, W.: Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ. Sci. Tech.* **25**, 1393–1400 (1991).
21. LeChevallier, M.W., Norton, W.D. and Lee, R.G.: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2610–2616 (1991). Published erratum in *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 780 (1992).
22. LeChevallier, M.W., Norton, W.D. and Lee, R.G.: *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2617–2621 (1991).
23. LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G. and Rose, J.B.: *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies. Am. Water Works Assoc. Res. Found., Denver, CO, USA 1991.

24. Regli, W.: Verbesserte Methoden für die Isolierung und den Nachweis von Giardia-Zysten und Cryptosporidium-Oozysten in Oberflächengewässern: Flockung mit $Al_2(SO_4)_3$ und fluorescence-activated cell sorting (FACS). Vet. Med. Diss., Universität Zürich 1994.
25. Payment, P. and Franco, E.: *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 2418–2424 (1993).
26. Vesev, G., Slade, J.S., Byrne, M., Shepherd, K. and Fricker, C.R.: A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. J. Appl. Bacteriol. **75**, 82–86 (1993).
27. Aldom, J.E. and Chagla, A.H.: Recovery of cryptosporidium oocysts from water by a membrane filter dissolution method. Letters Appl. Microbiol. **20**, 186–187 (1995).
28. Vesev, G., Hutton, P., Champion, A., Ashbolt, N., Williams, K.L., Warton, A. and Veal, D.: Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. Cytometry **16**, 1–6 (1994).
29. Regli, W., Niederer, E. und Metzler, A.: Giardien und Cryptosporidien in Wasserproben: eine neue Nachweismethode. gwf-Wasser/Abwasser **136**, 182–136 (1995).
30. Johnson, D.W., Pieniazek, N.J., Griffin, D.W., Misener, L. and Rose, J.B.: Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3849–3855 (1995).
31. Tougianidou, D. und Botzenhart, K.: Neue Verfahren zur Virusdetektion in Wasser. gwf-Wasser/Abwasser **134**, 653–659 (1993).
32. Montandon, P.E.: Utilisation de la méthode PCR pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans l'eau. Schweiz. Rundschau Med. (PRAXIS) **83**, 630–637 (1994).
33. Berg, G. (ed.): Methods for recovering viruses from the environment. CRC Press Inc., Florida, USA 1987.
34. Rao, V.C.: Reconcentration of viruses from primary eluates. In: Berg, G. (ed.), Methods for recovering viruses from the environment, pp. 109–126. CRC Press Inc., Florida, USA 1987.
35. Schwab, K.J., De Leon, R. and Sobsey, M.D.: Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 531–537 (1995).
36. Rotbart, H.A.: Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J. Clin. Microbiol. **28**, 438–442 (1990).
37. Egger, D., Pasamontes, L., Ostermayer, M. and Bienz, K.: Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. J. Clin. Microbiol. **33**, 1442–1447 (1995).
38. Le Guyader, F., Apaire-Marchais, V., Brillet, J. and Billaudel, S.: Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 3963–3968 (1993).
39. Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K.: Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3014–3018 (1995).
40. Jonassen, T.O., Monceyron, C., Lee, T.W., Kurtz, J.B. and Grinde, B.: Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Meth. **52**, 327–334 (1995).

41. *Tougianidou, D.*: Vorkommen von enteralen Viren in Wasser unterschiedlicher Herkunft und deren Nachweis über cytologische und molekularbiologische Methoden. Naturwissenschaftliche Dissertation, Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1992.
42. *Nakagomi, O. and Nakagomi, T.*: Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiol. Immunol.* **37**, 337–348 (1993).
43. *Gouvea, V., Santos, N. and Carmo Timenetsky, M.*: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1338–1340 (1994).
44. *Gilgen, M., Wegmüller, B., Burkhalter, P., Bühler, H.-P., Müller, U., Lüthy, J. and Candrian, U.*: Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1226–1231 (1995).
45. *Ma, J.-F., Straub, T.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P.*: Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4203–4206 (1994).
46. *Moore, N.J. and Margolin, A.B.*: Efficacy of nucleic acid probes for detection of poliovirus in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone, and uv radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4189–4191 (1994).
47. *Leisinger, M. and Metzler, A.*: Use of SiO₂ to concentrate enteric viruses from water and to prepare viral nucleic acids for detection by reverse transcription PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted 1995).

PD Dr. med. vet. Alfred Metzler
Arbeitsgruppe für Umwelthygiene
Veterinär-medizinische Fakultät
Winterthurerstrasse 204
CH-8057 Zürich