

Vergleich mikrobiologische Bestimmung (Plattierung auf Selektivmedien) und molekularbiologische Bestimmung (DNA-Isolierung und PCR/qPCR von „Genen“)

Generelles Problem bei qPCR:

- Wie viele Genkopien sind in einer Zelle vorhanden? → „Divisor“ durch den das Ergebnis geteilt werden muß (Genkopien pro Volumen)
- Sind die Gene auf high-copy-number-Plasmiden lokalisiert? → Divisor kann bis zu 10^3 - 10^4 betragen
- Welches Gen ist hoch-spezifisch für eine Gattung/Art?
- Die Antibiotikaresistenzvermittelnden Gene kommen idR nicht nur in einer Gattung/Art vor sondern in vielen unterschiedlichen → deutlich höhere Befunde

Ergebnisse:

- **Gesamtzellzahlbestimmung: gute Korrelation zwischen DAPI und qPCR von 16 S rDNA in allen Proben (Kläranlagen, RBF, Freiland)**
- **Lebendzellzahlbestimmung durch Plattierung bis zu 2 log-Stufen niedriger als durch qPCR → nur „vermehrungsfähige“ Keime werden erfasst d.h. Grenzwerte nach Badegewässerrichtlinie können eingehalten werden; Aber: nicht alle Keime die nicht vermehrungsfähig sind haben ihr pathogenes Potential verloren**

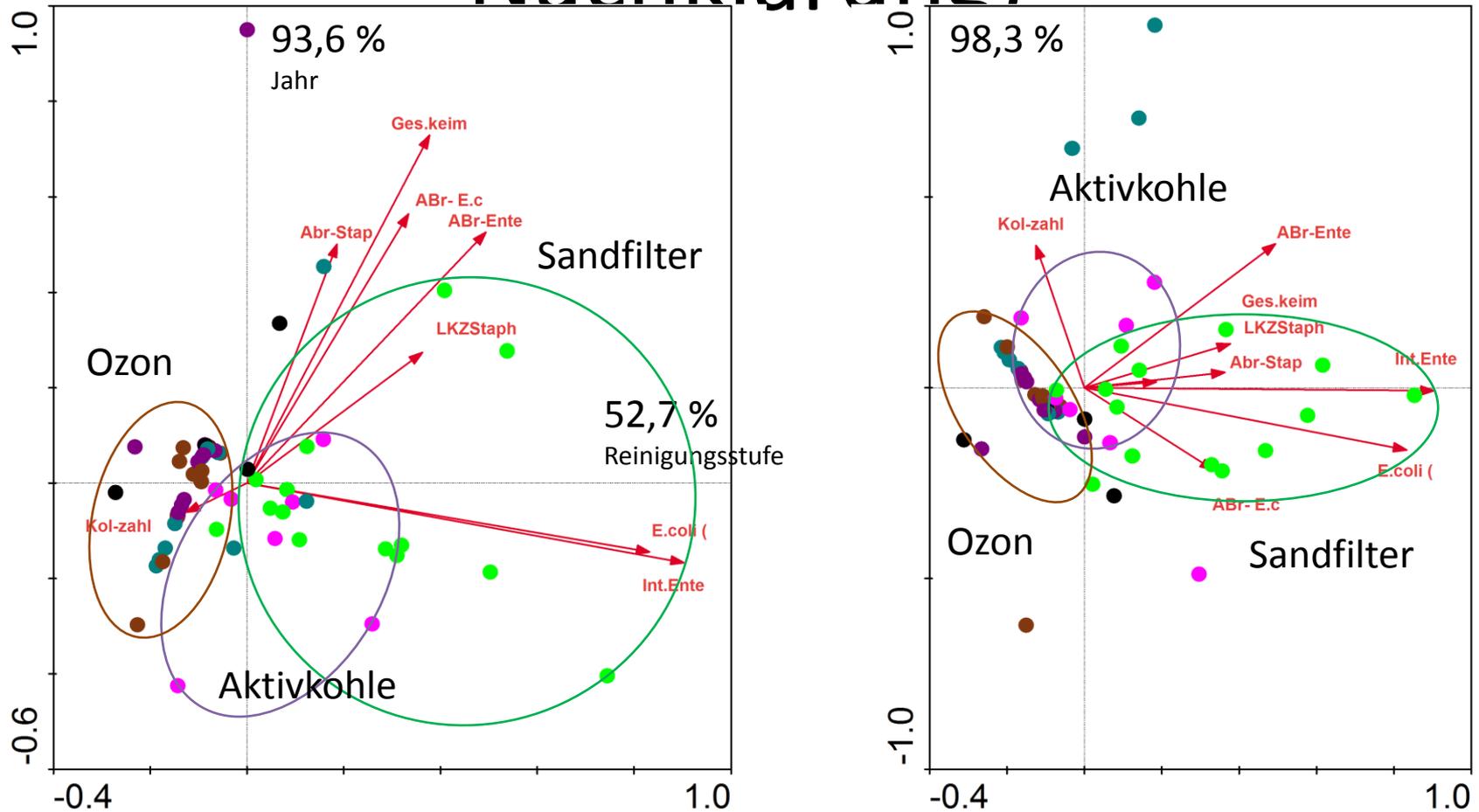
Ergebnisse:

- *E. coli*: KBE-Bestimmung mittels Selektivmedien als Standardmethode etabliert, qPCR mittels *uidA*-Gen führt zu höheren Befunden (bis zu 2 log-Stufen); Nachweis von AB-resistenten *E. coli* (ESBL) mittels qPCR von *bla*_{TEM} korreliert rel. gut → ESBL bisher nur bei *Enterobacteriaceae* gefunden!
- Enterokokken: KBE-Bestimmung mittels Selektivnährmedium als Standardmethode etabliert, qPCR mittels spez. 16 S rDNA führt zur guten Korrelation im Vergleich zur KBE-Bestimmung; *ermB* (häufig in der Literatur und auch innerhalb von RiSKWa als Markergen für AB-Resistenz verwendet) eignet sich nicht zum Nachweis von AB-resistenten Enterokokken → viele log-Stufen höhere Genkopienzahl; kommt z.B. auch bei Staphylokokken vor; eignen sich eher nicht da schon hohe intrinsische AB-Resistenz
- Staphylokokken: KBE-Bestimmung mittels Standardverfahren in Umweltproben existiert nicht, musste optimiert werden; qPCR mittels spez. 16 S rDNA führt zur guten Korrelation im Vergleich zur KBE-Bestimmung; *mecA* (häufig in der Literatur oder innerhalb von RiSKWa als Marker für MRSA verwendet) führte zu keinem Ergebnis da kein einziger MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) in allen untersuchten Proben isoliert wurde, das Gen aber in rel. hohen Kopienzahlen nachgewiesen werden konnten; AB-Resistenzgene gegenüber Makrolide (zweithäufigste AB-Resistenz) wie z.B. *erm*-Gene liefern deutlich höhere Genkopienzahlen als durch Plattierung ermittelt; selbst *erm(43)*, das bisher nur bei einer Staphylokokken-Spezies nachgewiesen wurde eignet sich auch nicht als Markergen, da bis zu 5 log-Stufen höhere Genkopienzahlen (hauptsächlich im Freiland) gefunden wurden; gleiches gilt auch für die klinisch relevanten *erm(A)*- und *erm(C)*-Gene

	Effektivste Technologie	Bewertung der PAK-Stufe in Ravensburg	Bewertung des RBF Tettang	Empfehlung der 4. Reinigungsstufe
Keime/ AB-resistente Keime* (gilt für E. coli, Entero-kokken, Staphylokokken! Keine Aussage über Viren oder Parasiten möglich)	<u>Ozonung</u> Ist der Keim-eliminierende Schritt Achtung: Nachgeschaltete Filter können zur Wiederverkeimung führen → Es kommt zum %ualen Anstieg von AB-resistenten Enterokokken und zu einer Abnahme von AB-resistenten <i>E. coli</i> und Staphylokokken nach der Ozonung	Beurteilung vorher/nachher Freiland anhand von 3 Proben: Kein statistisch signifikanter Unterschied Ergebnisse aus den qPCR-Analysen bestätigen die Plattierungsergebnisse Adsorption an PAK generell für Keime ungeeignet; evtl. die Flockung?? Neutral (0) PAK+SF höhere Elimination als SF alleine, aber nicht so hoch wie Ozonung	Rückhalt von Keimen/AB-resistenten Keimen in der Größenordnung von 2-3 log-Stufen; Ergebnisse aus den qPCR-Analysen bestätigt Rückhalteleistung nicht mit einer KA vergleichbar da schon teilgereinigtes Abwasser verwendet wird 1-2	Solange es keine Grenzwerte für Keime/AB-resistente Keime gibt ist eine Empfehlung nutzlos → verursacht nur Kosten Langfristig erforderlich wenn das „hygienische Potential“ bzw. das „Resistom“ als Verschmutzung anerkannt wird

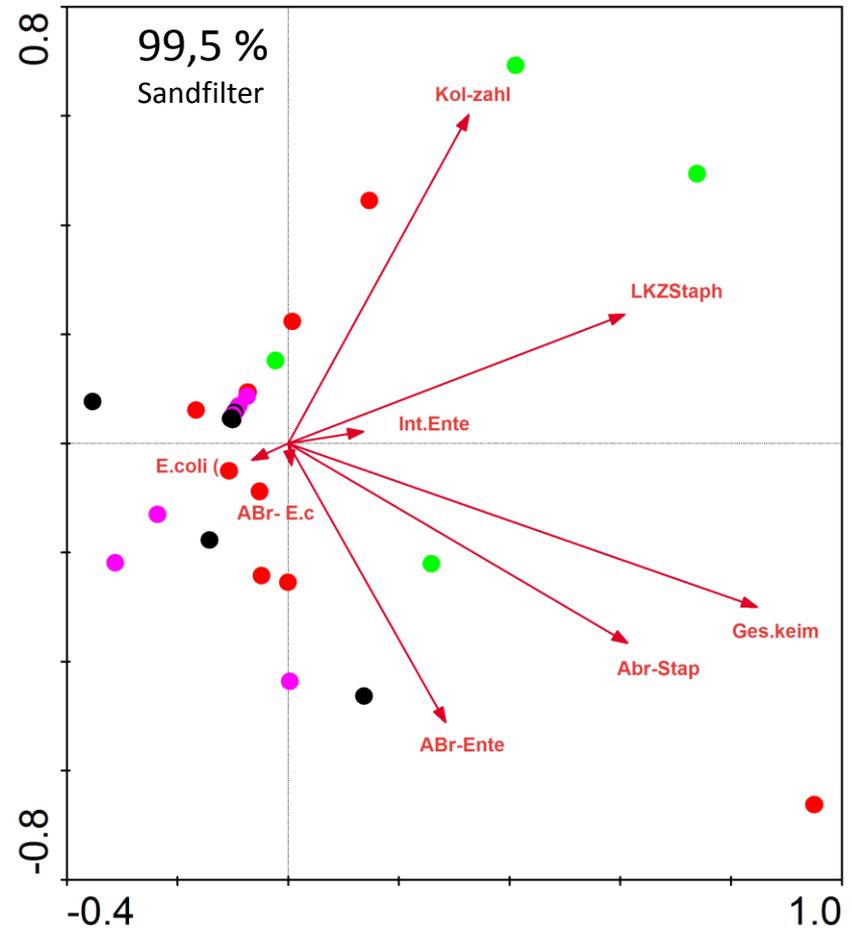
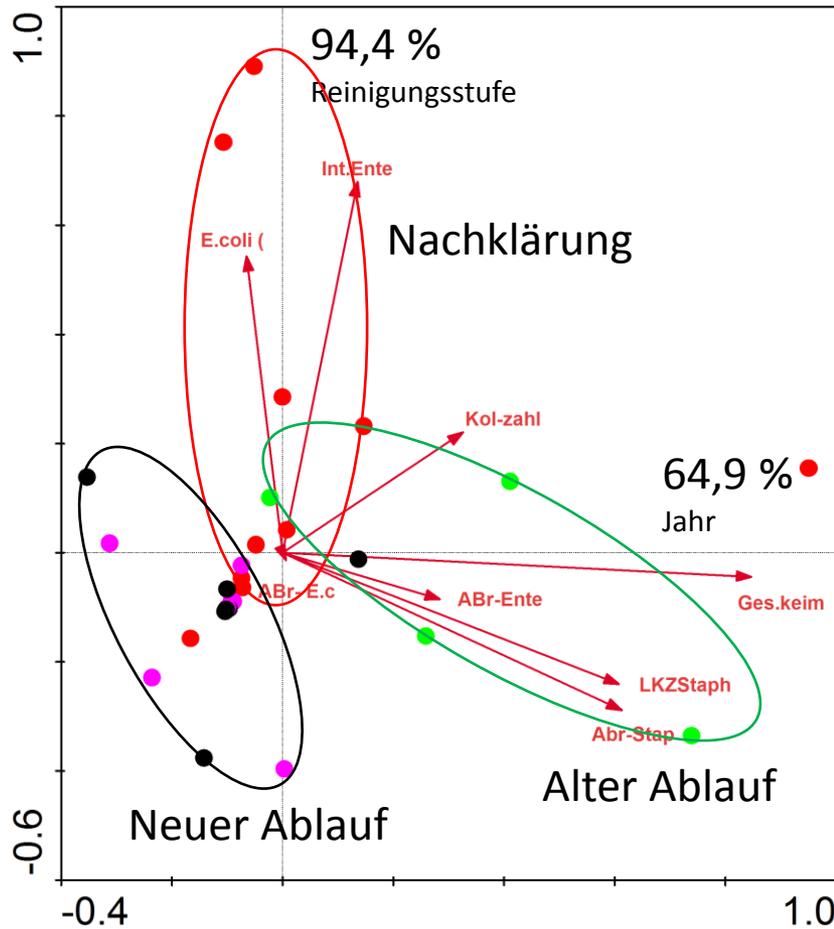
*Es besteht kein Unterschied zwischen Keimen und AB-resistenten Keimen hinsichtlich der in SAP-verwendeten Technologien

Keime Eriskirch (ohne Zulauf und Nachklärung)



Zulauf: blau, Nachklärung: rot, Sandfilter: grün, Aktivkohle: violett, Sandfilter + Ozon + Aktivkohle: schwarz, Ozon: braun, Ozon + Aktivkohle: lila, Ozon + Sandfilter: türkis

Keime Langwiese (ohne Zulauf)



Zulauf: blau, Nachklärung: rot, Sandfilter: grün,
 Aktivkohle: violett, Sandfilter + Aktivkohle: schwarz