

Analytik von *E. coli* und Coliformen nach dem neuen ISO - Referenzverfahren

Dr. Steffen Schneider

Zentrallabor - Mikrobiologie
Hessenwasser GmbH & Co. KG

Besonderer Dank an
Bernd Lange, IWW Mülheim und
Dr. Rolf Oßmer, Merck Darmstadt
für die Überlassung von Daten und Folien

1

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Aktuelle DIN EN ISO 9308-1:2000 Laktose - TTC – Tergitol - Agar

- Quantitatives Referenzverfahren seit 2003
- **Nicht** nach DIN V 13843 **validiert**
- Ursprünglich französisches Verfahren (**48 h!**)
- Nachweis (18-24h; 36°C):
 - Coliforme: Säure aus Laktose und Oxidase-negativ
 - *E. coli*: Coliforme, die bei 44°C Indol-positiv sind

2

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

E. coli auf TTC-Tergitol-Agar (ISO 9308-1)



3

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

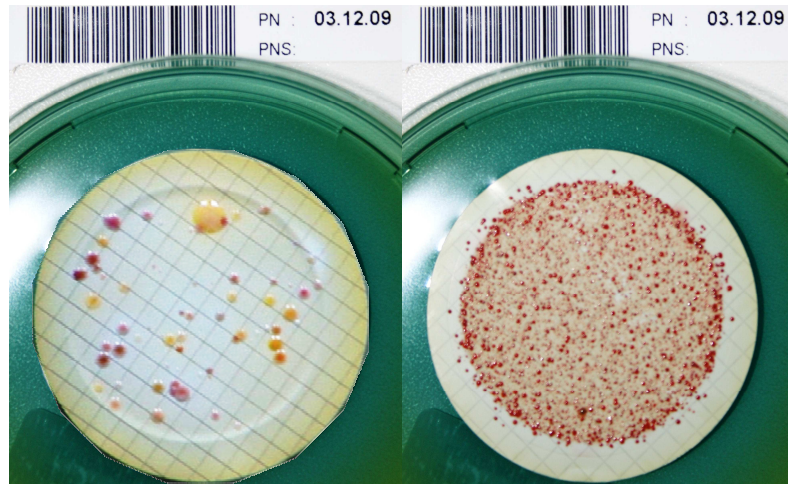
Laktose - TTC – Tergitol – Agar - Nachteile und Probleme -

- Geringe Selektivität (→ Begleitflora)
- Nur eingeschränkt geeignet für
 - Rohwässer
 - Badegewässer (→ EU-Richtlinie!)
- Falsch – negative *E. coli* möglich
 - 2,5% der Stämme sind nicht thermotolerant (44°C)*
 - 3,9% der Stämme sind Indol – negativ*
 - 8% der Stämme sind fermentieren keine Laktose*
- Falsch – positive *E. coli* möglich
 - Indol – positive, thermotolerante Stämme von *Klebsiella oxytoca*

4

* Mitt. C. Fricker 13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Coliforme und Begleitflora auf TTC-Tergitol-Agar (ISO 9308-1)



5

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Konsequenz: Normungsaktivität ISO

- **Technical Corrigendum** als Sofortmaßnahme (DIN EN ISO 9308-1 Ber.1:2009-07)
 - Anwendungsbereich klarer definiert (Scope)
 - Empfehlung: β -Glucuronidase-Test (99,9% der Stämme von *E. coli* sind β -GUR - positiv)*
 - Oxidase-Reagenz
- **Kriterienkatalog** mit Definition (London, 2006-1)
- Suche nach geeigneten **Alternativverfahren**
 - Nennung von 17 verschiedene Verfahren
 - Die meisten erfüllen Kriterien nicht

6

* Mitt. C. Fricker 13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

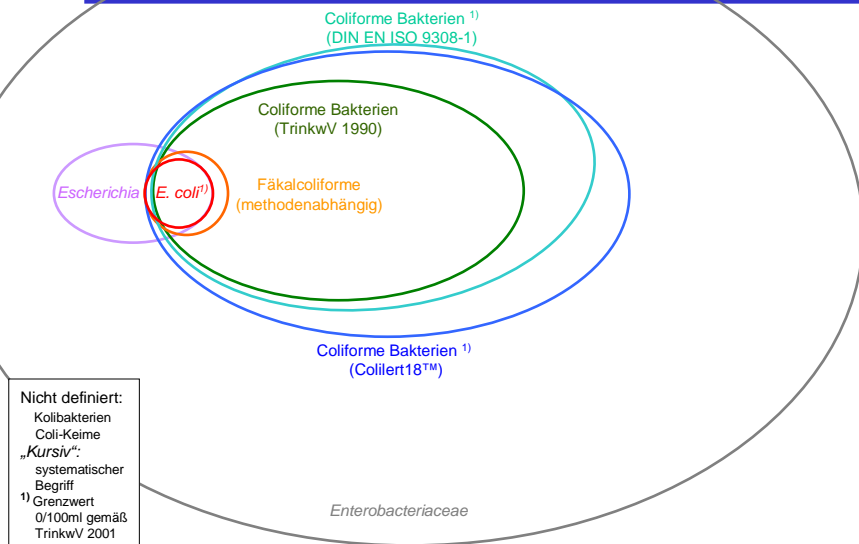
ISO Kriterien für ein neue(s) Verfahren

- Übereinstimmung mit wissenschaftlichen Definitionen
(s. auch Anhang A der DIN EN ISO 9308-1:2000):
 - Coliforme = β -**GAL**-positive *Enterobacteriaceae*
 - *E. coli* = β -**GAL** und β -**GUR**-positive *Enterobacteriaceae*
- sensitiv und selektiv
- angemessene Nachweisgrenze
- angemessene Validierungsdaten (ISO/TR 13843)
- Geringe Analysendauer
- Viele Wasser-Matrices abgedeckt
- Verfügbarkeit

Harmonisierung der Verfahren 9308-X

- **ISO/CD 9308-1 (Membranfiltration):**
Chromogen Coliformen Agar CCA
(ehem. Chromocult® Coliformenagar)
Nachweis: β -GAL und β -GUR
- **ISO/FDIS 9308-2 (Flüssiganreicherung):**
Colilert18™/Quanti Tray™
Nachweis: β -GAL und β -GUR
- **ISO 9308-3 (MPN; nur *E. coli*):**
Mikrotiterplatten
Nachweis: β -GUR

Coliforme Bakterien und *E. coli*

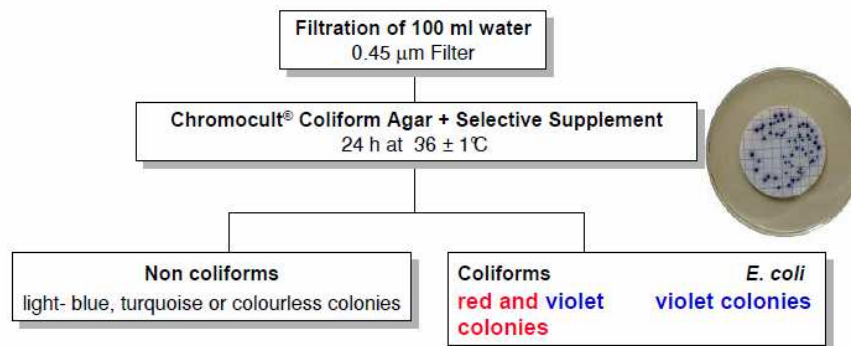


9

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Chromogen Coliformen Agar (CCA): WD 9308-1

Water Testing: Proposed Method



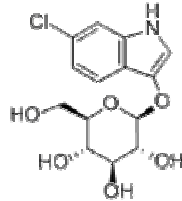
10

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Chromogen Coliformen Agar (CCA): Enzymatische Nachweisreaktionen

hessenwasser

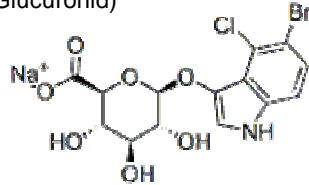
6-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
(Salmon-Gal)



β -D-Galactosidase

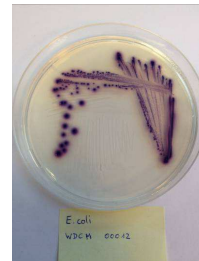


5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure
(X-Glucuronid)



β -D-Glucuronidase

+



11

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

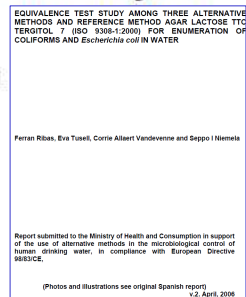
Chromogen Coliformen Agar (CCA): WD 9308-1

hessenwasser

**Chromocult® Coliform Agar + 5 mg/l Cefsulodine
+ 5 mg/l Vancomycin**

Accepted and approved as alternative
method according to the EU Directive on
Drinking Water in Spain (2006).

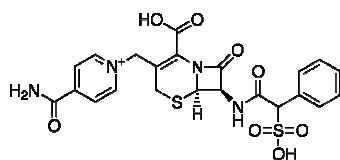
➔ **Validierungsdaten!**



12

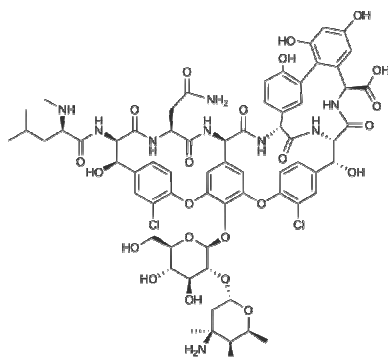
13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Antibiotika gegen Begleitflora



Cefsulodin

wirksam gegen Gram-negative
Aerobier, insbesondere
Pseudomonas aeruginosa
und *Aeromonas sp.*



Vancomycin (!)

gut wirksam gegen
Gram-positive Bakterien

13

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

Vorstudie IWW / Merck: Einfluss Antibiotika und Membranfilter

Table : CFU of *E. coli* and coliform bacteria on different media depending on the usage of different cellulose nitrate filters

Strain Media / filter	<i>Escherichia coli</i> RV Aurich [CFU/100 ml]		<i>Escherichia coli</i> DSM 787 [CFU/100 ml]		<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039 [CFU/100 ml]		<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV Aurich [CFU/100 ml]	
Colilert-18	78,2		78,2		94,5		101,3	
Nutrient Broth agar / Pall	84	83	94	95	74	89	96	93
Nutrient Broth agar / Whatmann	81	73	93	87	67	75	81	86
Nutrient Broth agar / Sartorius	75	88	90	79	78	95	84	92
CCA / Pall	65	95	93	109	97	89	72	94
CCA / Whatmann	67	74	35	27	64	62	86	68
CCA / Sartorius	66	75	89	98	84	74	88	89
CCA & AB / Pall	65	73	67	43	52	68	59	45
CCA & AB / Whatmann	19	9	0	0	13	11	3	2
CCA & AB / Sartorius	56	66	27	18	66	66	29	15
TTC / Pall	84	74	83	95	92	97	83	91
TTC / Whatmann	69	74	83	95	77	80	94	66
TTC / Sartorius	81	87	79	106	71	74	77	89

14

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012



Vorstudie IWW / Merck: Ergebnisse



- Keine Hemmung der Zielkeime durch Antibiotika beim Ausplattieren
- Kein Einfluss durch unterschiedliche Medien-Chargen
- Hemmung der Zielkeime durch **Vancomycin** bei Membranfiltration
- Unterschiedliche Hemmung abhängig von Hersteller und von Charge der Membran
- Hemmeffekte auch bei natürlichen Proben
- Vorwaschen der Membran hatte keinen Einfluss auf die Hemmwirkung

15

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012



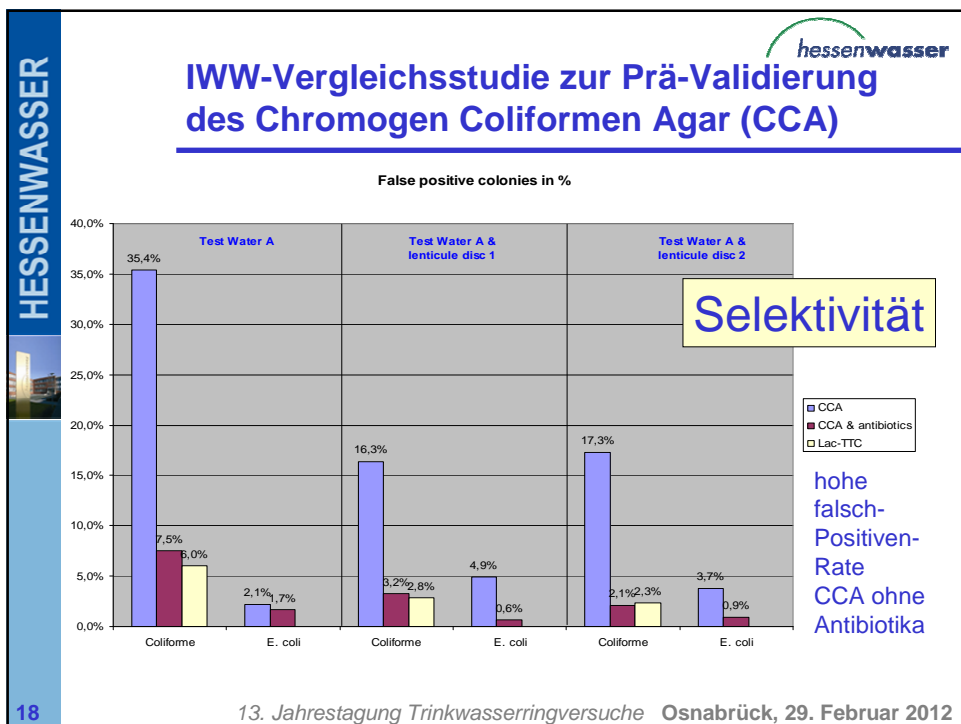
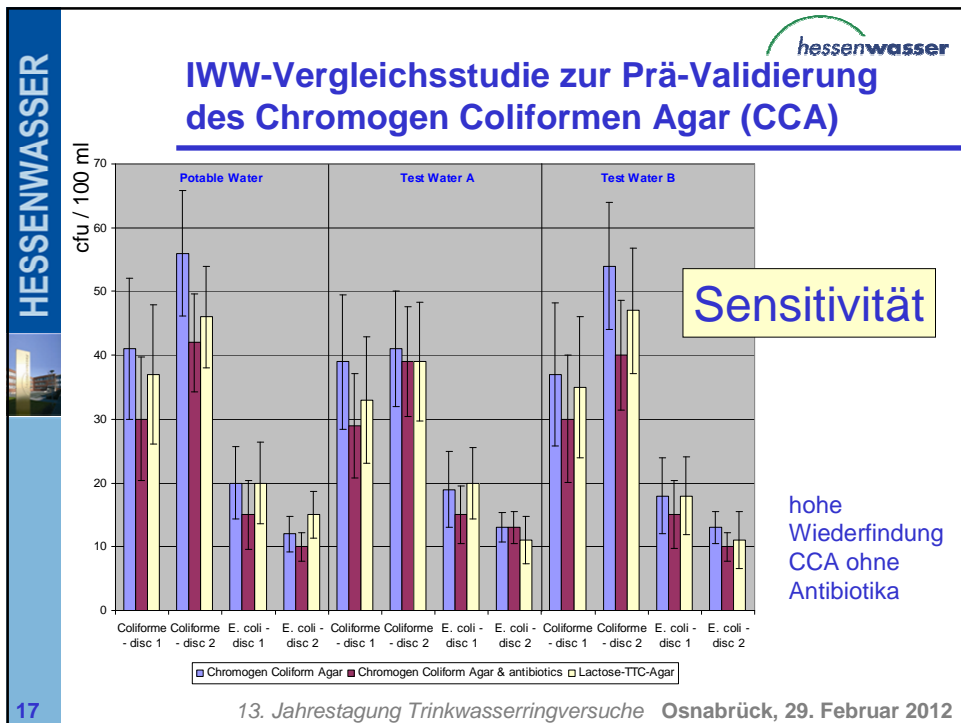
IWW-Vergleichsstudie zur Prä-Validierung des Chromogen Coliformen Agar (CCA)



- 29 Labore aus 13 Ländern
- 3 verschiedene Medien
 - Laktose – TTC - Tergitol
 - CCA ohne Antibiotika
 - CCA mit Antibiotika
- 3 verschiedene Wässer
 - **Trinkwasser**
 - natürlich kontaminiertes Wasser (**Testwasser A**)
 - Trinkwasser mit non - Coliformen kontaminiert (**Testwasser B**)
- Proben gespikt mit *E. coli* / Coliformen (1:1 u. 1:3)

16

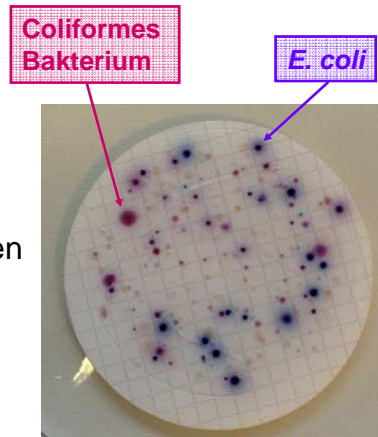
13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012



IWW-Vergleichsstudie zur Prä-Validierung des Chromogen Coliformen Agar (CCA)

■ Ergebnisse

- 😊 Statistische Auswertung ergab belastbare Werte
- 😊 Hohe Wiederfindungsraten für CCA ohne Antibiotika
- 😞 Geringe Selektivität für CCA ohne Antibiotika



19

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

IWW-Vergleichsstudie zur Prä-Validierung des Chromogen Coliformen Agar (CCA)

■ Konsequenzen

- Für Wasser mit hoher Begleitflora Antibiotika nötig
 - ◆ Aber: **Membraneffekte** noch nicht geklärt!
- Bei Wasser mit geringer Begleitflora Antibiotika nicht notwendig oder sogar nachteilig
- Für Coliformen-Nachweis auf CCA ohne Antibiotika Oxidase-Test notwendig (*Aeromonas sp.!*)
- ➔ ISO -Resolution:
 - Es werden 2 Verfahren genormt:
 - CCA ohne (9308-1) und CCA mit Antibiotika (9308-4)

20

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012



Chromogen Coliformen Agar (CCA) - Ausblick -



- Aktuelle Version **ISO/CD 9308-1**
(ohne Antibiotika, (21 ± 3) h bei $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, Oxidase-Nachweis)
- Ergebnisse der Validierungsstudie April 2012
- **DIS** – Umfrage im April 2012
- **FDIS** – Umfrage noch in 2012 erwartet, danach **EN ISO**
(„parallel voting“), dann **DIN EN ISO** (2012/2013)
- Überarbeitung der **ISO 7704:1985**:
Wasserbeschaffenheit; Bewertung von Membranfiltern
für mikrobiologische Analysen dringend notwendig
 - Studien erforderlich
- Beginn der Arbeit an **ISO/NWI 9308 – 4 (?)**
(mit Antibiotika) für Mitte 2012 vorgesehen

21

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012



Analytik von *E. coli* und Coliformen nach dem neuen ISO – Referenzverfahren - Resümee -



- Laktose-TTC-Tergitol-Agar wird begründet als Referenzverfahren abgelöst
- Künftig einheitliche Reaktionen bei allen ISO-Verfahren zum Nachweis von *E. coli* / Coliformen
- Problem der Zielkeim – Hemmung durch Antibiotika abhängig von Membranfiltern ist noch ungelöst
- Wunsch „Ein Verfahren für alle Wässer“ ließ sich nicht erfüllen; daher
 - CCA ohne Antibiotika (sensitiv) für „Trinkwasser“ (Referenzverfahren 9308-1)
 - CCA mit Antibiotika (selektiv) für „Rohwasser“ (9308-4)

22

13. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Osnabrück, 29. Februar 2012

