



Nova metoda za določanje virov fekalnega onesnaženja voda

Matjaž Retelj



NACIONALNI LABORATORIJ ZA
ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

Center za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja

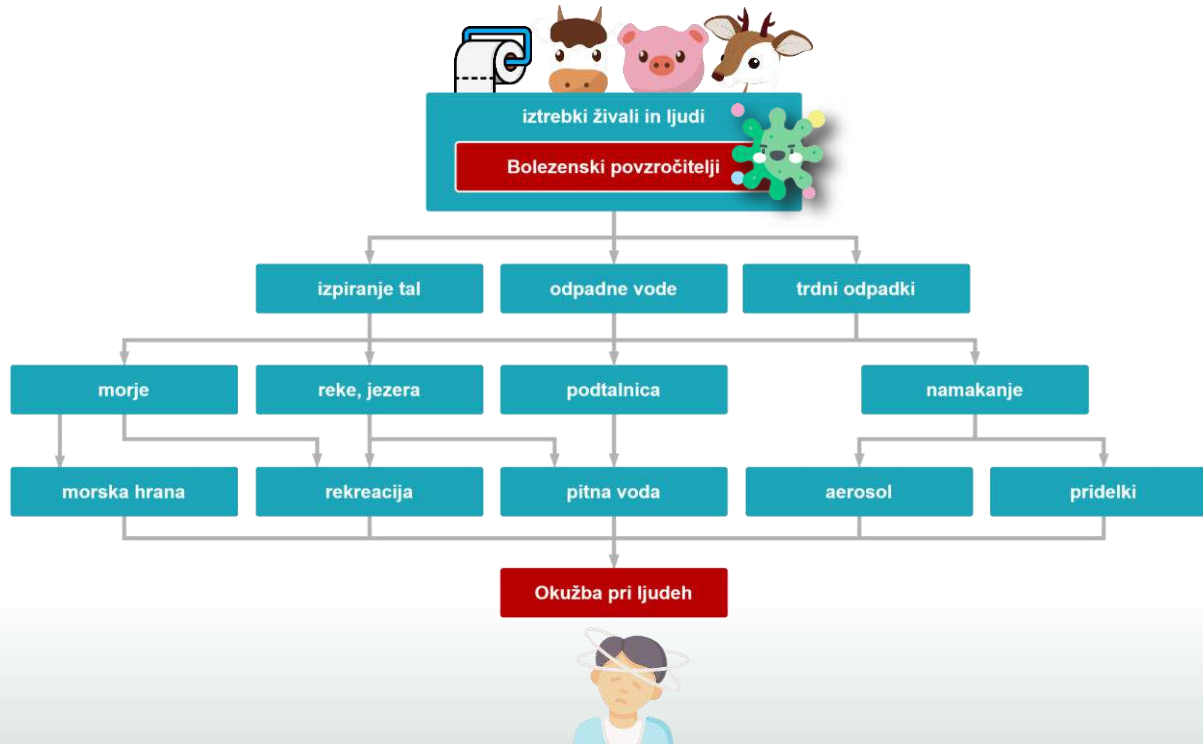




Table 4.1

Numbers of faecal pathogens and indicator organisms in raw sewage

Pathogen/indicator organism	Disease or role	Microbes/L
Virusus		
Adenoviruses	Respiratory disease, gastroenteritis	10 ⁶ –10 ⁸ GC
Astrovirus	Gastroenteritis	10 ⁶ –10 ⁷ GC
Hepatitis A virus	Hepatitis	Undetected to 10 ⁶ GC
Hepatitis E virus	Hepatitis	Undetected to 10 ⁶ GC
Norovirus (and other caliciviruses)	Diarrhoea, vomiting	10 ⁶ –10 ⁸ GC
Enterovirus	Polioymyelitis, mild febrile illness, myocarditis, meningitis	Undetected to 10 ⁶ (cell culture)
Rotavirus	Diarrhoea, vomiting	10 ⁶ –10 ⁸ GC
F+ coliphages	Indicator organism	10 ⁶ –10 ⁷ PFU
Somatic coliphages	Indicator organism	10 ⁶ –10 ⁸ PFU
Bacteria		
<i>Campylobacter</i> spp.	Gastroenteritis	10 ⁶ –10 ⁸ MPN 10 ⁶ GC
<i>Escherichia coli</i>	Indicator organism (except specific pathogenic strains)	10 ⁶ –10 ⁸ CFU or MPN
Intestinal enterococci	Indicator organism	10 ⁶ –10 ⁷ CFU or MPN
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis	Up to 10 ⁷ MPN
<i>Shigella</i> spp.	Bacillary dysentery	10 ⁶ –10 ⁸ MPN
Vibrios such as <i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> and <i>V. vulnificus</i>	Gastroenteritis	<10–10 ⁷ MPN
Parasite protozoa*		
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Diarrhoea	10–10 ⁴ oocysts
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebic dysentery	Undetected to 100 cysts
<i>Giardia duodenalis</i>	Diarrhoea	10–10 ³ cysts
Helminths†		
<i>Ascaris</i> spp.	Ascariasis	5–450 ova
<i>Ancylostoma</i> spp. and <i>Necator</i> sp.	Anaemia	5–190 ova
<i>Trichuris</i> spp.	Diarrhoea	10–40 ova

CFU: colony forming unit; GC: gene copies; MPN: most probable number; PFU: plaque forming unit.

* Croxan et al. (2013); Leonard et al. (2018)

† Parasite numbers vary greatly as a result of differing levels of endemic disease in different regions.

Sources: Rusiniol & Girones (2017); WHO (2018); Garcia-Aljaro et al. (2019); <https://www.who.int/news-room/fact-sheets>.

Table 1. Etiological agents of bathing illness, probable sources and transmission pathways. GI = gastrointestinal [7,19].

Agent	Illness	Probable Source	Transmission Pathway
<i>Campylobacter</i> spp.	Gastroenteritis, fever	Human and animals	Ingestion
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Bloody diarrhoea, abdominal cramp	Human and animals	Ingestion
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis, abdominal pain	Human and animals	Ingestion
<i>Legionella</i> spp.	Pneumonia, gastroenteritis	Natural	Inhalation
<i>Leptospira</i> spp.	Fever, headache, vomiting, jaundice	Natural and animals	Ingestion
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis, fever, pain	Human and animals	Ingestion
<i>Mycobacterium avium</i>	Respiratory disease	Natural	Inhalation/contact
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infection in pre-existing open wound	Natural	Wound infection
<i>Shigella</i> spp.	Bacillary dysentery, abdominal pain	Human	Ingestion
Adenovirus	Gastroenteritis, respiratory disease	Human	Ingestion, inhalation
Noroviruses	Gastroenteritis	Human	Ingestion
Rotaviruses	Gastroenteritis	Human	Ingestion
Coxsackievirus	Mild febrile illness to myocarditis	Human	Ingestion
Enteroviruses	Central nervous system, ocular and respiratory infections	Human	Ingestion
Echovirus	Diarrhoea, secretions from the eyes or throat	Human	Ingestion
Hepatitis A virus	Liver disease	Human	Ingestion
Hepatitis E virus	Liver disease	Human and animals	Ingestion
<i>Cryptosporidium</i>	Diarrhoea, abdominal pain, fever	Human and animals	Ingestion
<i>Giardia</i>	Diarrhoea, abdominal cramp	Human and animals	Ingestion
<i>Microsporidia</i>	GI illness, diarrhoea	Human and animals	Ingestion
<i>Nosferia foetleri</i>	Meningoencephalitis	Natural	Contact
<i>Schistosoma</i> spp.	GI illness, haematuria	Human	Ingestion, Contact
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebic dysentery	Human	Ingestion



GUIDELINES ON RECREATIONAL WATER QUALITY

Volume 1 Coastal and Fresh Waters

Priloge k evropskim vodnim direktivam
MVLER ÖVYTLA
ÖNDELIMES OM RECREATION



Review

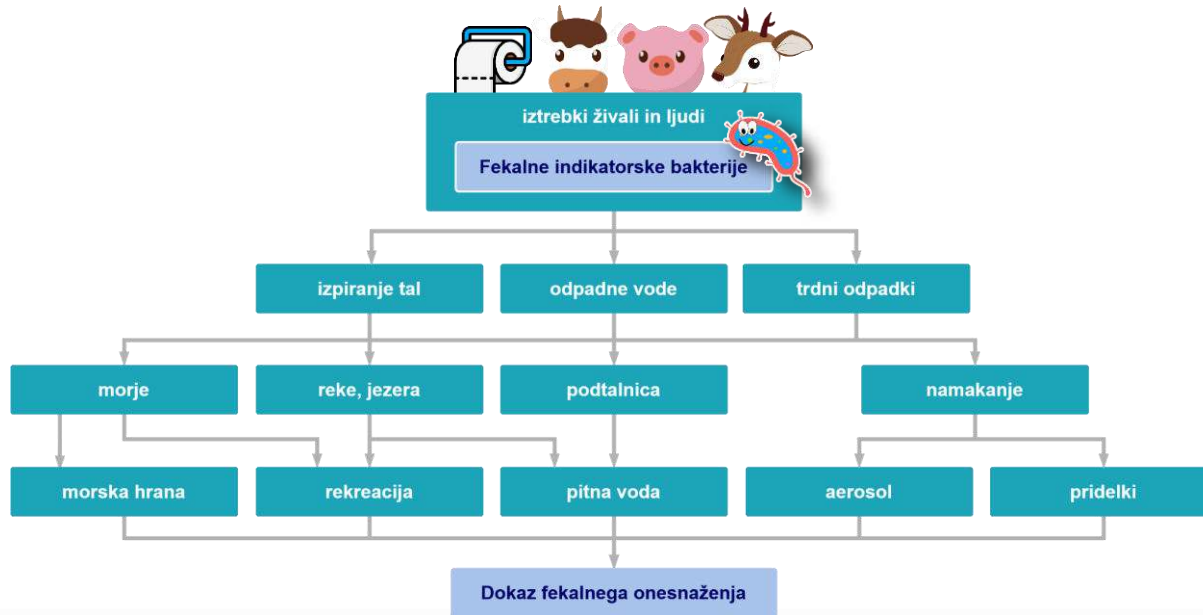
Bathing Water Quality Monitoring Practices in Europe and the United States

Ananda Tiwari ^{1,*}, David M. Oliver ^{2,†}, Aaron Bivins ³, Samendra P. Shrestha ⁴ and Tarja Pitkänen ^{1,5,‡}

- Expert Microbiology Unit, Finnish Institute for Health and Welfare, P.O. Box 95, FI-70701 Kuopio, Finland; tarja.pitkanen@thl.fi
- Biological and Environmental Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, UK; david.oliver@stirling.ac.uk
- Department of Environmental Health Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, UK; aaron.bivins@stirling.ac.uk
- Department of Environmental Health Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, UK; samendra.p.shrestha@stirling.ac.uk
- Department of Environmental Health Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, UK; tarja.pitkanen@thl.fi

*Correspondence: a.tiwari@thl.fi







source tracking

določanje vira onesnaženja

microbial source tracking (MST)

določanje vira onesnaženja s pomočjo mikrobov



Table 1 – Fecal source tracking methods that have undergone comparative testing and/or testing with blind samples

Method	Discrimination		Performance		References ^d
	Human vs. non-human ^a	Individual species ^b	Compared to other methods ^c	Tested with blind samples ^c	
<i>Culture-based, library-dependent methods</i>					
Ribotyping		Any	1, 2	1	1-5
PFGE		Any	1	1	1-3
REP-PCR		Any	2, 1	2	1-3
Antibiotic resistance testing	✓	Human/agricultural / wild	3	3	1, 4-6
Carbon utilization profiling	✓	Human/agricultural/wild	3	3	1, 6, 7
<i>Culture-based, library-independent methods</i>					
Bacteroides phage	✓		1	N/A	7
F-specific RNA coliphages	✓		1, 2	1	1, 7, 8
Somatic coliphages	✓		1	N/A	7
Sorbitol-fermenting Bifidobacteria	✓		1	N/A	7
Bifidobacterium dentium	✓		3	N/A	7
Bifidobacterium adolescentis	✓		3	N/A	7
<i>Culture-independent, library-dependent methods</i>					
Community fingerprinting			3	3	1, 9
<i>Culture-independent, library-independent methods</i>					
Fecal sterols	✓		1	N/A	7
Bacteroidales host-specific PCR		Human, ruminant, pig, dog, horse, elk	1	1	1, 9
Bifidobacterium host-specific PCR	✓		3	N/A	7
E. coli host-specific toxin genes		Human, cow, pig	1	1	9

^a Method discriminates between human and non-human sources.

^b Method identifies some sources to species.

^c Ranking from 1 to 3 is from most (1) to least (3) successful.

^d References for comparison studies: (1) Griffith et al. (2003); (2) Myoda et al. (2003); (3) Stoeckel et al. (2004); (4) Moore et al. (2005); (5) Samadpour et al. (2005); (6) Harwood et al. (2003); (7) Blanch et al. (2006); (8) Noble et al. (2003); (9) Field et al. (2003).

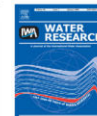
WATER RESEARCH 41 (2007) 3517–3538



Available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



Review

Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality

Katharine G. Field^{a,*}, Mansour Samadpour^b

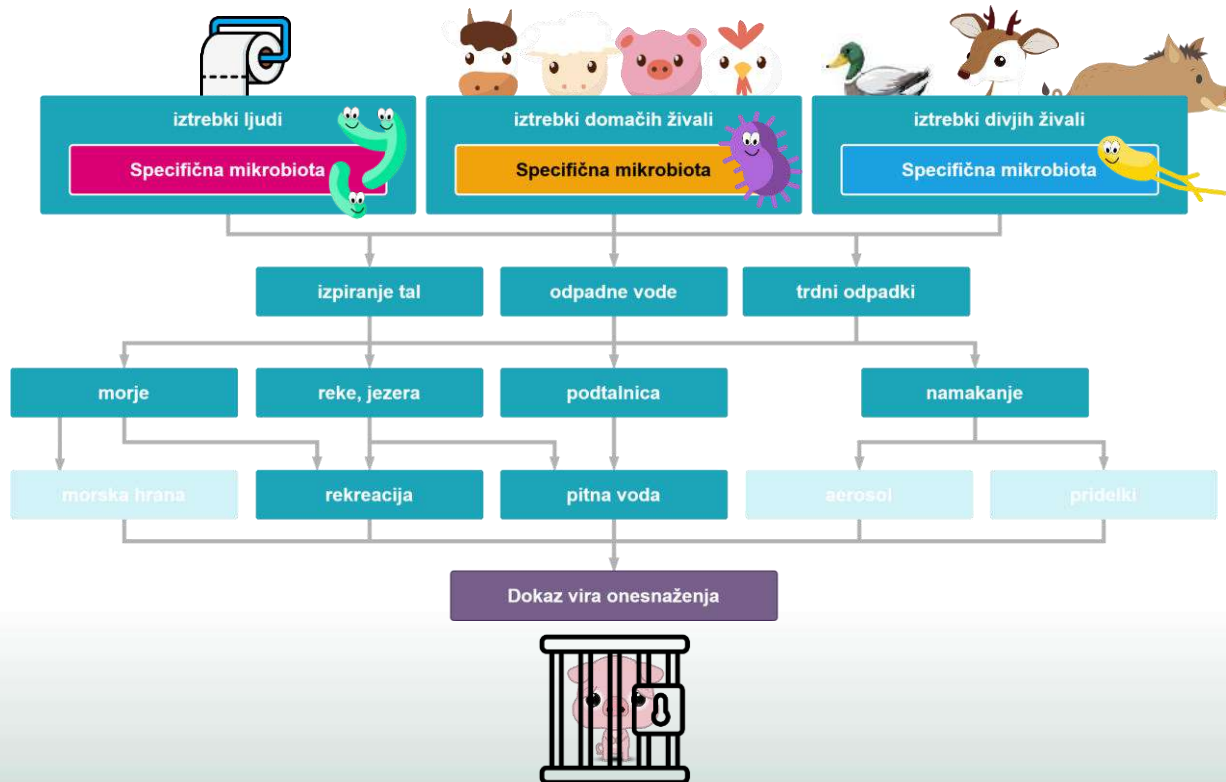
^aDepartment of Microbiology, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, USA

^bInstitute for Environmental Health, 15300 Bothell Way NE, Lake Forest Park, WA 98155, USA

*Corresponding author. Tel.: +1 541 737 3331; fax: +1 541 737 3331. E-mail: katharine.g.field@oregonstate.edu

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

0043-1397/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.





Environmental
Science & Technology



Article

pubs.acs.org/est

[Terms of Use](#)

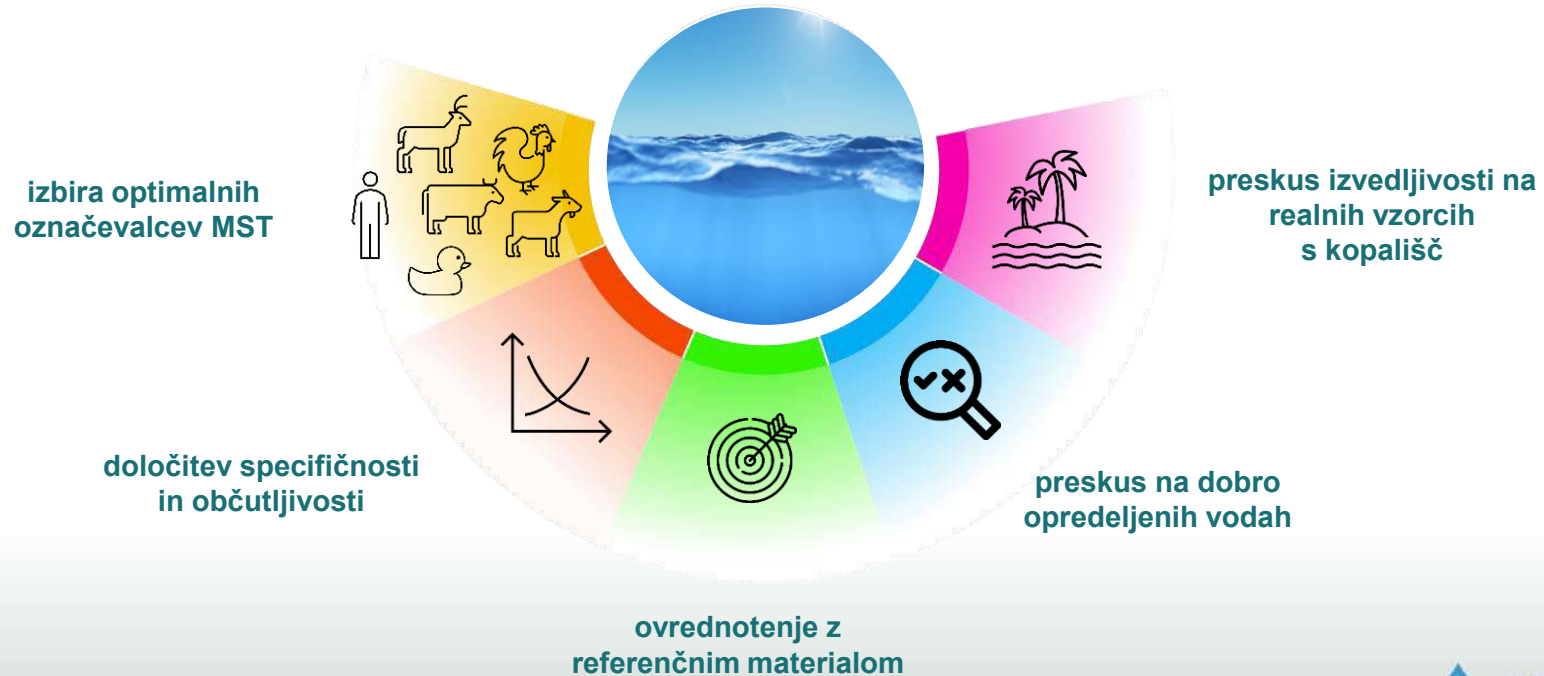
Performance Characteristics of qPCR Assays Targeting Human- and Ruminant-Associated *Bacteroidetes* for Microbial Source Tracking across Sixteen Countries on Six Continents

Georg H. Reischer,^{*,†,‡} James E. Ebdon,[§] Johanna M. Bauer,[†] Nathalie Schuster,[†] Warish Ahmed,^{||} Johan Åström,[‡] Anicet R. Blanch,[#] Günter Blöschl,[∇] Denis Byamukama,[¶] Tricia Coakley,[○] Christobel Ferguson,[●] Goraw Goshu,[◇] GwangPyo Ko,[◆] Ana Maria de Roda Husman,[△] Douglas Mushi,[▲] Ramiro Poma,[✱] Bandana Pradhan,[✱] Veronica Rajal,[✱] Margit A. Schade,[□] Regina Sommer,[■] Huw Taylor,[§] Erika M. Toth,[⊙] Virgil Vrajmasu,[⊞] Stefan Wuertz,[✦] Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}

Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}
 Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}
 Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}
 Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}
 Robert L. Mach,[†] and Andreas H. Farnleitner,^{†,‡}



Uvedba MST z gostiteljsko specifičnimi testi PCR v Sloveniji





Kandidatni testi PCR, ki po literaturi nakazujejo fekalno onesnaženje

Živalska vrsta	Oznaka testa	Mikrobna tarča testa	Vir
Univerzalni indikator fekalnega onesnaženja	GenBac3	številine bakterijske vrste	Siefring et al., 2008
Človek	BacHC	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2007
	BacHT	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2007
	BacHum	Phocaeicola dorei	Kildare et al., 2007; Reischer et al., 2013
	BtH	Bacteroides thetaiotaomicron	Yampara-Iquise et al., 2008
	crAssphage	bakteriofag CrAss	Stachler et al., 2017
Prežvekovalci	BacR	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2006
	Rum2Bac	nevzgojena bakterija	Mieszkin et al., 2010
Govedo	Bac3	Macrobrachium nipponense	Shanks et al., 2008
	BovPyV	poliomavirus goveda 1	Hundesa et al., 2006
	CowM2	neznano	Shanks et al., 2008
	CowM3	neznano	Shanks et al., 2008
Prašiči	Pig2Bac	Bacteroidales	Mieszkin et al., 2009
	PorAdV	adenovirus prašičev 3	Rusiñol et al., 2014
Ptice	AV4143mod	nevzgojen laktobacilus	Liang et al., 2020
	AV4143	nevzgojen laktobacilus	Ohad et al., 2016
Kokoši in race	ND5-CD	mtDNA	Zhuang et al., 2017



Uporabljeni vzorci DNA iz iztrebkov različnih živalskih vrst

<u>Skupina vzorcev</u>	<u>Podskupina vzorcev</u>	<u>N</u>	
Človek	Bolniki	12	
	Zdrave osebe	12	
Prežvekovalci			
	Ovce	Domača ovca	3
	Koze	Domača koza	2
	Jeleni	Srna	4
	Govedo	Domače govedo	9
	Prašiči	Divji prašič	1
		Domači prašič	8

<u>Skupina vzorcev</u>	<u>Podskupina vzorcev</u>	<u>N</u>	
Ptice	Domača kokoš	7	
	Domači golob	2	
	Labod grbec	2	
	Močvirska sinica	1	
	Raca mlakarica	1	
	Rečni galeb	1	
	Velika sinica	1	
	Ostale živali	Beloprsi jež	1
		Domača mačka	2
		Domači konj	6
Domači pes		5	
	Mali podkovnjak	1	
	Nutrija	2	








Specifičnost in občutljivost testov PCR pri prepoznavi iztrebkov posameznih živali v Sloveniji

Živalska vrsta	Oznaka testa PCR	Specifičnost [%]*	Občutljivost [%]*	Youdnov indeks
Univerzalni indikator fekalnega onesnaženja	GenBac3	/	100	/
Človek	BacHC	0**	0	0
	BacHT	98**	67	0,65
	BacHum	100**	100	1,00
	BtH	0**	0	0,00
	crAssphage	100**	58	0,58
Prežvekovalci	BacR	100	78	0,78
	Rum2Bac	100	89	0,89
Govedo	Bac3	95	89	0,84
	BovPyV	0	0	0,00
	CowM2	100	22	0,22
	CowM3	100	89	0,89
Prašiči	Pig2Bac	98	100	0,98
	PorAdV	100	67	0,67
Ptice	AV4143mod	93	67	0,60
	AV4143	98	73	0,72
Kokoši in race	ND5-CD	79	100	0,79

*Iz izračuna so izključeni vzorci bolnikov; ** Iz izračuna so izključeni vzorci psov in mačk

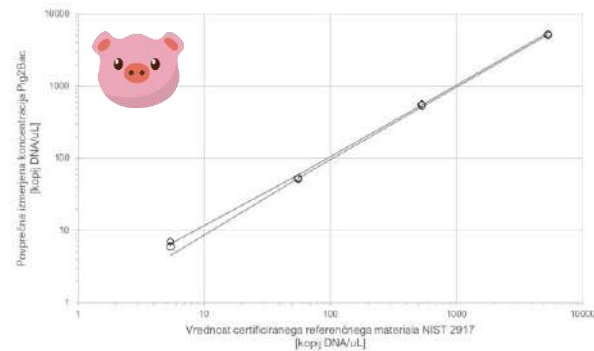
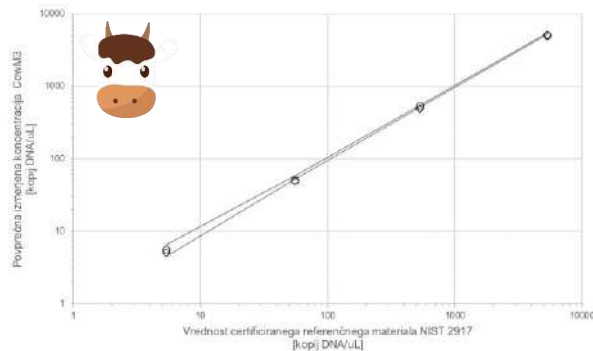
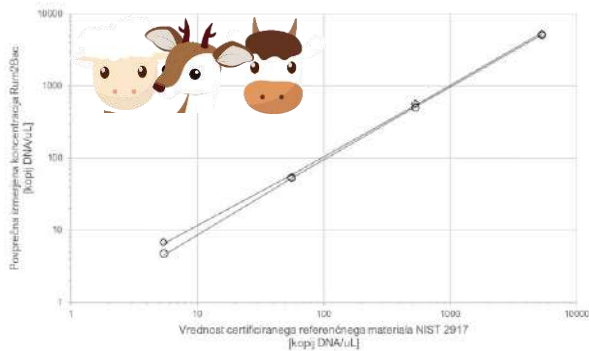


Živalske vrste	Specifičnost*	Občutljivost*
	98 %**	100 %
	100 %	89 %
	100 %	89 %
	98 %	100 %
	98 %	73 %

*Iz izračuna so izključeni vzorci bolnikov; ** Iz izračuna so izključeni vzorci psov in mačk



Primerjava certificiranih vrednosti referenčnega materiala NIST 2917 in koncentracij, izmerjenih z digitalnim PCR



Vrednost certificiranega referenčnega materiala [kopij DNA/μL]

Povprečna izmerjena koncentracija v samostojni reakciji [kopij DNA/μL]

Vrednost certificiranega referenčnega materiala [kopij DNA/μL]	Povprečna izmerjena koncentracija v samostojni reakciji [kopij DNA/μL]		
	Rum2Bac	CowM3	Pig2Bac
5,4 ± 1,0	4,8 ± 1,8	5,6 ± 0,8	6,0 ± 1,6
55,5 ± 3,2	54,0 ± 3,8	50,4 ± 3,0	52,9 ± 9,4
530,0 ± 14,0	507,9 ± 22,9	536,8 ± 22,5	549,6 ± 31,9
5314,0 ± 142,0	5116,3 ± 260,9	5061,9 ± 60,7	5122,7 ± 148,6

NIST National Institute of Standards and Technology
U.S. Department of Commerce

Standard Reference Material[®] 2917

Plasmid DNA for Fecal Indicator Detection and Identification





Vzorci voda z območij, kjer lahko dobro predvidimo vir fekalnega onesnaženja

nova metoda MST

VS.

standardne fekalne indikatorske bakterije

enterokoki, Escherichia coli, Clostridium perfringens









Vzorci voda z območij, kjer lahko dobro predvidimo vir fekalnega onesnaženja

- **Vode, odmaknjene od človeške dejavnosti:**
 - izvir Minutnik (Gorjanci)
 - mokrišče Gorjansko jezero (Gorjanci)
- **Vode v neposredni bližini človeških oz. kmetijskih dejavnosti:**
 - potok pod vasjo
 - potok v urbanizirani vasi
 - potok gorvodno in dolvodno od deponije farme sokolov



Vzorci voda z območij, kjer lahko dobro predvidimo vir fekalnega onesnaženja

Mesto vzorčenja	Standardne fekalne indikatorske bakterije [CFU/100 mL]			Označevalci MST (nakazane živalske vrste) [kopij DNA/100 mL]						
	Intestinalni enterokoki ISO 7899-2	Escherichia coli ISO 9308-1	Clostridium perfringens ISO 14189	GenBac3 (splošni fekalni indikator)	BacHT 	BacHum 	Rum2Bac 	CowM3 	Pig2Bac 	AV4143 
Mokrišče Gorjansko jezero (Gorjanci)	0	0	2	nz	nz	nz	nz	nz	nz	13
Izvir Minutnik (Gorjanci)	12	1	0	663	nz	nz	6	nz	nz	nz
Potok pod vasjo (Veliki Slatnik)	250	540	252	380.000	3.300	4.100	nz	nz	470	nz
Potok v urbanizirani vasi (Ratež)	/	14.000	/	180.000	9.600	12.000	nz	nz	nz	nz
Potok gorvodno od deponije farme sokolov	63	106	55	/	6	nz	nz	nz	46	nz
Potok dolvodno od deponije farme sokolov	350	116	85	/	6	nz	nz	nz	100	8

/ - ni izvedeno; nz - nezaznavno

Prisotnost molekularnih označevalcev MST je skladna s pričakovanimi in najverjetnejšimi viri fekalnega onesnaženja na območju vzorčnih mest.



Vzorci voda z naravnih kopališč, ki so fekalno onesnažena z nejasnim virom onesnaženja

- **Nova metoda MST**
- **Standardne FIB:** enterokoki, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*
- **Kopališča:**
 - Griblje in Adlešiči na Kolpi,
 - Straža na Krki,
 - Mala Zaka na Blejskem jezeru



Vzorci voda z naravnih kopališč, ki so fekalno onesnažena z nejasnim virom onesnaženja

Mesto vzorčenja	Standardne fekalne indikatorske bakterije [CFU/100 mL]			Označevalci MST (nakazane živalske vrste) [kopij DNA/100 mL]						
	Intestinalni enterokoki ISO 7899-2	Escherichia coli ISO 9308-1	Clostridium perfringens ISO 14189	GenBac3 (splošni fekalni indikator)	BacHT	BacHum	Rum2Bac	CowM3	Pig2Bac	AV4143
Kopališče Griblje (Kolpa)	53	70	/	31.000	2.500	2.600	nz	nz	nz	24
Kopališče Adlešiči (Kolpa)	40	61	/	13.000	12	24	nz	nz	nz	24
Kopališče Straža (Krka)	26	310	/	47.000	1.400	1.600	nz	nz	nz	nz
Kopališče Mala Zaka (Blejsko jezero)	33	90	/	19.000	470	610	nz	nz	nz	nz

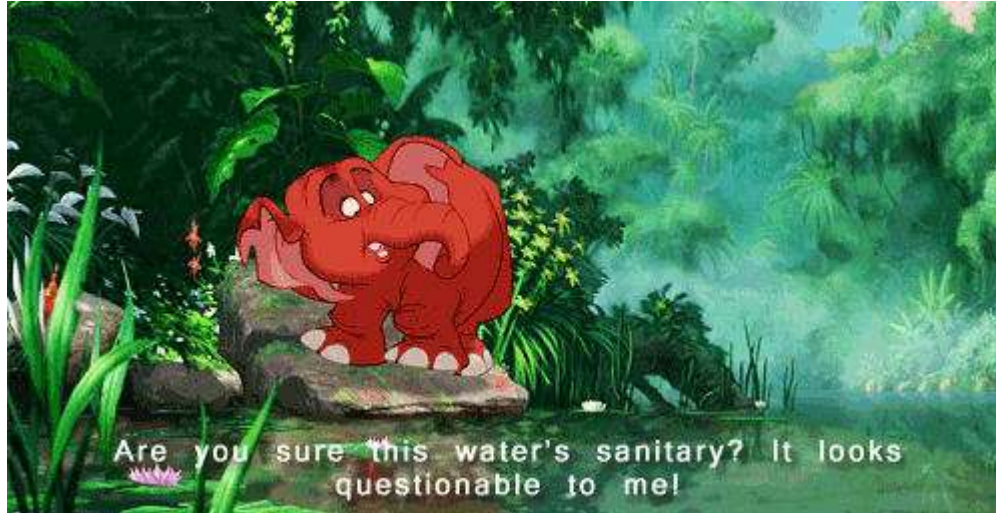
/ - ni izvedeno; nz - nezaznavno

- **Metodo MST smo uspešno izvedli na realnih vzorcih**
- **V vseh vzorcih smo dokazali standardne FIB in splošni molekularni označevalec fekalnega onesnaženja GenBac3**
- **Ostali molekularni označevalci so nakazali onesnaženje s strani človeka in ptic**



Določanje vira onesnaženja je multidisciplinarno

- Viri onesnaženja so lahko odvisni od sezonskih sprememb
- Opis porečja z vizuelnim pregledom, izdelava seznama potencialnih virov fekalnega onesnaženja
- Pregled preteklih in trenutnih rezultatov monitoringa FIB za prostorske in časovne trende v povezavi z meteorološkimi pojavi, pretoki, ...
- Če je sum fekalna kanalizacija, izvedba testov z dimom, barvilom, pregled s kamero
- Če je sum na prispevek človeka, testiranje s človeško specifičnim PCR
- Če je sum na prispevek živali, testiranje z živalsko specifičnim PCR



Zahvaljujem se sodelavcem na NLZOH:
Tanji Žlender, Aleksandru Mahniču in Maji Rupnik za vzorce DNA,
Petri Vovko za strokovno pomoč,
ekipi OMA Novo mesto za prevzemanje dodatnih delovnih obremenitev,
Katji Zelenik za zaupanje.

Slikovni material: © aslaiart, brgfx, freepik, inipagistudios, surang



NACIONALNI LABORATORIJ ZA
ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO