

Mikrobiologische Untersuchung von See- und Flussbädern des Kantons Bern auf ausgewählte enteropathogene Viren und Escherichia coli = Microbial examination of recreational waters in the canton of Berne with respect to viruses and bacteria

Autor(en): **Gilgen, Michael / Lüthy, Jürg / Häfliger, Daniel**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **88 (1997)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982329>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Mikrobiologische Untersuchung von See- und Flussbädern des Kantons Bern auf ausgewählte enteropathogene Viren und *Escherichia coli*

Microbial Examination of Recreational Waters in the Canton
of Berne with Respect to Viruses and Bacteria

Key words: Enteric virus, *E. coli*, RT-PCR, Surface water, Culture

Michael Gilgen^a, Jürg Lüthy^a, Daniel Häfliger^a, Hans-Peter Bühler^b,
Urs Müller^b, Daniel Germann^c und Philipp Hübner^a

Einleitung

Enteropathogene Viren werden vom Menschen oral aufgenommen, vermehren sich im Gastrointestinaltrakt und werden über den Stuhl wieder ausgeschieden. Sie sind daher im Abwasser vorhanden und können direkt oder über Abwasserkläranlagen, welche nicht in der Lage sind, die Viren zu eliminieren, in die Gewässer gelangen (1, 2). Die Gefahr von in Gewässern vorkommenden Darmviren besteht vor allem darin, dass Trinkwasserreserven kontaminiert werden könnten (3–5). Für Trinkwasserfassungen in allernächster Nähe von Gewässern besteht vor allem während starken Regenfällen oder Überschwemmungen eine erhöhte Gefahr, mit pathogenen Viren verschmutzt zu werden. Die weltweite Beschränkung der Trinkwasserressourcen führt dazu, dass vermehrt auf Oberflächenwasser zurückgegriffen werden muss. Die zugesetzten Mengen an Desinfektionsmitteln (wie z. B. Chlor), welche bakterielle Erreger effizient abtöten, vermögen die teilweise sehr stabilen Darmviren oft nicht zu eliminieren (6, 7). Wichtige enteropathogene Viren sind Enteroviren (EV), welche Erkrankungen des Zentralnervensystems hervorrufen können (8), Hepatitis-A-Viren (HAV) (9), Hepatitis-E-Virus (HEV) (10) und die hauptsächlich für klassische Gastrointestinalerkrankungen verantwortlich

^a Laboratorium für Lebensmittelchemie, Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern

^b Kantonales Laboratorium Bern

^c Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Bern

zeichnenden small round structured Viren (SRSVs) (11), Gruppe-A-Rotaviren (12), Astroviren (13) sowie mindestens zwei Adenoviren-Species (14). Eine Übertragung von Viren durch kontaminiertes Wasser ist für EV, HAV, HEV, SRSVs, Astro- und Rotaviren dokumentiert (5).

Die zu dem Genus Calicivirus gehörenden SRSVs waren 1972 mit dem Norwalk Virus erstmals beschrieben worden (15). SRSVs sind die wichtigsten Verursacher von akuter, epidemischer nichtbakterieller Gastroenteritis bei Erwachsenen und älteren Kindern. In den USA weisen 5% der Kinder im Alter von 5 Jahren Antikörper gegen SRSVs auf, bei den 35jährigen sind 45% und bei den 65jährigen rund 60% seropositiv (16). Das Studium der SRSVs wurde erschwert durch die geringe Zahl von Virus-Partikeln im Stuhl (nur rund 10^5 – 10^6 Partikel pro Gramm (17)) sowie durch das Fehlen eines *in vitro* Kultivierungssystems. Kürzlich wurde die Gruppe der SRSVs in zwei verschiedene Genotypen unterteilt (18).

Im Gegensatz zu der bakteriologischen Kontrolle der Wasserqualität, welche von den kantonalen Untersuchungsbehörden regelmässig durchgeführt wird, herrscht bei der virologischen Kontrolle noch ein grosser Nachholbedarf. Zur Beurteilung von Trinkwasser existiert die Richtlinie der EG, welche besagt, dass in 1000 l Trinkwasser keine Krankheitserreger nachweisbar sein sollten (19). Dieses grosse Volumen soll vor allem dazu dienen, auch sehr geringe Mengen an Viren, welche zu einer «low-level-exposure» der Bevölkerung führen, aufzuspüren. In einer weiteren EG-Vorschrift betreffend die mikrobiologische Qualität natürlicher Badegewässer wird verlangt, dass in 10 l Wasser keine Enteroviren vorhanden sein dürfen (20). Routinemässig wird das Trink- oder Badewasser in der gängigen Praxis nicht auf die Anwesenheit enteropathogener Viren untersucht. Dies sicher auch weil ein zu untersuchendes Trinkwasservolumen von 1000 Litern für die Routineanalytik unpraktikabel ist. Im Gegensatz zum Trinkwasser, das keine krankheits-erregenden enterischen Viren enthalten sollte, ist beim Badewasser eine Virenfreiheit weder zu erreichen noch anzustreben. Über die Verbreitung enteropathogener Viren in Schweizer Oberflächengewässern stehen nur wenige Daten zur Verfügung (21–23). Es müssen somit einerseits einfache Methoden entwickelt werden, die einen möglichst schnellen praktikablen Nachweis enteropathogener Viren erlauben, andererseits sollten Abklärungen über die Verbreitung sowie die medizinische Bedeutung von in Wasser nachgewiesenen Viren durchgeführt werden. Gerade bei der Wahl der Analysenmethode bieten sich neuerdings molekularbiologische Verfahren wie etwa die «reverse transcription polymerase chain reaction» (RT-PCR) an, welche auch die Detektion von momentan noch nicht kultivierbaren Viren, wie z. B. den SRSV, ermöglicht. Neben hoher Sensitivität und Spezifität weist diese Methode aber den Nachteil auf, dass das Infektionspotential von PCR-detektierten Viren nicht beurteilt werden kann. Ähnlich wie bei den bakteriellen Erregern stellt sich die Frage, ob es sich bei den mittels RT-PCR detektierten Viren nicht zumindest teilweise um durch Umwelteinflüsse geschädigte Viren handelt, welche die Fähigkeit, eine Infektion zu verursachen, verloren haben. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde ermittelt, dass auf ein infektiöses Viruspartikel unter Umständen hunderte bis tausende nichtinfektiöser Partikel vorkommen (24).

In den vergangenen Jahren wurden in der Schweiz verschiedene Studien publiziert, welche die Detektion von Viren in Oberflächenwasser beschrieben. Während *Gilgen et al.* (23) den Nachweis von Enteroviren und *Metzler et al.* (21) den Nachweis von Enteroviren und Rotaviren mit PCR beschrieben, beschäftigte sich *Guyer* (22) mit dem kulturellen Nachweis von enteropathogenen Viren in der Nähe von Kläranlagen, wobei der Nachweis sowohl von Enteroviren als auch von Rotaviren möglich war.

Als gemeinsames Projekt des Labors für Lebensmittelchemie der Universität Bern, des Kantonalen Laboratoriums Bern sowie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bern wurden Proben aus natürlichen Badegewässern des Kantons Bern auf die Anwesenheit von Enteroviren, Hepatitis-A-Virus und SRSVs mit RT-PCR, Enteroviren mittels Kultivierung sowie *E. coli* gemäss den Empfehlungen des BAG für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern untersucht. Dabei interessierte vor allem die Verbreitung der verschiedenen enteropathogenen Viren, der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Viren und Bakterien sowie die Kultivierung der mittels RT-PCR nachgewiesenen Enteroviren.

Material und Methoden

Wasserproben

Am 15. und 16. Juli 1996 wurden vom Kantonalen Laboratorium Bern während der mikrobiologisch-hygienischen Routinekontrolle von natürlichen öffentlichen Badegewässern 27 Wasserproben (je 1 Liter) für virologische Untersuchungen erhoben. Die Proben wurden in sterilen 1-l-Gefässen gesammelt und bis zur Analyse über Nacht bei + 4 °C gelagert. Als Negativkontrolle wurde Hahnenwasser aus dem Labor für Lebensmittelchemie verwendet.

Aufkonzentrierung der Viren

Die Isolation und Aufkonzentrierung der enteropathogenen Viren wurde mit einer im Labor für Lebensmittelchemie der Universität Bern entwickelten Methode durchgeführt (25). Das Flussdiagramm des Isolationsprotokolls ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach einer Klärung der Wasserprobe mittels Vorfiltration über einen Borosilikatfilter (Millipore AP 2504700) wurden die Viren an eine positiv geladene Membran (Zetapor Membran, AMF-Cuno NM047-01-045SP) adsorbiert. Die Elution der Viren fand anschliessend durch Schwenken des Filters in 3 ml 50 mM Glycinpuffer (pH 9,5), enthaltend 1% beef extract, statt. Nach pH-Neutralisierung mit 1 M HCl wurden 2 ml des Eluates mit Hilfe der Ultrafiltration (Centricon-100, Amicon Inc.) auf rund 140 µl eingengt und mit PBS auf 180 µl ergänzt. 30 µl davon

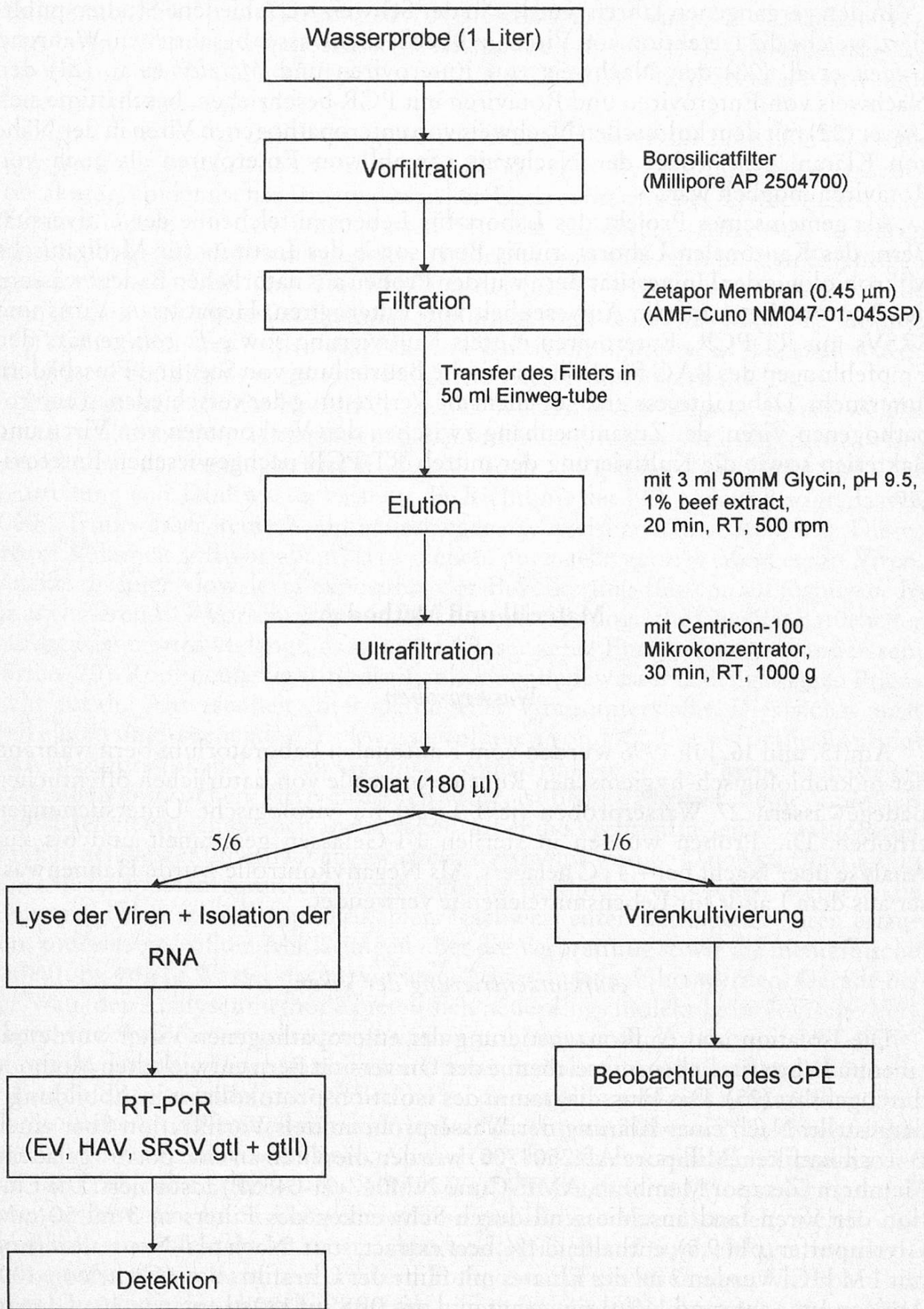


Abb. 1. Flussdiagramm des Isolationsprotokolls für enterische Viren

wurden für die EV-Kultivierung auf Zellkultur verwendet, die in den restlichen 150 µl vorhandenen Viren wurden mit dem QIAamp HCV kit (Qiagen) aufgeschlossen.

Reinigung der viralen RNA

Nach Aufschluss der im Isolat enthaltenen Viren muss die virale RNA aufkonzentriert und von Substanzen, wie z. B. Huminsäuren, welche die nachfolgenden Enzymreaktionen hemmen könnten, gereinigt werden. Für diesen Zweck wurde der QIAamp HCV kit gemäss Angaben des Herstellers eingesetzt. Die gereinigte RNA wurde in 80 µl mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem (DEPC) Wasser eluiert, lyophilisiert und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Für eine reverse Transkriptionsreaktion wurden 10 µl dieser RNA-Lösung eingesetzt.

Virendetektion mittels RT-PCR

Die Wasserproben wurden auf die Anwesenheit von EV, HAV, SRSV Genotyp I (gtI) und II (gtII) geprüft. In einem Endvolumen von 20 µl wurde je ein Aliquot der RNA (10 µl) mit den Primern EV03, HAV1, SRI-1 oder SRII-1 während einer Stunde bei 41 °C in cDNA überschrieben. Der Reaktionsmix bestand dabei aus 1X RT-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0,5 mM dNTP-mix, 1,25 µM antisense Primer wie oben angegeben, 0,5 U/µl RNasin (Promega, Madison, WI) sowie 5 U/µl M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, wurden für die darauffolgenden PCR-Reaktionen «nested» (HAV) bzw. «semi-nested» (EV, SRSV gtI und gtII) PCR-Systeme verwendet. Die verwendeten Primer, MgCl₂-Konzentrationen, Annealing-Temperaturen sowie entstehende Produktlängen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die gesamte RT-Reaktion (20 µl) wurde anschliessend mit 80 µl PCR-Mix (Endkonzentration: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100, 2 µg/ml BSA, 200 µM each dNTP, MgCl₂ gemäss Tabelle 1, 2 U *Taq* Polymerase (Promega) sowie 0,25 µM des entsprechenden Primerpaares) vermischt und mit 80 µl Mineralöl überschichtet. Nach Vordenaturierung von einer Minute bei 95 °C wurden 25 Zyklen von 30 sec Denaturieren bei 95 °C, 60 sec Annealing bei 55 °C und 60 sec Extension bei 72 °C auf einem PHC-1 cycler (Techne) ausgeführt. 2 µl der ersten Reaktion wurden anschliessend in einen zweiten Mix mit dem inneren Primerpaar (je 0,5 µM) gegeben und während 30 Zyklen in einer zweiten Amplifikationsrunde vermehrt. Das Temperaturprogramm entsprach dabei ausser bei den beiden SRSV-Systemen (Annealing bei 50 °C) demjenigen, das bei der ersten PCR angewendet worden war. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die PCR-Produkte (20 µl) auf 1,5% Agarosegelen (enthaltend 1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt, unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

Tabelle 1. Primersequenzen, Produktelängen, MgCl₂-Konzentrationen sowie Annealing-Temperaturen der verwendeten nested bzw. semi-nested PCR-Systeme

Virus und Primer-Paar	Region	Produktelänge ^c	Primer	Polarität ^b	Sequenz 5'→3' ^a										Lokalisierung	MgCl ₂ -Konz. ^d	Annealing-Temp. ^d
<i>Enterovirus</i> EV03/EV06.1	5' UTR	438 bp	EV03	-	ATT	GTC	ACC	ATA	AGC	AGC	CA		601-582	3,5 mM	55°		
			EV06.1	+	CAA	GCA	CTT	CTG	TTT	CCC			164-184				
EV05.1/EV06.1		400 bp	EV05.1	-	CAC	GGA	CAC	CCA	AAG	TAG	T		563-547	3,0 mM	55°		
<i>Hepatitis A Virus</i> HAV4/HAV1	3D	412 bp	HAV4	-	ATT	CTA	CCT	GCT	TCT	CTA	ATC		6716-6696	3,0 mM	55°		
			HAV1	+	TTT	GGT	TGG	ATG	AAA	ATG	GTT		6305-6325				
HAV3/HAV2		233 bp	HAV3	-	ACC	AAC	ATC	TCC	GAA	TCT	TA		6648-6629	2,5 mM	55°		
			HAV2	+	CAA	CCT	GTC	CAA	AAG	ATG	AAT		6416-6436				
<i>SRSV genotyp I</i> SRI-1/SRI-2	capsid	316 bp	SRI-1	-	CCA	ACC	CAR	CCA	TTR	TAC	AT		5659-5640	3,5 mM	55°		
			SRI-2	+	AAA	TGA	TGA	TGG	CGT	CTA			5344-5361				
SRI-3/SRI-2		241 bp	SRI-3	-	AAA	AYR	TCA	CCG	GGK	GTA	T		5584-5566	2,0 mM	50°		
<i>SRSV genotyp II</i> SRII-1/SRII-2	RNA pol	514 bp	SRII-1	-	CGC	CAT	CTT	CAT	TCA	CAA	A		5357-5339	3,5 mM	55°		
			SRII-2	+	TWC	TCY	TTY	TAT	GGT	GAT	GAT	GA		4844-4866			
SRII-3/SRII-2		203 bp	SRII-3	-	TTW	CCA	AAC	CAA	CCW	GCT	G		5046-5028	1,5 mM	50°		

^a Gemischte Basen in degenerierten Primern: W = A/T, Y = C/T, K = G/T, R = A/G, dig = Digoxigenin

^b Polarität, -: negativ, +: positiv

^c Nukleotidpositionen und Produktelängen für EV, HAV und beide SRSVs Genotypen beziehen sich auf folgende Sequenzen: Poliovirus Sabin 3 (X00596), HAV strain 18F (M59808) und Norwalk Virus (M87661).

^d Die optimalen MgCl₂-Konzentrationen und Annealing-Temperaturen wurden experimentell ermittelt.

Virendetektion mittels Kultivierung

Der für den EV-Nachweis auf Zellkultur vorgesehene Teil des Isolates wurde mit PBS auf 200 µl ergänzt und anschliessend auf Vero und MRC-5 Zellen (human embryonic lung) inokuliert. Die Kulturen wurden während 10 Tagen bei 36 °C inkubiert und täglich optisch auf typische cytopathische Effekte (CPE) untersucht. CPE-positive Proben wurden mit dem Standard Melnick Antiseren-pool typisiert.

Bakteriennachweis

Die quantitative Bestimmung des Fäkalindikatorkeims *E. coli* wurde ausgehend von 100 ml Wasser nach den Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern durchgeführt (26).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Resultate wurde mit dem Vierfelder Chi-quadrat-Test vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die metrischen *E. coli*-Titer aufgrund der schweiz. Einteilung der Wasserqualität (26) in nominale Zahlen (Qualitäten A oder B) umgewandelt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ gesetzt.

Resultate

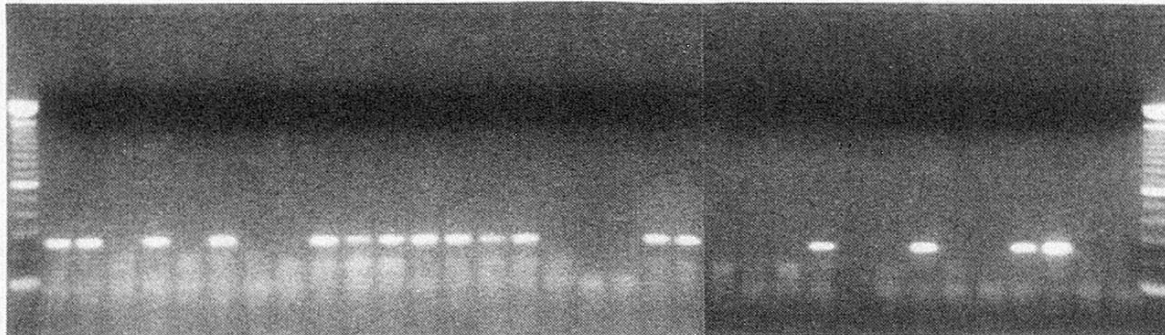
Nachweis von enteropathogenen Viren mittels RT-PCR

Die RNA der viralen Partikel, welche aus 1-l-Wasserproben der 27 Probenahmestellen gemäss der oben beschriebenen Methode (*Material und Methoden*) isoliert worden waren, wurde gereinigt und auf spezifische RT-PCR Reaktionen zum Nachweis von EV, HAV, SRSV gtI und SRSV gtII aufgeteilt. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt. Während an keinem der Probenahmeorte Hepatitis-A-Viren nachweisbar waren, konnte RNA von EV in 4 (15%), SRSV gtI in 15 (55%) (Abb. 2) und SRSV gtII in 8 (30%) Gewässern detektiert werden. Bei Zusammenfassung der beiden SRSV-Genotypen kamen RNAs dieser Viren in 16 der 27 (59%) Wasserproben vor.

Nachweis von Enteroviren mittels Kultivierung

Ein Sechstel der isolierten Virenpartikel aus jeder der 27 Wasserproben wurde auf Zellkultur gegeben und mittels Beobachtung des CPE auf Enteroviren getestet. Bei keiner der 27 inokulierten Kulturen konnte jedoch ein Wachstum von Entero-

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 L



Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit für SRSV gtI spezifischen RT-PCR-Produkten. Die Viren wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben isoliert und anschliessend mit RT-PCR nachgewiesen. Lanes: 1; Marzili; 2, Eichholz; 3, Belp; 4, Mühlethurnen; 5, Thun Schwäbis; 6, Münsingen; 7, Muri; 8, La Neuveville; 9, Erlach; 10, Vinelz; 11, Lüscherz; 12, Täuffelen; 13, Mörigen; 14, Sutz Lattrigen; 15, Ipsach; 16, Nidau; 17, Negativkontrolle der Isolation; 18, Biel; 19, Biel; 20, Tüscherz; 21, Twann; 22, Moossee; 23, Bern; 24, Spiez; 25, Bönigen; 26, Brienz; 27, Ringgenberg; 28, Unterseen; 29, Negativkontrolle der Isolation; 30, 31, Positivkontrollen von RT-PCR; 32, 33, Negativkontrollen von RT-PCR; L, 100 bp Längenstandard (Gibco BRL).

Abb. 2. Nachweis von SRSV gtI mittels RT-PCR in Proben aus See- und Flussbädern des Kantons Bern.

viren nachgewiesen, die Anwesenheit von Enteroviren bestätigt und eine Typisierung durchgeführt werden.

Bakteriologische Wasserqualität

Wie in Tabelle 2 ersichtlich, entsprach die Qualität bei 23 von 27 Probenahmestellen der Wasserqualität A sowie bei vier der Klasse B. Salmonellen waren nirgends nachweisbar.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung mit dem Vierfelder Chi-Quadrat-Test ergab keine Korrelation zwischen der bakteriellen Wasserqualität und dem Auftreten von Enteroviren ($p = 0,53$) beziehungsweise dem Auftreten von SRSV gtI/gtII ($p = 0,49$). Im weiteren konnte keine Abhängigkeit des Auftretens von Enteroviren mit derjenigen von SRSV gtI/gtII festgestellt werden ($p = 0,13$), hingegen korrelieren die Daten für SRSV gtI und SRSV gtII sehr gut ($p = 0,03$).

Diskussion

Im Sommer 1996 wurden 27 Proben aus Badegewässern des Kantons Bern im Rahmen einer Routinekontrolle durch das Kantonale Laboratorium Bern auf die

Tabelle 2. Nachweis von enteropathogenen Viren und *E. coli* in Badegewässern des Kantons Bern

Gewässer	Probenahmeort	Kultur von <i>E. coli</i> (CFU/100 ml)	Qualität*	RT-PCR-Resultate					Virenkultivierung
				EV	HAV	SRSV gtI	SRSV gtII	SRSV gtI/gtII	EV
Brienzersee	Bönigen	3	A	-	-	-	-	-	-
	Brienz	1	A	-	-	-	-	-	-
Thunersee	Spiez	3	A	-	-	+	-	+	-
	Unterseen	6	A	-	-	-	-	-	-
Aare	Eichholz	250	B	-	-	+	+	+	-
	Marzili	600	B	-	-	+	+	+	-
	Münsingen	80	A	-	-	+	+	+	-
Bielersee	Muri	19	A	+	-	-	-	-	-
	Thun Schwäbis	6	A	-	-	-	-	-	-
	Biel	24	A	-	-	-	+	+	-
	Biel	8	A	-	-	+	+	+	-
	Erlach	3	A	-	-	+	-	+	-
	Ipsach	14	A	-	-	+	+	+	-
	La Neuveville	360	B	+	-	-	-	-	-
	Lüscherz	0	A	-	-	+	-	+	-
	Mörigen	20	A	-	-	+	+	+	-
	Nidau	6	A	+	-	-	-	-	-
	Sutz	7	A	-	-	+	-	+	-
	Täuffelen	90	A	+	-	+	+	+	-
	Tüscherz	2	A	-	-	+	-	+	-
	Twann	3	A	-	-	-	-	-	-
	Vinelz	3	A	-	-	+	-	+	-
Lorrainebad	Bern	4	A	-	-	-	-	-	-
Giesse	Belp	45	A	-	-	-	-	-	-
Gürbe	Mühlethurnen	120	B	-	-	+	-	+	-
Moossee		22	A	-	-	-	-	-	-
Burgseeli	Ringgenberg	35	A	-	-	+	-	+	-
				4/27 (15%)	0/27 (0%)	15/27 (55%)	8/27 (30%)	16/27 (59%)	0/27 (0%)

* Bakteriologische Wasserqualität gemäss den Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern (26)

Anwesenheit von enteropathogenen Viren und *E. coli* untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Erprobung der im Labor für Lebensmittelchemie erarbeiteten Methode zum Nachweis von verschiedenen enteropathogenen Viren in Wasser unter Praxisbedingungen sowie der kulturelle Nachweis von EV, um einen Hinweis auf die Infektiosität der aufgefundenen EV zu erhalten. Zudem interessierte uns, ob ein Zusammenhang zwischen der bakteriologischen Wasserqualität und einer

viralen Kontamination besteht. Aufgrund der bakteriologischen Qualitätskriterien entsprachen nur 4 von den 27 Gewässerproben nicht der Qualitätsklasse A und mussten aufgrund ihrer erhöhten Keimzahl des Fäkalindikators *E. coli* mit der Qualitätsklasse B bewertet werden. Salmonellen waren in keiner Probe nachweisbar. Enterische Viren hingegen waren in 19 von 27 Proben nachweisbar, wobei EV in 4 von 27 und SRSV (beide Genotypen zusammengefasst) in 16 von 27 Proben mittels RT-PCR detektierbar waren. HAV konnte in keiner der Gewässerproben festgestellt werden. Da das Isolat aus einem Liter Wasser zur Kontrolle der viralen Wasserqualität auf verschiedene RT-PCR-Systeme aufgeteilt worden war und zusätzlich bei der Elution von der positiv geladenen Membran nur $\frac{2}{3}$ des Eluats weiterverwendet wurde, bezieht sich der Nachweis eines Genotypen (SRSV), einer Spezies (HAV) bzw. eines Genus (EV) nur auf rund 110 ml Wasser. Der kulturelle Nachweis von Enteroviren aus einem weiteren Sechstel des Isolates war hingegen nicht möglich, was auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein könnte. Entweder sind die Mengen des untersuchten Wassers für einen kulturellen Nachweis zu gering, oder die Viren wurden durch Umwelteinflüsse geschädigt, so dass ein Nachweis auf Zellkulturen deutlich erschwert sein dürfte. Für den kulturellen Nachweis von Viren aus Oberflächenwasser wurden bisher deutlich grössere Wassermengen bearbeitet (1, 22, 27). Zudem ist der kulturelle Nachweis im Vergleich zum Nachweis mittels RT-PCR um den Faktor 100 weniger sensitiv (25). Obwohl bei der RT-PCR der Nachweis von freier RNA anstelle von viralen Partikeln nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, erscheint uns dies im vorliegenden Fall unwahrscheinlich, da die Sensitivität für den Nachweis von freier viraler RNA verglichen mit derjenigen für intakte Virenpartikel (1 TCID_{50}) um den Faktor 1000 tiefer ist. Zudem wird RNA in Oberflächenwasser rasch abgebaut (28). Bei der Viren-Kultivierung stellt sich ähnlich wie bei den Bakterien (viable but non-culturable) die Frage, ob ein Virus, welches nicht auf Zellkultur vermehrt werden kann, für den Menschen unter Umständen trotzdem infektiös ist.

Im Hinblick auf die Verwendung eines universellen Indikators für die mikrobiologisch-hygienische Wasserqualität weist die statistische Auswertung unserer Resultate darauf hin, dass das Vorkommen von *E. coli* nicht mit demjenigen der untersuchten Viren korreliert. Daher ist – wie schon mehrfach dokumentiert – *E. coli* nicht als Indikatorkeim für die virologische Wasserqualität geeignet (29–31). Interessanterweise fanden wir auch keine Korrelation zwischen dem Auftreten von EV und demjenigen von SRSVs, wobei aufgrund der geringen Anzahl von EV-positiven Proben weitere Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung unternommen werden müssen. Über häufiges Vorkommen von EV in Oberflächengewässern ist schon mehrfach publiziert worden (21, 23, 25, 32–36), während Untersuchungen von SRSVs noch weitgehend fehlen. Diese Krankheitserreger sind 1972 zum ersten Mal identifiziert worden (15). In den letzten Jahren, nach der Bestimmung verschiedener Nukleotidsequenzen, wurden verschiedene «kleine, runde und strukturierte» Viren (small round structured virus) mit dem Norwalk Virus im Genus *Calicivirus* der Familie *Caliciviridae* zusammengefasst (11, 37–40). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen SRSVs konnten mittels RFLP-Analyse (41) verschie-

denen in der Datenbank EMBL vorhandenen SRSV-Prototypen zugeordnet werden.

Verschiedentlich sind badewasserassoziierte Gastroenteritis-Epidemien registriert worden (5). Es ist zu erwarten, dass in der nächsten Zeit mit der Entwicklung weiterer analytischer Methoden auch die Zahl der dokumentierten Ausbrüche oder Fälle deutlich zunehmen wird. Dabei stellt sich die Frage, wie die erzielten Analysenresultate von Wasserproben bezüglich der Gefährdung der Gesundheit zu beurteilen sind. Möglicherweise handelt es sich bei der Übertragung von enteropathogenen Viren mittels Badewasser um Einzelfälle, und nur selten wird über Ausbrüche mit einer grösseren Anzahl Erkrankter berichtet. Doch die in Oberflächenwasser vorkommenden Viren stellen eine potentielle Gefahr für Trinkwasserreserven dar, wodurch eine grosse Anzahl von Menschen gefährdet werden könnten.

Zweifelsohne haben molekularbiologische Methoden auch auf dem Gebiete der Umweltvirologie ein grosses Anwendungspotential. Vor allem bei den momentan nicht kultivierbaren Viren – wie etwa den SRSVs – ist die Anwendung der RT-PCR sowie weiterer neuer Techniken unumgänglich. Zu lösen bleiben die Probleme der Quantifizierung sowie der Beurteilbarkeit der Infektiosität der aufgefundenen Viren. Dazu fehlen jedoch vorläufig die nötigen Daten.

Dank

Wir danken *Christiane Höfelein* für die Durchführung der Viren-PCRs. Die Arbeit wurde durch den Kanton Bern finanziert. Für zusätzliche Unterstützung danken wir auch dem Migros-Genossenschafts-Bund.

Zusammenfassung

Eine neue Isolations- und Detektionsmethode für enteropathogene Viren wurde entwickelt und bei der Analyse von 27 Wasserproben aus See- und Flussbädern des Kantons Bern angewendet. Untersucht wurden die Proben dabei auf die Anwesenheit von Enteroviren, Hepatitis-A-Virus, und «small round structured Viren» mittels RT-PCR, Enteroviren mittels Kultivierung und *E. coli* gemäss den Empfehlungen des BAG für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern. An 15% (4/27) der untersuchten Stellen konnten Enteroviren, an 59% (16/27) «small round structured Viren» und an keiner (0/27) Hepatitis-A-Virus mit RT-PCR nachgewiesen werden. Der kulturelle Nachweis von Enteroviren war hingegen an keinem der Probenahmeorte möglich. Der Vergleich von bakteriologischer und virologischer Wasserqualität bestätigt, dass der Fäkalindikatorkeim *E. coli* keine Aussage über das Vorkommen von bestimmten Darmviren zulässt.

Résumé

Une nouvelle méthode pour l'isolation et la détection de virus entéropathogènes a été développée et appliquée lors de l'analyse de 27 échantillons d'eau de bains publics (lacs et rivières) du canton de Berne. L'eau a été analysée au moyen de RT-PCR quant à la présence

de virus intestinaux (entérovirus, virus de l'hépatite A et petits virus ronds structurés (small round structured virus). L'analyse des entérovirus a également été effectuée sur un milieu de culture. *E. coli* a été mis en évidence selon les recommandations de l'OFSP pour l'appréciation hygiénique de l'eau de bains de lacs et de bains de rivières. Une mise en évidence d'entérovirus et de «small round structured virus» par RT-PCR était possible pour 15% (4/27) respectivement 59% (16/27) des endroits analysés, à aucun des endroits (0/27) le virus de l'hépatite A n'a pu être détecté. Sur un milieu de culture, les entérovirus ne pouvaient être détectés à aucun des endroits de prélèvement. La comparaison de la qualité bactériologique avec la qualité virologique de l'eau, confirme que la présence de *E. coli* comme germe indicateur pour matières fécales ne permet pas de conclusion concernant la présence de certains virus intestinaux.

Summary

A new isolation and detection procedure for enteric viruses was developed and applied for the investigation of the water quality of 27 recreational water samples within the canton of Berne. The samples were examined for the presence of enteric viruses (enteroviruses, small round structured viruses, hepatitis A virus) by RT-PCR, of enteroviruses by cell culture and of *E. coli* according to the guidelines of the Swiss Federal Office for Public Health. Enteroviruses were detectable in 15% (4/27), small round structured viruses in 59% (16/27), and hepatitis A virus in 0% (0/27) of the water samples. Enterovirus culture yielded negative results. The comparison of virus and bacterial contaminations suggests that the presence of fecal *E. coli* does not correlate with the presence of the investigated enteric viruses.

Literatur

1. Block, J.C. and Schwartzbrod, L.: Viruses in water systems – detection and identification. VCH Publishers, Inc., New York 1989.
2. Tougianidou, D. and Botzenhart, K.: Occurrence and detection of viruses in drinking water. *Immun. Infect.* **21**, 122–125 (1993).
3. Lawson, H.W., Braun, M.M., Glass, R.I.M., Stine, S.E., Monroe, S.S., Atrash, H.K., Lee, L.E. and Englender, S.J.: Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort: role of geographical formations in contamination of well water. *Lancet.* **337**, 1200–1204 (1991).
4. Fogarty, J., Thornton, L., Hayes, C., Laffoy, M., O'Flanagan, D., Devlin, J. and Corcoran, R.: Illness in a community associated with an episode of water contaminated with sewage. *Epidemiol. Infect.* **114**, 289–295 (1995).
5. Hedberg, C.W. and Osterholm, M.T.: Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 199–210 (1993).
6. Trask, J.D., Melnick, J.L. and Wenner, H.A.: Chlorination of human, monkey-adapted, and mouse strains of poliomyelitis virus. *Am. J. Hyg.* **41**, 30–40 (1945).
7. Morens, D.A. and Pallansch, M.A.: Epidemiology. In: Rotbart, H.A. (ed.). Human enterovirus infections, p. 3–23. ASM Press, Washington, D.C., 1995.
8. Rotbart, H.A.: Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 971–981 (1995).
9. Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. and Purcell, R.H.: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* **182**, 1026–1028 (1973).

10. *Vieler, E. and Herbst, W.*: Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus. *J. Hepatol.* **22** (1995).
11. *Lew, J.F., Kapikian, A.Z., Valdesuso, J. and Green, K.Y.*: Molecular characterization of hawaii virus and other norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J. Infect. Dis.* **170**, 535–542 (1994).
12. *Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M.*: Rotaviruses. In: *Fields, B.N. (ed.)*, p. 863–906. *Virology*, Raven Press, New York 1985.
13. *Willcocks, M.M., Carter, M.J. and Madeley, C.R.*: Astroviruses. *Rev. Med. Virol.* **2**, 97–106 (1992).
14. *Uhnnoo, I., Wadell, G., Svensson, L. and Johannsson, M.E.*: Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 365–372 (1984).
15. *Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock, R.K.*: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1075–1081 (1972).
16. *Smith, J.L. and Fratamico, P.M.*: Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. *J. Food Protect.* **58**, 696–708 (1995).
17. *Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M.*: The Norwalk group of viruses. *Virology.* **24**, 671–693 (1990).
18. *Wang, J., Jiang, X., Madore, H.P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J.F., Green, K.Y. and Estes, M.K.*: Sequence diversity of small, round-structured viruses in the norwalk virus group. *J. Virol.* **68**, 5982–5990 (1994).
19. *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. **L 229/11** (1980).
20. *Anonym*: Richtlinie des Rates vom 5. Februar 1975 über die Qualität der Badegewässer (76/160/EWG). *Amtsblatt der europ. Gemeinschaft* vom 8. Dezember. **Nr. L 31/1** (1975).
21. *Metzler, A., Regli, W., Leisinger, M., Heider, H., Schweizer, K. und Tabisch, A.*: Viren und Parasiten im Trinkwasser: Risiken und Prävention. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **87**, 55–72 (1996).
22. *Guyer, S.*: Viruskontamination der Aare im Zusammenhang mit der Wirksamkeit von Kläranlagen. Inauguraldissertation, Institut für Hygiene und Med. Mikrobiologie der Universität Bern 1989.
23. *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).
24. *Schwerdt, C.E. and Fogh, J.*: The ratio of physical particles per infectious unit observed for poliomyelitis viruses. *Virology.* **4**, 41–52 (1957).
25. *Gilgen, M., Germann, D., Lüthy, J. and Hübner, P.*: Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. Submitted to *Int. J. Food Microbiol.* (1997).
26. *Bundesamt für Gesundheitswesen*: Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **82**, 243–263 (1991).
27. *Wallis, C., Homma, A. and Melnick, J.L.*: A portable virus concentrator for testing water in the field. *Water Res.* **6**, 1249–1256 (1972).
28. *Tsai, Y.-L., Tran, B. and Palmer, C.J.*: Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 363–366 (1995).

29. *Deetz, T.R., Smith, E.M., Goyal, S.M., Gerba, C.P., Vollet, J.J., Tsai, L., DuPont, H.L. and Keswick, B.H.*: Occurrence of Rota- and Enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Res.* **5**, 567–571 (1984).
30. *Snead, M.C., Olivieri, V.P., Kawata, K. and Kruse, C.W.*: The effectiveness of chlorine residuals in inactivation of bacteria and viruses introduced by post-treatment contamination. *Water Res.* **14**, 403–408 (1980).
31. *Sobsey, M.D.*: Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Sci. Technol.* **21**, 179–195 (1989).
32. *Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.*: Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1318–1324 (1993).
33. *Jothikumar, N., Khanna, P., Khammatchiammal, S. and Paulmurugan, R.*: Rapid detection of waterborne viruses using the polymerase chain reaction and a gene probe. *Intervirology.* **34**, 184–191 (1992).
34. *Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J. and Lopez-Pila, J.M.*: Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 1213–1219 (1993).
35. *Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. and Girones, R.*: Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2963–2970 (1994).
36. *Tsai, Y.-L., Tran, B., Sangermano, L.R. and Palmer, C.J.*: Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2400–2407 (1994).
37. *Cubitt, W.D., Blacklow, N.R., Herrmann, J.E., Nowak, N.A., Nakata, S. and Chiba, S.*: Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* **156**, 806–814 (1987).
38. *Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M.K.*: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* **195**, 51–61 (1993).
39. *Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y. and Estes, M.K.*: Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2529–2534 (1992).
40. *Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R. and Clarke, I.N.*: Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science.* **259**, 516–519 (1993).
41. *Häfliger, D.*: Development of an isolation protocol for Small Round Structured Viruses in shellfish and detection by RT-PCR. Diplomarbeit der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern 1996.

Dr. Hans-Peter Bühler
 Dr. Urs Müller
 Kantonales Laboratorium Bern
 Muesmattstrasse 19
 Postfach
 3000 Bern 9

Dr. Daniel Germann
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 Friedbühlstrasse 51
 3010 Bern

Dr. Michael Gilgen
 PD Jürg Lüthy
 Daniel Häfliger
 Dr. Philipp Hübner
 Laboratorium für Lebensmittelchemie
 Departement für Chemie und Biochemie
 Freiestrasse 3
 3012 Bern