



**Universitätsklinikum Tübingen, Hygiene-Institut, Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene**

**DBU Deutsche Bundesstiftung Umwelt**

**Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie**

in Kooperation mit der Fachgruppe Umwelthygiene / Toxikologie der DGHM  
und dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfachs, DVGW

## **Aktuelle Aspekte der Cryptosporidien- und Giardien-Analytik in Wasserproben**

**- Statuskolloquium -**

**am Freitag, den 11. Dezember 1998 in Tübingen**

**Max-Planck-Haus, Spemannstraße 36**

**A. Wiedenmann und P. Krüger**

( Herausgeber )

**September 1999**

### **Kurzfassungen der Vorträge**

abrufbar als PDF-Datei unter

**<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kyh/dbu98-1.htm>**

und vom Online-Publikationsserver der Universitätsbibliothek Tübingen unter

**<http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/intro/>**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Einleitung</b> ( A. Wiedenmann ).....	3
<b>Möglichkeiten und Grenzen der konventionellen Analytik</b> ( A. Wiedenmann*, Hygiene-Institut, Universität Tübingen ).....	4
<b>Anforderungen an die Analytik aus Sicht der Wasserwerke</b> ( H. Schreiber, Stadtwerke Frankfurt a. M. GmbH, DVGW ).....	5
<b>Probenahme mit Störstoffabtrennung durch Hydrozyklone</b> ( A. Nahrstedt**, IWW Institut für Wasserforschung, Mülheim a. d. R. ).....	6
<b>Die Durchflußzytometrie zum Nachweis von Cryptosporidium und Giardia - ein Überblick</b> ( V. Gornik**, Hygiene-Institut, Universität Bonn ).....	7
<b>Methoden zur Isolierung und zum Nachweis von Cryptosporidien und Giardien im Wasser: vorhandene Defizite und künftige Entwicklungen</b> ( P. Karanis, Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn ).....	8
<b>Normung von Nachweisverfahren für Parasitendauerformen aus Wasserproben – Stand und Perspektiven</b> ( I. Feuerpfeil u. K. Bischoff, Umweltbundesamt, Bad Elster ).....	9
<b>Literaturübersicht: Cryptosporidien-Nachweis mit Hilfe der PCR</b> ( P. Krüger und A. Wiedenmann*, Hygiene-Institut, Universität Tübingen ).....	10
<b>In-situ-Hybridisierungstechniken zum Nachweis der Vitalität von Kryptosporidien und Giardien</b> ( C. Wagner-Wiening und P. Kimmig**, Landesgesundheitsamt Stuttgart ).....	11
<b>Entwicklung eines Taq-Man PCR-Assays für Cryptosporidien mit interner Kontrolle:</b> ( P. Krüger*, Hygiene-Institut, Universität Tübingen ).....	12
<b>Design und Konstruktion interner kompetitiver PCR-Kontrollen</b> ( M. Bayer und D. Tougianidou*, 4base Lab GmbH, Reutlingen ).....	13
<b>Adressen der Referenten.....</b>	14
<b>Verteilerliste.....</b>	16

\* Projektpartner der DBU, Osnabrück

\*\* Projektpartner des bmb+f

**Dieser Bericht wurde erstellt im Auftrag der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück,  
unter Vertrag Nr. 11163**

## Einleitung

Cryptosporidien und Giardien sind weltweit verbreitete mikroskopisch kleine Parasiten, die bei Mensch und Tier zu Erkrankungen des Magen-Darm-Systems führen. Nach mehreren trinkwasserbedingten Epidemien mit insgesamt vielen Tausend Erkrankungen in Industriestaaten wie USA und Großbritannien wird seit Jahren weltweit an Verbesserungen auf den verschiedenen Ebenen der Cryptosporidien- und Giardien-Analytik in Wassereproben gearbeitet. Im Bereich der Probenahme werden neue Filtermedien getestet, zur Abtrennung von Störstoffen erfolgen der Einsatz von Hydrozyklonen, das Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) und die Immunomagnetische Separation (IMS), elektronische Bildbearbeitungssysteme werden zur exakteren Vermessung und Identifizierung mikroskopisch nachgewiesener Objekte eingesetzt, Vitalfärbungen, in vitro Vitalitätstests und gentechnische Verfahren wie die PCR sollen als Surrogat für die Beurteilung der Infektiosität dienen. Apparative Methoden sollen den mikroskopischen Nachweis ersetzen. Die systematischen und statistischen Fehler der Methodik können experimentell ermittelt und durch entsprechende mathematische Verfahren genauer charakterisiert werden. Ringversuche, wie sie seit Jahren vom britischen Public Health Laboratory Service (PHLS) durchgeführt werden, dienen der externen Qualitätskontrolle. Die Aktivitäten nationaler und internationaler Behörden und Normungsinstitutionen (z. B. US EPA, DWI, ISO) führen zu einer zunehmenden Standardisierung der Methodik, und auch in der Gesetzgebung (EU-Trinkwasserrichtlinie) finden die Parasiten mittlerweile Berücksichtigung. Die britische Regierung hat mit Wirkung vom 30. Juni 1999 ein Gesetz erlassen (Statutory instrument 1999 No. 1524), in dem zum erstenmal ein konkreter Wert für eine nicht mehr akzeptable Konzentration an Cryptosporidien im Trinkwasser festgelegt wird:  $\geq 1$  Oozyste in 10 Liter Trinkwasser aus einer kontinuierlich entnommenen Tages-Mischprobe von ca. 1000 Liter. Die Nichteinhaltung dieser Konzentration stellt einen Straftatbestand dar.

Die Beiträge zum Statuskolloquium "Aktuelle Aspekte der Cryptosporidien- und Giardien-Analytik in Wasserproben" am 11. Dezember 1998 in Tübingen sollen dem interessierten Fachpublikum einen Überblick verschaffen über die Vielfalt neuer Forschungsergebnisse und Entwicklungen auf diesem Gebiet. Insbesondere soll auch der Status aktueller von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt und vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie geförderter Forschungsprojekte zu diesem Thema dargestellt werden.

An dieser Stelle soll allen, die zum Gelingen der Veranstaltung beigetragen haben, nochmals herzlich gedankt werden: der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Förderung unter Projekt-Nr. 11163, dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie für die Kooperationsbereitschaft, den Referenten für die inhaltliche Mitgestaltung, der Fachgruppe Umwelthygiene/ Toxikologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfachs und dem Gesundheitsamt Tübingen für die organisatorische Unterstützung bei der Bekanntmachung des Programms, den zahlreichen Helfern bei der Planung und Durchführung der Veranstaltung und den Mitarbeitern der Max-Planck-Gesellschaft für das Zurverfügungstellen der Tagungsräumlichkeiten und für die freundliche Bewirtung.

Tübingen, den 07.09.1999

gez. Albrecht Wiedenmann

## **Möglichkeiten und Grenzen der konventionellen Analytik**

*Albrecht Wiedenmann*

Hygiene-Institut der Universität Tübingen, Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene

Beim Nachweis von Cryptosporidien und Giardien aus Wasserproben versteht man unter konventioneller Analytik ein mehrstufiges Verfahren, bei dem die Oozysten bzw. Zysten der beiden Parasitenarten zunächst aus einem größeren Wasservolumen (1-1000 Liter oder mehr) angereichert werden. Dieser erste Verfahrensschritt besteht in der Regel aus einer Filtration z. B. über Wickelfilterkerzen oder Membranfilter. Die Filter werden anschließend im Labor eluiert und das resultierende Eluat wird durch Zentrifugation weiter eingeeengt (Konzentration). Das Konzentrat wird in einem kleineren Volumen wieder aufgeschwemmt und mit einer Flüssigkeit mit höherer spezifischer Dichte, z. B. einer 56%-igen Saccharoselösung, unterschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation werden Bestandteile mit einer höheren spezifischen Dichte, z. B. Sand-, Boden- oder Rostpartikel, von den leichteren Partikeln getrennt, da diese bei der Zentrifugation nicht durch die Zuckerlösung hindurch dringen können (Separation). Der die Parasiten enthaltende Überstand wird abgenommen und erneut zentrifugiert, um die Parasiten im Bodensatz (Pellet) in einem noch geringeren Volumen zu konzentrieren. Jetzt folgt der eigentliche Nachweis der Oozysten/Zysten, indem das erhaltene Konzentrat auf Objektträger oder kleine Membranfilter aufgetragen und mit monoklonalen Antikörpern beschichtet wird. Diese binden spezifisch an die Oberfläche der Oozysten/Zysten. An die Antikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei entsprechender Anregung im UV-Bereich unter dem Mikroskop hellgrün leuchtet (Identifikation). Auf allen Stufen der Analytik kann es zu Verlusten von Oozysten und Zysten kommen. Vor allem bei den Wickelfiltern werden bereits bei der Probenahme nicht alle Organismen zurückgehalten, auch die Elution erfolgt nicht zu hundert Prozent, so daß ein Teil der Organismen im Filtermedium zurückbleibt. Bei den anschließenden Zentrifugationsschritten kann es zu einer unvollständigen Pelletierung kommen. Bei der Separation können schwerere Substanzen die Oozysten und Zysten mit nach unten reißen. Bei der Anfertigung der mikroskopischen Präparate können einzelne Organismen von immer noch vorhandenen Störstoffen bedeckt werden und so dem Nachweis entgehen. Dies alles führt dazu, daß von der ursprünglich in einem Probenvolumen vorhandenen Menge an Oozysten/Zysten nur ein Bruchteil detektierbar ist. Das zeilenweise Durchmusteren der Präparate zum Auffinden der fluoreszenzmarkierten Objekte ist zudem äußerst zeitaufwendig, ermüdend und durch arbeitsrechtliche Bestimmungen zeitlich limitiert. Die Identifizierung fluoreszierender Objekte aufgrund ihrer Größe, Form und der Verteilung der Fluoreszenzintensität ist selbst für den Erfahrenen oft nicht einfach. Es bestehen zahlreiche Verwechslungsmöglichkeiten mit nicht definierbaren fluoreszierenden Objekten, autofluoreszierenden Algen bis hin zu anderen für den Menschen unbedeutenden Arten der beiden Parasitengattungen. Wie bei physikalischen, chemischen und anderen mikrobiologischen Meßmethoden auch, gibt es bei der Parasitenanalytik neben den geschilderten rein methodisch bedingten Einschränkungen, die zu einer systematischen Abweichung des Meßwerts vom wahren Wert führen, Zufallsfehler, die die Präzision des Meßergebnisses beeinflussen. Zufallsfehler entstehen bereits bei der Probenahme. Wenn z. B. in einem Liter Wasser drei Cryptosporidien-Oozysten enthalten sind, und man greift aus dieser Wassermatrix eine Stichprobe von 100 ml heraus, so wird in diesem Stichprobenvolumen häufig gar keine Oozyste enthalten sein. In manchen Fällen wird eine einzelne Oozyste enthalten sein, in seltenen Fällen zwei und in sehr seltenen Fällen wird man zufällig alle drei Oozysten erwischen. In keinem Fall würde das Ergebnis (0, 1, 2 oder 3 Oozysten pro 100 ml) dem wahren Wert (0,3 Oozysten pro 100 ml) entsprechen. Im letzteren Fall würde man sogar eine Konzentration errechnen, die zehnfach höher liegt als die tatsächliche. Systematische und statistische Fehler führen in ihrer Gesamtheit dazu, daß die Wiederfindungsraten der kompletten Methodik in der Praxis mehr oder weniger stark um eine mittlere Wiederfindungsrate streuen.

Mit Hilfe der konventionellen Analytik lassen sich Aussagen darüber treffen in welchem Umfang Oozysten und Zysten in einer Wassermatrix vorhanden sind. Der zufallsbedingte Probenahmefehler läßt sich prinzipiell durch eine Steigerung des Probenvolumens reduzieren. Je nach Menge an Störsubstanzen wird eine Steigerung des Probenvolumens allerdings wieder begrenzt, z. B. durch Verblockung von Filtern und die o. g. möglichen Interferenzen von Störpartikeln mit den anschließenden Analyseschritten. Die unvermeidlichen systematischen Fehler bei der Analytik und die statistisch bedingten Schwankungen der Wiederfindungsraten lassen sich experimentell bestimmen und durch entsprechende mathematische Modelle charakterisieren. So können für eine tatsächlich mikroskopisch gefundene Anzahl von Organismen Schätzwerte und Vertrauensintervalle für die wahrscheinlichste Konzentration in der ursprünglichen Probe berechnet werden. Neben der Höhe der mittleren Wiederfindungsrate ist auch deren Streubreite ein entscheidendes Kriterium für die Qualität einer Nachweismethode. Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle, wie sie seit Jahren vom britischen Public Health Laboratory Service (PHLS) durchgeführt werden, tragen dazu bei, das Vertrauen in die diagnostischen Fähigkeiten eines Labors zu erhöhen und sollten wie in Großbritannien und den USA zur Selbstverständlichkeit werden. Die konventionelle Analytik läßt in der geschilderten Form aber keine Rückschlüsse auf die Infektiosität der nachgewiesenen Organismen zu. In Deutschland ist zudem ungeklärt, welches gesundheitliche Restrisiko durch Erkrankungen an Parasiten akzeptiert wird bzw. ab welcher Parasitenkonzentration eine Abgabe von Trinkwasser an den Verbraucher nicht mehr gestattet ist.

## **Anforderungen an die Analytik aus Sicht der Wasserwerke**

*Hubert Schreiber*

Mainova AG, Abteilung Trinkwassergüte, Frankfurt am Main

### **Nachweisverfahren**

Das Verfahren zur Anreicherung und Identifizierung, stützt sich unabhängig von vielen methodischen Verbesserungen und neuen Ansätzen in der Praxis im wesentlichen auf die von Rose und Mitarbeitern modifizierte Wickelfilter-Methodik. Die wesentlichen Kritikpunkte an diesem Verfahren sind:

### **Kritikpunkte am etablierten Nachweisverfahren**

- auch matrixunabhängig stark schwankende Wiederfindungsraten
- Variationsbreite der Nachweisgrenzen bis zu 3-log-Stufen
- schlechte Reproduzierbarkeit laborintern und in Ringversuchen
- keine routinemäßige Erfassung der Vitalität / Infektiosität
- Darstellung der Befunde / Seuchenhygienische Beurteilung

Mit einer statistischen Fehlerbetrachtung, wie sie von Nahrstedt und Gimbel für die parasitologischen Nachweisverfahren eingeführt wurde, sind die methodischen Unsicherheiten quantifizierbar. Die obere Grenze des 90%-Konfidenzintervalls kann bei einem faktischen Nullbefund z.B. bis zu 21 Giardia-Zysten pro 100L erreichen. Wenn auch die statistische Fehlerbetrachtung mikrobiologischer Befunde keine neue Vorgehensweise darstellt (siehe MPN-Verfahren), so ist die Einbeziehung methodischer Unsicherheiten in die seuchenhygienische Trinkwasserbeurteilung vor allem in Hinsicht auf die juristischen Konsequenzen eine neue Qualität, die dringend der weiteren fachlichen Auseinandersetzung bedarf. Unter der Annahme, daß bereits eine Zyste eine Infektion auslösen kann, stellt die Bewertung derartiger Befunde zum jetzigen Zeitpunkt die zuständigen Behörden und die Versorgungsunternehmen vor eine nicht zu lösende Aufgabe. Die seuchenhygienische Beurteilung wird zusätzlich komplexer durch neuere Erkenntnisse aus den USA. Mittlerweile sind mehrere molekularbiologische Subtypen von *C. parvum* unterschieden, von denen nicht alle für den Menschen infektiös zu sein scheinen. Insgesamt besteht noch ein erheblicher Diskussionsbedarf in Bezug auf eine realistische Risikoabschätzung.

### **Fazit**

- Optimierung der Analytik (reproduzierbar, sensitiv, spezifisch)
- Beibehaltung und Durchsetzung der bewährten seuchenhygienischen Standards
- Optimierung der staatlichen seuchenhygienischen Überwachung
- Fortentwicklung der epidemiologischen Bewertungsgrundlagen
- Optimierung der Kenntnisse über die Verbreitung der Parasiten im Rohwasser
- Optimierung des Gewässerschutzes in Bezug auf seuchenhygienisch relevante Parameter

## **Probenahme mit Störstoffabtrennung durch Hydrozyklone**

*Andreas Nahrstedt und Rolf Gimbel*

Iww Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH

Aninstitut der Universität - GH Duisburg, Moritzstraße 26, D-45476 Mülheim an der Ruhr

In vorausgegangenen Arbeiten des IWW konnte gezeigt werden, daß bei der Untersuchung auf Cryptosporidien-Oozysten und Giardien-Zysten die analytischen Befunde nur dann eine Aussagekraft für das untersuchte Wasser besitzen, wenn ein großes Probevolumen untersucht wird. Die gängigen Verfahren zur primären Aufkonzentrierung (Tiefenfiltration, Oberflächenfiltration mit Kuchenbildung bzw. mit Cross-flow, kontinuierliche Zentrifugation und Flockung) führen aber generell zu einem stärkeren und häufigeren Kontakt der Oozysten und Zysten mit anderen partikulären Wasserinhaltsstoffen, womit eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Agglomeraten gegeben ist. In Agglomerate eingebundene Parasiten haben jedoch in vielerlei Hinsicht ein ganz anderes Verhalten als einzeln vorliegende, was bei den selektiven Isolationschritten der Nachweismethode (Zentrifugation und Flotation) zu deren Abtrennung und Verlust führt. Es empfiehlt sich daher ein Trennverfahren, das der primären Anreicherung vorangestellt wird und für eine weitgehende Elimination partikulärer Begleitstoffe sorgt. Für diesen Trennprozeß scheint ein Hydrozyklon als kontaktloser Trennapparat besonders geeignet, da dessen Scherströmung nicht nur eine Agglomeration verhindert, sondern bestehende Agglomerate in Einzelteilchen dispergiert.

Hydrozyklone können schon während der Probenahme der primären Anreicherung vorgeschaltet werden, da sie im Gegensatz zu den meisten Filtrationsverfahren kontaktlos arbeiten. Dabei wird ausgenutzt, daß die Oozysten und Zysten durch geringe Größe und geringe Dichtedifferenz zum Wasser sehr kleine Massenkraft (Zentrifugalkräfte) hervorrufen, auf denen der Trennprozeß basiert. Die tangential am oberen Zylinderteil eines Hydrozyklons unter Druck eintretende Suspension erzeugt einen Primärwirbel, welcher sich schraubenförmig in Richtung Unterlaufdüse am Konus-Ende bewegt und Tangentialbeschleunigungen erzeugt, die um zwei Größenordnungen über der Erdbeschleunigung ( $g$ ) liegen. Partikel mit einer höheren Dichte als Wasser sedimentieren daher radial in Richtung Zylinder- bzw. Konusmantel und werden mit der Strömung konusabwärts gerissen. Der geringe Strömungsquerschnitt der Unterlaufdüse, des sog. Apex, erlaubt zwar den Austrag eines wandnahen Strömungsanteils mit den dort angereicherten Partikeln. Er zwingt jedoch den Hauptanteil des Primärwirbels zu einer axialen Richtungskehr, wodurch sich der sog. Sekundärwirbel ausbildet - oft begleitet von einem inneren Gaskern (Trombe) -, der schraubenförmig konusaufwärts schießt und den Zyklon an der Stirnwand des Zylinders durch die Überlaufdüse (Vortexdüse) verläßt. Am Umfang dieses Sekundärwirbels werden die maximalen Tangentialgeschwindigkeiten erzielt, welche bei den kleinen Radien zu maximalen Zentrifugalbeschleunigungen führen. Partikel im Größenbereich des sog. Trenn(korn)durchmessers werden dadurch wieder radial in den Primärwirbel ausgeschleudert, rezirkulieren daher mehrfach und erfahren eine deutlich erhöhte Aufenthaltszeit.

Zur Ermittlung der Betriebs- und Abscheidecharakteristik von Hydrozyklonen wurde eine Versuchsanlage derart konzipiert, daß Modellsuspensionen mit Partikeln definierter Größe und Dichte in einem Kreislauf umgepumpt werden, in dem sich auch der Hydrozyklon befindet. Eingesetzte Pulver für die Trennung mittels Hydrozyklon waren: Polystyrol-DVB Kugeln (Partikeldichte  $1050 \text{ kg/m}^3$ ; Partikeldurchmesser  $2\text{-}120 \mu\text{m}$ ), Walnußschalen-Partikel (Partikeldichte  $1350 \text{ kg/m}^3$ ; Partikeldurchmesser  $3\text{-}30 \mu\text{m}$ ) und Quarzmehl Sikron H200 (Partikeldichte  $2650 \text{ kg/m}^3$ ; Partikeldurchmesser  $2\text{-}40 \mu\text{m}$ ). Zur Trennung wurden industriell genutzte Zyklone von drei deutschen Herstellerfirmen untersucht, von denen einer mittels verschiedener Überlauf- und Unterlaufdüsen konfigurierbar war.

Die Versuche ergaben, daß der Zyklon PU-25/6 der Firma Dorr-Oliver bei einem Durchsatz von  $1,1 \text{ m}^3/\text{h}$  für die gestellten Randbedingungen am geeignetsten ist: Der Anteil der partikulären Begleitstoffe kann je nach Partikeldichte deutlich gesenkt werden. Agglomerate werden nahezu vollständig wieder in einzelne Teilchen dispergiert. Damit kann die Probe voraussichtlich nach einer primären Anreicherung (bspw. mit einer Membranfiltration) direkt mit immunofluoreszierenden Antikörpern (IFA = immunofluorescence assay) inkubiert und die so markierten Zysten und Oozysten im Durchflußzytometer isoliert und ausgezählt werden. Der sonst übliche verlustreiche Isolationschritt mittels Flotation in der Zentrifuge unter Einstellung eines Dichtegradienten entfällt, was die Wiederfindung deutlich erhöhen wird. Das geringere Feststoffvolumen benötigt auch entsprechend geringere Einsatzmengen der Antikörper und es kann im Durchflußzytometer schneller abgetastet werden. Die Düsen dieses Gerätes sind aufgrund der im Zyklon erfolgten Abtrennung großer Partikel weniger verstopfungsanfällig. Damit trägt der Einsatz des Hydrozyklons zur Senkung der Kosten für die Cryptosporidien- und Giardien-Analytik bei.

## **Die Durchflußzytometrie zum Nachweis von *Cryptosporidium* und *Giardia* – ein Überblick**

Volker Gornik

Hygiene-Institut der Universität Bonn

Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Forschungsvorhabens zur "Weiterentwicklung des Bestimmungsverfahrens für die Parasiten *Cryptosporidium* sp. und *Giardia* l. in Wasser" steht im Teil 1 des Forschungsvorhabens die "Anreicherung, Reinigung und Bestimmung mittels Durchflußzytometrie" im Vordergrund.

Die Durchflußzytometrie als Methode zur elektronischen Messung bestimmter physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen oder Partikeln wird seit einiger Zeit zunehmend auch in der biologischen Forschung eingesetzt.

### **Gerätesystem und durchflußzytometrische Messung**

Moderne Durchflußzytometer sind aus einem Flüssigkeitssystem zum Transport der Zellen oder Partikel zur Meßeinheit, einem optischen System mit Laser-Lichtquelle und Sammeloptik, einem elektronischen System zur Umwandlung optischer in elektronische Signale sowie einem Rechner zur Datenauswertung und -interpretation aufgebaut.

Mit der Durchflußzytometrie können physikalische Eigenschaften von Zellen, wie Größe, Form und Struktur bestimmt werden; außerdem können z.B. solche Zellkomponenten und -funktionen erfaßt werden, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden können. Mit dem im Forschungsvorhaben eingesetzten Gerät sind simultane Multiparametermessungen von bis zu 6 Parametern möglich.

Größere Durchflußzytometer besitzen zusätzlich eine Sortereinheit, mit der analysierte Zellen nach definierten Kriterien aus einem heterogenen Gemisch physikalisch abgetrennt und gesammelt werden können. Das verwendete Durchflußzytometer kann zwei Populationen mit einer theoretischen Sortiergeschwindigkeit von 10.000 Zellen pro Sekunde sortieren; Reinheit und Ausbeute sind über verschiedene Sort-Modi beeinflussbar. Damit kann das System während eines Meßvorgangs z.B. die Organismen *Cryptosporidium* und *Giardia* detektieren und trennen.

Zur Messung bestimmter Zellen erfolgt i.d.R. nach der Gerätekalibrierung zunächst eine Analyse mit Kontrollmaterial; hierzu werden z.B. FITC-markierte *Cryptosporidium*-Oocysten oder *Giardia*-Cysten verwendet. Die Abklärung, ob die Signale den vermuteten Organismen entsprechen, wird über die Sortereinheit und eine nachfolgende mikroskopische Kontrolle des gesorteten Materials erreicht.

### **Durchflußzytometrie zum Nachweis von *Cryptosporidium* sp. und *Giardia* l.**

Vesey und Mitarbeiter beschrieben erstmals 1991 den Einsatz der Durchflußzytometrie zum Nachweis von *Cryptosporidium* in Wasser; die Nachweisgrenze lag damals im Bereich von 1000 Oocysten/ l Wasser (Vesey et al., 1991). Ab 1993 wurde durch den Einsatz eines Durchflußzytometers mit Sortereinheit die Überlegenheit des Systems deutlich: in Paralleluntersuchungen wurden Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Durchflußzytometrie verglichen. Vesey et al. berichten über Wiederfindungsversuche von mit *Cryptosporidium* und *Giardia* versetzten Oberflächenwasser-Sedimenten, in denen mit der Mikroskopie zwischen 45% und 59% der eingesetzten *Cryptosporidium*-Oocysten und mit der Durchflußzytometrie zwischen 95% und 104% nachgewiesen wurden; für *Giardia*-Cysten lagen diese Werte zwischen 80% und 91% bzw. zwischen 92% und 115% (Vesey et al., 1993). An anderen parallel untersuchten Wasserproben konnten die Autoren zeigen, daß mit der direkten Fluoreszenz-Mikroskopie in 2,2% der Proben ein Nachweis von *Cryptosporidium* mit Konzentrationen von max. 1 Oocyste pro Probe möglich war, während mit dem Sorter und nachfolgender mikroskopischer Kontrolle in 34,6% der Proben ein Nachweis von bis zu 22 Oocysten erfolgte. Weitere Untersuchungen dieser Autoren konnten *Cryptosporidium* mit dem direkten mikroskopischen Nachweis in 29% der Proben mit max. 10 Oocysten nachweisen, während durchflußzytometrisch ein Nachweis in 71% der Proben mit max. 32 Oocysten möglich war (Vesey et al., 1994). Ähnliche Ergebnisse werden von weiteren Autoren berichtet.

### **Vor- und Nachteile der Durchflußzytometrie**

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die Durchflußzytometrie gegenüber den Standardmethoden eine wesentlich höhere Sensitivität und Spezifität aufweist; im Vergleich sind die Wiederfindungsraten deutlich erhöht. Der Zeitaufwand für die mikroskopische Analytik wird erheblich verringert.

Nachteile liegen vor allem in den Anschaffungs- und Betriebskosten eines Durchflußzytometers mit Sortereinheit. Zudem zeigt die Praxis, daß sich die Bedienung des Gerätes im Rahmen der Fragestellung als relativ komplex erweist. Zukünftige Ziele des Forschungsvorhabens sind daher u.a. die Optimierung der Markierung sowie die Reduktion/ Ausblendung vielfältiger Störungen der Probenmatrix.

## **Methoden zur Isolierung und zum Nachweis von Cryptosporidien und Giardien im Wasser: vorhandene Defizite und künftige Entwicklungen g**

Panagiotis Karanis

Universität Bonn, Institut für Medizinische Parasitologie, Sigmund-Freud-Str. 25, D-53105 Bonn

### **Bemerkungen zum Nachweis von *Cryptosporidium* und *Giardia* aus Wasser**

Die Nachweismethode für *Cryptosporidium* und *Giardia* besteht aus folgenden vier Hauptschritten: a) Anreicherung aus der Wasserprobe, b) Eluierung, c) Konzentrierung und Reinigung, d) Identifizierung der Parasiten im Mikroskop. Das Verfahren wurde erstmals in den USA für den Nachweis von *Giardia*-Zysten im Wasser (Jakubowski und Ericksen 1979) während einer Giardiasis-Epidemie in New York im Jahre 1974-75 entwickelt. Später (1987) wurde dieses Verfahren für den Nachweis von Kryptosporidien angewandt und von der Arbeitsgruppe Rose für den gleichzeitigen Nachweis von *Giardia*-Zysten und *Cryptosporidium*-Oozysten benutzt. Immer wieder wurde diese Methode in den USA modifiziert. In England wurde das Verfahren aus den USA übernommen und in mehreren Modifikationen in einer Abfassung von 1989 als "Blue Book" HMSO-Methode, bekannt. Obwohl diese Methode in ihrem Grundprinzip bei allen Laboratorien in den verschiedenen Ländern der Welt vergleichbar erscheint, gibt es doch wesentliche Unterschiede und methodische Variationen, die erst bei einer sorgfältigen Betrachtung der einzelnen Aufarbeitungsschritte erkannt werden können. Von einer einheitlichen Anwendung des Verfahrens kann daher nicht ausgegangen werden.

### **Evaluierung von Nachweismethoden**

Es ist aus der Literatur bekannt, daß Versuche zur Wiederfindung von *Giardia* und *Cryptosporidium* unterschiedliche Wiederfindungsraten ergaben. Dieses ist verständlich, da die Versuche unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden. Eine Validierung kann nur mittels eines Vergleichs von Daten, die unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden, durchgeführt werden. Zahlreiche Faktoren, können die Empfindlichkeit der Methode und das Ergebnis der Wiederfindung beeinflussen. Die Anzahl der eingesetzten Zysten und Oozysten, die Art der Evaluierung einer Untersuchungstechnik, der biologische Zustand, das Alter und die Aufbewahrungsbedingungen von (Oo)Zysten, sind einige der Faktoren, welche die Resultate zur Wiederfindung und Parasitenkonzentrationen in Wasserproben beeinflussen. Weiterhin wird die Wiederfindungsrate von der Qualität und von der Menge des verwendeten Wassers, von der Dosiertechnik und der Auszählungsweise der Parasiten in der Suspension beeinflusst. Viele Publikationen enthalten keine detaillierten Angaben zur Durchführung der Auszählungsmethoden. Nach mehr als 20 Jahren Erfahrungen mit der Parasiten/Wasserforschung in den USA wird nun der kritische Blick auf methodische und biologische Basiserkenntnisse jetzt deutlich fokussiert.

### **Genetische Variabilität von *Cryptosporidium* und *Giardia***

Für die Gefährdung des Verbrauchers ist entscheidend, ob und in welchem Ausmaß Dauerformen von humanpathogenen Parasiten ins Trinkwasser gelangen. Dabei entsteht die Frage, ob die im Wasser auftretenden *Giardia*-Zysten und *Cryptosporidium*-Oozysten für den Menschen überhaupt infektiös sind. So ist z.B. die Vitalität der Infektiösität nicht gleichzusetzen. Die genetische Vielfalt innerhalb der Arten kann dazu führen, daß Infektionen beim Menschen durch Parasiten-Stämme zustandekommen, die in ihrer Infektiösität und dem Antigenitätscharakter variieren. Dadurch können wesentliche Pathogenitätsunterschiede verursacht werden. Erste Ergebnisse bestätigten den genetischen Polymorphismus von *Giardia* und *Cryptosporidium*-Isolaten, wodurch Tier- von Humanisolaten unterschieden werden. Weitergehende Untersuchungen sind in diesem Fall erforderlich.

### **Ausblick**

Zusammenfassend ist festzustellen, daß für den Nachweis von *Giardia* und *Cryptosporidium* aus Wasser mehrere Möglichkeiten zur Verfügung stehen. Nicht alle Methoden verfügen über eine ausreichende Qualität. Die Anwendung und der Vergleich bestimmter Techniken unter definierten Bedingungen muß zeigen, welche von ihnen für den generellen Einsatz geeignet ist. Jedenfalls können im Modell die beteiligten physikalischen und biologischen Faktoren nicht genau simuliert werden. Daher muß das Modellergebnis und das Ergebnis einer Messung in natürlich belasteten Proben nicht unbedingt übereinstimmen. Der Forschungsbedarf und die rasante Entwicklung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren, lassen interessante Perspektiven offen. Es wäre sinnvoll, in Anlehnung an amerikanische bzw. englische Arbeitsgruppen, auch in Zentraleuropa eine entsprechende Arbeitsgruppe zu etablieren. Es muß in Zukunft versucht werden, zwischen den in anderen Ländern und in Deutschland gemachten Erfahrungen einen Konsens zu finden, um Wasseraufbereitungstechnologien zu vergleichen, ein Standardverfahren für den Nachweis von *Giardia* und *Cryptosporidium* aus Wasser zu entwickeln und interdisziplinäre Forschung zur Taxonomie, Epidemiologie und Biologie der Erreger zu betreiben. Das Gelingen internationaler und interdisziplinärer Forschung setzt jedoch ein hohes Maß an Koordination voraus.

## **Normung von Nachweisverfahren für Parasitendauerformen aus Wasserproben – Stand und Perspektiven**

*Ingrid Feuerpfeil und Kathrin Bischoff*

Umweltbundesamt, Forschungsstelle Bad Elster, 08645 Bad Elster, Heinrich-Heine-Str. 12, FG V 2.6

Derzeit erfolgt die nationale Normung von Nachweisverfahren für Wasserinhaltsstoffe beim DIN– Deutsches Institut für Normung e.V. im Normenausschuß Wasserwesen, NAW IW1.

Internationale Normen zur Problematik „Wasseruntersuchung“ werden für Europa (CEN-Normen) im Gremium CEN/ TC 230 „Water analysis“ und für weitere internationale Normen (ISO-Normen) im Gremium ISO/ TC 147 „Water quality“, SC 4 „Microbiology“ erarbeitet.

Gegenwärtig wird verstärkt angestrebt, bestehende Normen im Sinne der Harmonisierung nationaler und internationaler Normen zu überarbeiten und anzupassen. Dazu müssen national und international durch ausgewählte Vertreter der Normungsausschüsse der Länder Abstimmungen erfolgen. Die Erarbeitung und Überarbeitung von speziellen Nachweisverfahren wird national und international durch entsprechende Fachvertreter im dafür etablierten Arbeitskreisen bzw. „working groups“ vorgenommen.

Aus aktuellem Anlaß wurde auf der letzten Sitzung des ISO/ TC 147/ SC 4 (1997, Kapstadt) eine neue „working group“ (WG 13) gebildet, die sich mit der Problematik „*Cryptosporidium* und *Giardia* im Wasser“ befassen soll. Das Ziel dieser WG 13 ist die Erarbeitung einer einheitlichen Vorschrift zum Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten aus Wasser im internationalen Rahmen. Als Diskussionsgrundlage wurde dazu ein „Technical report on current methods for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water“ (draft) erarbeitet, der auf der nächsten ISO/ TC 147/ SC 4 – Sitzung (April 1999, Den Haag) innerhalb der WG 13 zur Diskussion gestellt werden wird. Der „Technical report“ beinhaltet eine Zusammenstellung bzw. Problemdarstellung der gängigen Untersuchungsmethoden und Analyseverfahren, wie sie für den Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*- Zysten aus unterschiedlichen Wassermatrizes Anwendung finden.

## Literaturübersicht: Cryptosporidien-Nachweis mit Hilfe der PCR \*)

Petra Krüger und Albrecht Wiedenmann

Hygiene-Institut der Universität Tübingen, Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene

Seit 1991 wurden mehr als 30 PCR-Protokolle publiziert, die das Potential besitzen, die gegenwärtig übliche mikroskopische Nachweismethode in Umweltproben und Lebensmitteln zu ersetzen. Die Protokolle wurden im Hinblick auf folgende Faktoren verglichen und tabellarisch ausgewertet:

### **Isolierung der Oozysten aus der Testmatrix und weitere Reinigungsschritte**

Umweltproben und Stuhlproben können Substanzen enthalten, die die PCR hemmen, und daher zunächst entfernt werden müssen. Die Saccharoseflotation, die üblicherweise als Reinigungs- und Anreicherungsschritt für den mikroskopischen Nachweis durchgeführt wird, reicht hierfür normalerweise nicht aus, da die meisten Inhibitoren nicht partikulärer Art sind, sondern sich wie z. B. die Huminsäuren in Lösung befinden. Eine Reduktion dieser Stoffe kann durch häufigere Waschschrte, die Zugabe von Chelatbildnern oder die Abtrennung der Oozysten durch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) erreicht werden. Sehr gut geeignet ist auch die immunomagnetische Separation, bei der die Oozysten über Antikörper an magnetisierbare Partikel gebunden und anschließend mit einem Magneten aus der Suspension gezogen werden.

### **Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Organismen**

Cryptosporidien-Oozysten sind nur schwer zu zerstören. Geeignete Methoden sind die Anwendung von Proteinase K für bis zu 48 Stunden, Ultraschall-Behandlung oder mehrere Frier-Tau-Zyklen. Als weitere Möglichkeit kommt die Durchführung einer *in vitro* Exzystierung in Betracht, bei der die Sporozysten aktiv aus der Oozyste austreten. Unter bestimmten Bedingungen kann ein anschließender PCR-Nachweis dann gleichzeitig als Surrogat für die Vitalität bzw. Infektiosität der Organismen gewertet werden.

### **Extraktion der Nukleinsäuren**

Zur Extraktion der Nukleinsäuren werden Phenol-Chloroform-Extraktion, Ethanol-Präzipitation, Silika-Extraktion oder verschiedene kommerzielle Extraktionskits verwendet.

### **Überprüfung von Vitalität und Infektiosität**

Als Surrogat für die Vitalität oder Infektiosität der mit PCR detektierten Organismen sind verschiedene Verfahren beschrieben: der Nachweis von m-RNA unter der Vorstellung, daß diese in abgestorbenen Organismen nur eine kurze Halbwertszeit hat; die Durchführung einer *in vitro* Exzystierung, bei der nur die DNA von Sporozysten nachgewiesen werden, die aktiv aus der Oozyste ausgetreten sind; sowie der Nachweis der DNA/RNA von Replikationsformen, die sich nach der *in vitro* Exzystierung in einer Zellkultur entwickelt haben.

### **Entfernung evtl. vorhandener freier Nukleinsäuren**

Bei Vitalitätstests durch *in vitro* Exzystierung und anschließendem Nachweis der DNA aus exzystierter Sporozysten kann es notwendig sein, die DNA aus bereits zerstörten Oozysten vor der *in vitro* Exzystierung aus der Probensuspension zu entfernen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Hierfür eignen sich DNase-Verdau oder ebenfalls die immunomagnetische Separation.

### **PCR-Typ**

Verschiedene Formen der PCR eignen sich zum Nachweis von Cryptosporidien: konventionelle PCR, RT-PCR, internal-standard-PCR, *in situ* PCR, TaqMan™-PCR. Mit *in situ* PCR, TaqMan™-PCR bietet sich zudem die Möglichkeit der direkten Quantifizierung.

### **Sensitivität**

Der gelegentliche Nachweis einer einzelnen Oozyste mit Hilfe einer PCR-Methode ist prinzipiell möglich und wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Eine zuverlässige Detektion scheint z.Zt. jedoch erst bei höheren Konzentrationen (ca. 10 Oozysten) gegeben.

### **Kreuzreaktion mit anderen Cryptosporidien-Spezies**

Etliche der beschriebenen Primer-Paare weisen Kreuzreaktionen mit anderen Cryptosporidien-Spezies auf. Da andere Cryptosporidien-Spezies als *C. parvum* z. Zt. nur schwer zu beschaffen sind, ist es in der Praxis auch schwierig, neue Primer auf Kreuzreaktionen zu untersuchen. Dies scheint jedoch kein prinzipielles Problem zu sein und kann mit zunehmender Kenntnis und Verfügbarkeit entsprechender Informationen zu den jeweiligen Gensequenzen in Zukunft sicher behoben werden.

### **Verfügbare Informationen zur jeweiligen Zielsequenz**

Für die überwiegende Mehrzahl der beschriebenen Protokolle sind die Primer- und Sonden-Sequenzen bekannt. Die Sequenzen lassen sich über Gendatenbanken wie GenBank oder EMBL abrufen und zusätzliche Informationen wie z.B. Länge des Amplikons, mehrfach vorhandene Zielsequenz, stammspezifische Unterschiede im Amplikon, und Genfunktion sind aus der Originalliteratur oder ebenfalls den Gendatenbanken zu entnehmen.

\*) Eine ausführliche Zusammenstellung der Literaturübersicht in englischer Sprache ist mittlerweile erschienen.

A. Wiedenmann, P. Krüger and K. Botzenhart:

PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples - a review of published protocols and current developments. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1998) 21, 150-166

## **In situ-Hybridisierungstechniken zum Nachweis der Vitalität von Kryptosporidien und Giardien**

*Christiane Wagner-Wiening und Peter Kimmig*  
Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg

Der Direktnachweis von Stoffwechselaktivität innerhalb von Kryptosporidien- und Giardien-Dauerstadien ist durch die Detektion von messenger-RNA möglich. Die messenger-RNA überträgt in der Zelle die genetische Information vom Kern ins Plasma. Im Zytoplasma wird die messenger-RNA in Aminosäuresequenzen umgeschrieben. Diese Proteinbiosynthese erfolgt nur in vitalen Organismen. In der abgestorbenen Zelle wird die messenger RNA mit Hilfe von RNasen sehr rasch abgebaut. Sie ist somit weitaus instabiler als die genomische DNA, die noch sehr lange nach dem Zelltod nachgewiesen werden kann. Die Detektion von messenger RNA kann daher als Vitalitätsmarker gewertet werden.

Der Nachweis von messenger RNA kann entweder durch direkte Markierung mittels Gensonden oder durch die Methode der RT-PCR durchgeführt werden. Damit wird die Polymerase-Kettenreaktion auf eine Funktionsanalyse erweitert.

Bei der RT-PCR wird zunächst die Ziel-RNA mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase in sogenannte copy-DNA umgeschrieben. Diese copy-DNA kann anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern, die die Zielsequenz flankieren vervielfältigt werden. Eine RT-PCR kann an aus Zellen extrahierter RNA bzw. in den Zellen selbst, in situ durchgeführt werden.

Da es sich bei den in Umweltproben nachgewiesenen Stadien der Parasiten um Dauerstadien handelt, die lange Zeit außerhalb ihres Wirtes überdauern müssen, ist die Stoffwechselaktivität innerhalb der Zellen stark reduziert. Die Stoffwechselaktivität und somit die Synthese ausreichender messenger-RNA-Kopien muß aktiviert werden. Die Art der Induktion der Stoffwechselaktivität ist abhängig von der „Natur“ der Ziel-RNA-Sequenz.

In der vorliegenden Methode werden Primer die eine heat-shock-protein-codierende Region erfassen eingesetzt. Die Induktion der Expression dieser repetitiven Region erfolgt durch eine Hitzeaktivierung.

Nach der Stoffwechselaktivierung werden folgende Wege des messenger-RNA-Nachweises beschritten.

Zum einen die Isolierung der messenger-RNA aus Kryptosporidien- bzw. Giardien-Zysten, anschließender RT-PCR und Detektion der Amplifikationsprodukte im Agarosegel. Die Nachweisgrenzen liegen bei 10 vitalen Kryptosporidien bzw. 5 vitalen Giardien.

Eine Erweiterung der molekularbiologischen Diagnostik stellt die in situ-RT-PCR dar. Hierbei wird die Methode der RT-PCR direkt an fixierten Kryptosporidien- bzw. Giardien-Zysten durchgeführt. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung von verlustbringenden Extraktions- und Aufreinigungsschritten. Die RT-PCR erfolgt in einem in situ-PCR-Thermocycler. Durch die Verwendung von fluorescein-markierten Nukleotidbausteinen lassen sich die RT-PCR-Produkte innerhalb der Zysten im Fluoreszenzmikroskop detektieren. Ein anschließender Immunfluoreszenztest mit monoklonalen Antikörpern gegen Zystenwandepitope von Kryptosporidien und Giardien ermöglicht eine Erweiterung der Analytik. Das kombinierte Verfahren erlaubt dann die Bestimmung der Vitalität in jeder einzelnen detektierten Zelle.

Die Entwicklung von Verfahren zum Nachweis der Vitalität von Kryptosporidien- bzw. Giardien-Isolaten aus Umweltproben auf Basis der Detektion von messenger-RNA stellt eine praktikable Erweiterung der Parasitenanalytik dar.

## **Entwicklung eines Taq-Man PCR-Assays für Cryptosporidien mit interner Kontrolle**

*Petra Krüger und Albrecht Wiedenmann*

Hygiene-Institut der Universität Tübingen, Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene

Die TaqMan-PCR ist eine neu entwickelte Variante der PCR. Der Unterschied zur konventionellen PCR besteht darin, daß das PCR-Produkt anders nachgewiesen wird. Das Reaktionsgemisch enthält von Anfang an eine zusätzliche Hybridisierungssonde, die an ihren Enden mit speziellen Farbstoffen (Quencher- und Reporter-Farbstoff) versehen ist und zwischen den beiden Primern auf dem Amplikon bindet. In der Extensionsphase der PCR wird diese Sonde von der Taqpolymerase gespalten und es kommt zu einer Fluoreszenzentwicklung, deren Intensität der Menge des gebildeten PCR-Produkts entspricht. Die Messung der Fluoreszenzintensität kann entweder am Ende der Reaktion erfolgen oder, wenn entsprechende Geräte zur Verfügung stehen, bereits während des Ablaufs der PCR. Im letzteren Fall ist eine Quantifizierung des Ergebnisses durch Auswertung der Kinetik der Fluoreszenzentwicklung möglich. Weitere Vorteile sind die Erhöhung der Spezifität durch die Notwendigkeit der Bindung eines dritten Oligonukleotids (Sonde) und ein Schutz vor Kontamination, da mit dem PCR-Produkt für die Detektion nicht mehr weiter hantiert werden muß.

Um bei negativen PCR-Ergebnissen sicher gehen zu können, daß dies auf das Fehlen des Zielorganismus und nicht auf eine Hemmung der Reaktion zurückzuführen ist, wurde eine Interne Kontrolle konstruiert. Dazu wurde aus der Zielsequenz der Abschnitt mit der Bindungsstelle für die Sonde entfernt und durch eine um 40 bp längere Sequenz aus dem humanen Insulin-Gen ersetzt. Dieses Insert wurde so gewählt, daß es eine Sequenz enthält, die als weitere Sonden-Bindungs-Stelle dienen kann. Die Interne Kontrolle kann somit mit den gleichen Primern amplifiziert werden wie die eigentliche Zielsequenz, dadurch herrschen für beide PCR-Systeme sehr ähnliche Reaktionsbedingungen. Die Unterscheidung der Amplifikationsprodukte von Zielsequenz und Interner Kontrolle erfolgt durch den Einsatz unterschiedlicher Reporter-Farbstoffe der zwei TaqMan-Sonden. Auch der konventionelle Nachweis der zwei Sequenzen auf einem Agarose Gel ist auf Grund ihrer unterschiedlichen Länge möglich. Die PCR mit Interner Kontrolle wurde hauptsächlich dahingehend optimiert, daß es auch bei sehr geringen Konzentrationen an Oozysten in der Probe zu keiner Unterdrückung der Amplifikation der Ziel-Sequenz durch die Interne Kontrolle kommt. Als geeignete Menge wurde eine Konzentration von 100 Kopien/PCR ermittelt. Der Vergleich von TaqMan-PCR und der PCR mit Detektion der PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel zeigte, daß die TaqMan Detektion mindestens so sensitiv, z. T. sogar sensitiver ist als die konventionelle Detektionsmethode.

Mit der TaqMan-PCR wurden folgende Verfahren zur Isolierung von Cryptosporidien-Oozysten aus Wasserproben kombiniert und auf ihre Eignung überprüft: Immunomagnetische Separation (IMS), Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) und Saccharose-Flotation (SF). Desweiteren erfolgte eine Kombination mit einer der PCR vorgeschalteten *in vitro* Exzystierung (IVE) als Surrogat für die Vitalität der eingesetzten Cryptosporidien. Die Kombinationen IMS-IVE-TaqMan-PCR, FACS-IVE-TaqMan-PCR und SF-IVE-TaqMan-PCR wurden im Hinblick auf ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich mit dem fluoreszenz-mikroskopischen Nachweisverfahren. Für diesen Vergleich wurden Konzentrate unterschiedlicher Wasserarten und Mengen mit Oozysten beimpft.

Als die geeignetste Isolierungsmethode für die anschließende Durchführung einer PCR erwies sich die IMS (Dynabeads, Dynal). Der Einsatz von FACS zur Isolierung der Oozysten aus Wasser-Konzentraten erwies sich von Anfang an als ungeeignet. Bevor die Oozysten aus den Wasser-Konzentraten gesortet werden konnten, mußten die Proben durch eine Saccharose-Flotation vorgereinigt werden. Anschließend mußten durch Filtration noch alle Partikel, die größer waren als 38 µm, entfernt werden, um ein Verstopfen der Sorterkapillaren zu verhindern. Durch diese Maßnahmen war der Verlust an Oozysten schon vor der eigentlichen Reinigung sehr hoch. Auch bei der Kombination mit der IVE konnten mit der IMS bessere Ergebnisse erzielt werden, d.h. nach IMS war die TaqMan-PCR häufiger positiv als nach SF. Der Vergleich von TaqMan-PCR und Mikroskopie nach IMS zeigte, daß mit beiden Detektionsmethoden eine ähnliche Sensitivität erreicht werden konnte. Bis zu ~10 Oozysten aus Oberflächen-Wasser-Konzentraten von 80-100 Litern konnten sowohl mit der PCR nach IMS als auch mit der Kombination IMS-Mikroskopie und SF-Mikroskopie regelmäßig nachgewiesen werden. ~1 Oozyste aus 100 Litern Oberflächenwasser-Konzentrat konnte mit keiner der Methoden detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Trinkwasser-Konzentrat erzielt: Bis zu ~10 Oozysten in 100 Litern, bzw. ~5 Oozysten in 10 Litern wurden regelmäßig nachgewiesen. Auch der Vergleich der zwei Detektionsmethoden in Umweltproben lieferte vergleichbare Ergebnisse. Aus 50 Litern Oberflächenwasser wurden die Oozysten mit Hilfe der IMS isoliert. Danach wurde je die Hälfte mikroskopisch und mit TaqMan-PCR untersucht. In 36 von 45 Fällen wurde mit beiden Methoden das gleiche Ergebnis erzielt. In 3 Fällen war die PCR positiv und die mikroskopische Methode negativ, in 6 Fällen konnten mikroskopisch noch geringe Konzentrationen an Oozysten detektiert werden, während die PCR negativ war. Die Ergebnisse zeigen, daß die PCR durchaus zu einer geeigneten Alternative zum mikroskopischen Nachweis werden kann.

## Design und Konstruktion interner kompetitiver PCR Kontrollen

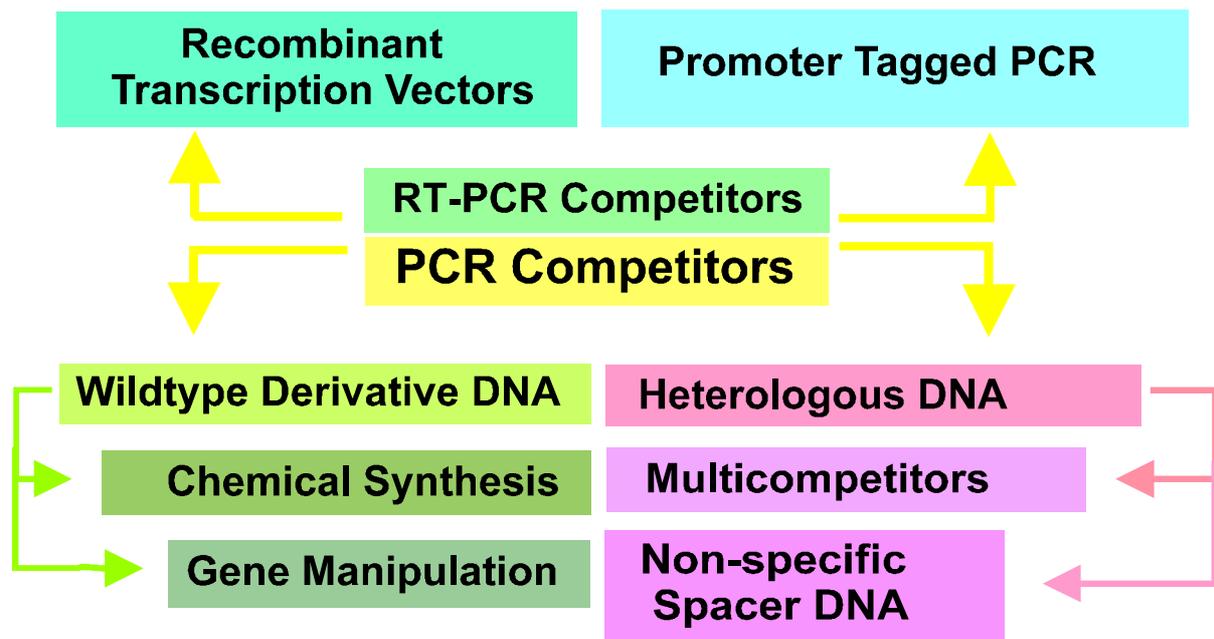
Manfred G. Bayer und Despina Tougianidou

4base lab GmbH advanced molecular analysis, Reutlingen

Kompetitive PCR oder RT-PCR ist die Methode der Wahl um gering konzentrierte Gene zu quantifizieren oder um inhibitorische Effekte während der Amplifikation zu kontrollieren. Es wird dargelegt, daß die Herstellung kompetitiver DNA und RNA Moleküle trotz ihrer strukturellen Komplexität relativ einfach zu bewerkstelligen ist.

Kompetitormoleküle fallen in zunächst zwei Klassen: DNA-Templates für die kompetitive PCR und RNA-Templates für die kompetitive RT-PCR. Beide Klassen lassen sich hinsichtlich des Ursprungs ihrer Nukleotidsequenz weiter unterteilen in zum Target heterologe Moleküle mit eingeführten Targetsequenzen und in eine Gruppe deren Nukleotidsequenz mit Ausnahme kleiner Modifikationen weitgehend dem des Targets entspricht. Eine weitere Unterteilung dieser Gruppe erfolgt hinsichtlich des Herstellungsprinzips. Eine chemische Synthese ist vor allem für kürzere Oligonukleotide bis zu 150 Basen eine kostengünstige Alternative, allerdings nimmt die Sequenzgenauigkeit mit der Länge dramatisch ab und damit der Postsyntheseaufwand zur Identifikation des korrekten Moleküls entsprechend zu. Hingegen können mit gentechnischen Methoden Kompetitormoleküle von nahezu beliebiger Länge und mit zahlreichen Modifikationen hergestellt werden. Die Grundprinzipien des Kompetitor-Designs und die wesentlichen molekularbiologischen Konzepte zu deren Realisierung werden diskutiert.

## Design Strategies



## Referenten

### **Dr. rer. nat. Manfred Bayer**

4base Lab GmbH  
Advanced Molecular Analysis  
Markwiesenstr. 55  
D-72770 Reutlingen  
Tel.: +49-(0)7121-93 75 57  
Fax.: +49-(0)7121-93 75 58  
E-mail: [analysis@baselab.de](mailto:analysis@baselab.de)  
<http://www.baselab.de>

### **Dipl.-Biol. Kathrin Bischoff**

Umweltbundesamt  
Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene  
Dienstgebäude Bad Elster  
Heinrich-Heine-Straße 12  
D-08645 Bad Elster  
Tel.: +49-(0)37437-76-353  
Fax.: +49-(0)37437-76-219  
E-mail: [kathrin.bischoff@uba.de](mailto:kathrin.bischoff@uba.de)  
<http://www.umweltbundesamt.de>

### **Dipl.-Biol. Volker Gornik**

Universität Bonn  
Hygiene-Institut  
Sigmund-Freud-Str. 25  
D-53105 Bonn  
Tel.: +49-(0)228-287-6899  
Fax.: +49-(0)228-287-6763  
E-mail: [vgornik@mail.meb.uni-bonn.de](mailto:vgornik@mail.meb.uni-bonn.de)  
<http://www.meb.uni-bonn.de/hygiene/>

### **Dr. rer. nat. Panagiotis Karanis**

Universität Bonn  
Institut für Medizinische Parasitologie  
Sigmund-Freud-Str. 25  
D-53105 Bonn  
Tel.: +49-(0)228-287-4336  
Fax.: +49-(0)228-287-4330  
E-mail: [karanis@parasit.meb.uni-bonn.de](mailto:karanis@parasit.meb.uni-bonn.de)  
<http://www.meb.uni-bonn.de/parasitologie/>

### **Dipl.-Biol. Petra Krüger**

Universitätsklinikum Tübingen  
Hygiene-Institut  
Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene  
Wilhelmstr. 31  
D-72074 Tübingen  
Tel.: +49-(0)7071-29-85229  
Fax.: +49-(0)7071-29-3011  
E-mail: [petra.krueger@uni-tuebingen.de](mailto:petra.krueger@uni-tuebingen.de)  
<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kyh>

**Dr.-Ing. Andreas Nahrstedt**

IWW  
Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung  
Gemeinnützige GmbH  
Institut an der Gerhard-Mercator-Universität-GH Duisburg  
DVGW Institutsverbund  
Moritzstr. 26  
D-45476 Mülheim an der Ruhr  
Tel.: +49-(0)208-40303-330  
Fax.: +49-(0)208-40303-80  
E-mail: nahrstedt@uni-duisburg.de  
<http://www.uni-duisburg.de/iww>

**Dr. rer. nat. Hubert Schreiber**

Mainova AG  
Abteilung Trinkwassergüte  
D-60623 Frankfurt am Main  
Tel.: +49-(0)69-213-26352  
Fax.: +49-(0)69-213-23113  
E-mail: h.schreiber@mainova.de  
<http://www.mainova.de>

**Dr. rer. nat. Christiane Wagner-Wiening**

Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg  
Wiederholdstr. 15  
D-70174 Stuttgart  
Tel.: +49-(0)711-1849-285  
Fax.: +49-(0)711-1849-242  
E-mail: Parasitologie@lga.bwl.de  
<http://www.landesgesundheitsamt.de>

**Dr. med. Albrecht Wiedenmann**

Universitätsklinikum Tübingen  
Hygiene-Institut  
Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene  
Wilhelmstr. 31  
D-72074 Tübingen  
Tel.: +49-(0)7071-29-82073  
Fax.: +49-(0)7071-29-3011  
E-mail: albrecht.wiedenmann@uni-tuebingen.de  
<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kyh>

## **Verteilerliste**

- 1-3 Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück, Dr. S. Heiden
- 4-6 Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie  
Forschungszentrum Karlsruhe, Projektträger Wassertechnologie, Außenstelle Dresden, Dr. D. Möller
- 7 Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, Prof. Dr. E. Zrenner
- 8-10 Fachgruppe Umwelthygiene/Toxikologie der DGHM,  
Prof. Dr. M. Wilhelm, Bochum, Prof. Dr. M. Exner, Bonn, PD Dr. R. Schulze-Röbbecke, Düsseldorf
- 11-12 Deutscher Verein des Gas- und Wasserfachs, DVGW, Bonn, Dr. B. Mendel, Dr. H. Schreiber
- 13-22 Referenten
- 23-24 Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart, Dr. C. Sacré
- 25 Sozialministerium Baden-Württemberg, Stuttgart, Dr. B. Kouros
- 26 Umweltministerium, Baden-Württemberg
- 27 Ministerium für den Ländlichen Raum, Baden-Württemberg
- 28-29 Landratsamt / Gesundheitsamt Tübingen
- 30 Bibliothek Hygiene-Institut der Universität Tübingen
- 31-40 Reserve