

Vesimikrobiologian uudet menetelmät ja standardit

Erikoistutkija, Dos., FT Tarja Pitkänen

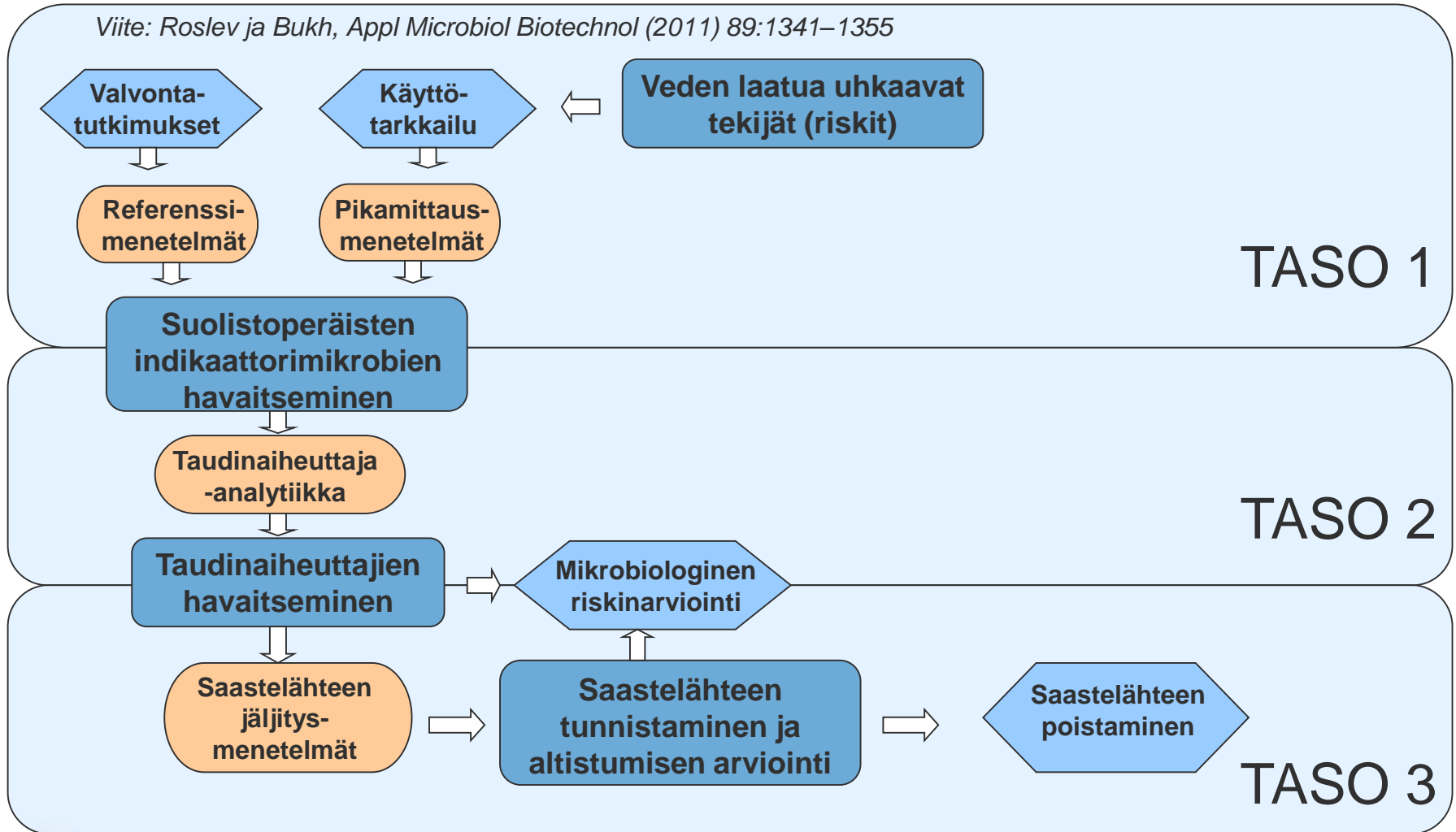


TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS



Veden laadun hallinta ja vesimikrobiologia

Viite: Roslev ja Bukh, *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 89:1341–1355



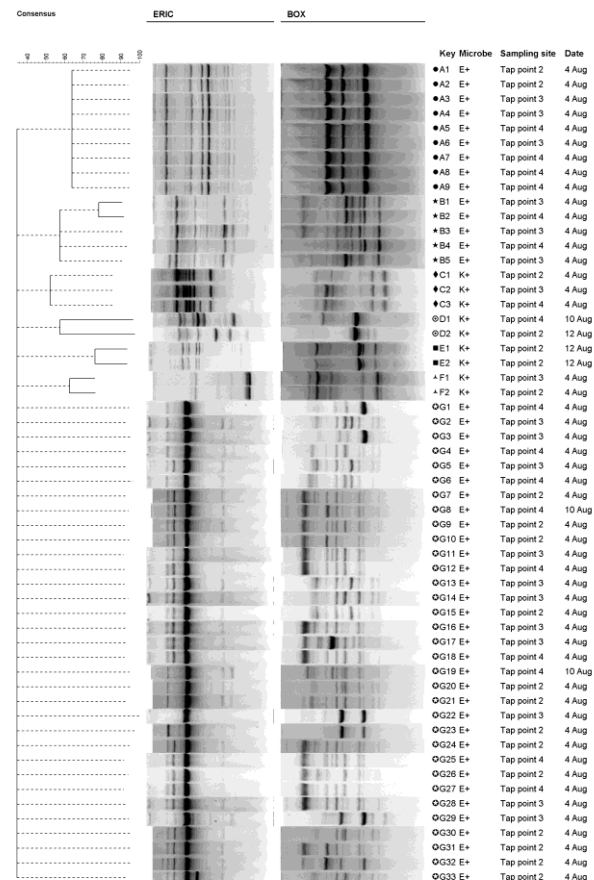
Varhaiset mikrobiologiset tekniikat saastelähteiden tunnistamiseen

- Geldreich ja Kenner (1969):
 - Fekaaliset koliformit / fekaaliset streptokokit (FC/FS)

Ongelmana epäspesifisyys, erot säilyvyydessä

- DNA-sormenjälkitekniikat
 - ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR
 - Ribotyypaus, PFGE, AFLP

Ongelmana kantakirjaston tarve, hitaus, käyttöalue vain viljeltyt bakteerikannat



Pitkänen et al, J Water Health, 2008

Isäntäspesifiset geneettiset markkerit

Roslev ja Bukh, Appl Microbiol Biotechnol (2011) 89:1341–1355

Lähtökohtana runsas esiintyminen suolistossa ja tunnettujen suvun lajien esiintyminen vain tietyissä eläinlajeissa

Molekulaariset markkerit voidaan jaotella:

- Prokaryoottimarkkerit
 - 16S rRNA; *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*
- Virusmarkkerit
 - esim. F-spesifiset RNA faagit
- Eukaryoottimarkkerit
 - esim. mitokondriaalisen DNA:n analyysit

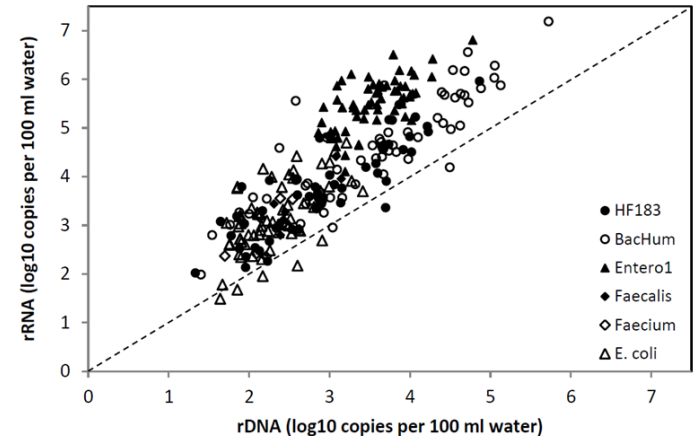
Saastelähteen karakterisointiin tarvitaan tarkasti mietitty markkerivalikoima (yksi markkeri ei riitä!)

- Verrataan esiintymistiheyksiä
- Maantieteelliset erot, spesifisyys, sensitiivisyys

Boehm et al, 2013. Water Res. 47:6812-6828

Molekulaarista vesimikrobiologiaa

- Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (qPCR)
 - Ribosomaalisen RNA:n geenit (DNA)
 - Geenikopioiden kvantitointi
 - Aktiiviset, lepotilaiset ja kuolleet solut
- Kohdesolujen elävyys/säilyvyys
 - RNA-lähestymistapa: rRNA kopioiden määrä riippu solun aktiivisuustasosta
 - Solukalvon läpäisevyys: PMA-qPCR



*Kapoor, Pitkänen et al. 2015,
AEM, 80(1): pp 91-99.*

Molekyylimikrobiologiset menetelmät suolistoperäisten bakteerien jäljitykseen

THL, Vesi ja terveys –yksikkö, Vesitalous 6/2015.

Testikohde	Menetelmä	Käyttötarkoitus
Yleinen <i>Bacteroidales</i>	GenBac3	Suolistoperäisen saastumisen kokonaismäärän arviointi
Ihmis-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	HF183	Ihmisperäisten suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Lokki-spesifinen <i>Catellibacterium</i>	Gull4	Lokkien aiheuttaman ulostesaastutuksen läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Sorkkaeläin-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	Rum-2-Bac	Nautakarjan ja muiden sorkkaeläinten suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Sika-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	Pig-2-Bac	Sikojen suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Siipikarja-spesifinen <i>Brevibacterium</i>	CL	Siipikarjan suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
<i>Escherichia coli</i>	EC23S857	Pikamenetelmä <i>E. coli</i> -bakteerin geenikopioiden lukumäärän laskemiseksi
<i>Enterococcus</i> spp.	Entero1	Pikamenetelmä enterokokkien geenikopioiden lukumäärän määrittämiseksi
<i>Campylobacter</i> spp.	Camp2	Pikamenetelmä kampylobakteerien geenikopioiden lukumäärän määrittämiseksi

Yhteenveto / Saastelähteiden jäljitys

- Ihmisperäinen saastuminen → suurin infektioriski
- Saastumisen hallinta edellyttää saastelähteiden tunnistamista ja määrän arviointia
 - Saadut tulokset linjassa vesistön jätevesikuormaan ja valuma-alueiden eläintiheyteen
 - rRNA-pohjaisilla menetelmillä voidaan tunnistaa aktiivisten suolistobakteerien osuus vesinäytteessä
- Saastelähteiden jäljitys toimii myös Suomen olosuhteissa
 - Soveltuu kontaminaatiotilanteiden selvittämiseen
 - Käytetty Suomessa jo mm.
 - Uimarantaveden enterokokkien lähteen todentamisessa
 - Talousvesikaivon saastumistapauksen selvittämisessä
 - Talous- ja uimavesiepidemioiden saastelähteiden selvittämisessä

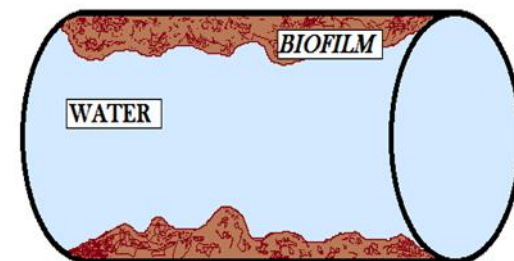
Uusi menetelmä suuren tilavuuden vesinäytteenottoon mikrobiologisia analyysejä varten (DEUF)

- Näytteenotto (ultrasuodatus)
 - 100 litraa vettä DEUF-patruunan läpi
- Jatkokäsittely laboratoriossa
 - Patruunan eluointi (backflush)
 - Eluaatin jatkokonsentroidi
 - Polykarbonaatti-suodatus, mahdolliset viljelymenetelmät
 - Virusten erottelu kooltaan isommista mikrobeista (bakteerit, sienet, arkit, alkueläimet)
 - PEG-saostus
 - Virusten jatkokonsentroidi
 - Nukleiinihappojen eristäminen ja lähettäminen jatkoanalyysiin



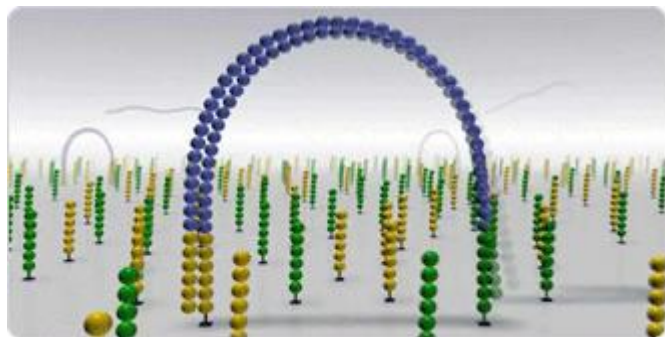
Talousveden jakelujärjestelmien mikrobiomi

- Bakteerit, virukset, sienet, arkit ja alkueläimet
 - Aktiiviset biofilmit putkistojen sisäpinoilla
 - Suurin osa mikrobeista harmittomia ihmisen terveydelle
 - Suurin osa aiemmista tiedoista pohjautuu bakteeriviljelyyn
- Menetelmät mikrobiyhteisöjen (mikrobiomi) analysointiin, vrt. yksittäisten lajien analysointi
- Mikrobiyhteisöjen rakenne ja sen muutokset
 - Mitkä ympäristön tekijät muovaavat yhteisön ja aiheuttavat muutoksia?



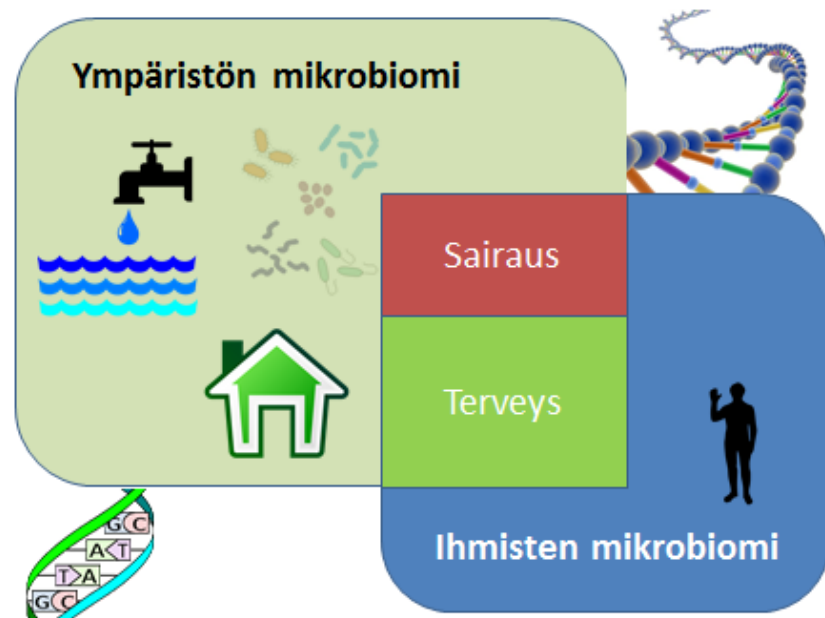
Uuden sukupolven sekvensointitekniikoiden (NGS) hyödyntäminen vesimikrobiologiassa

- Menetelmät kokonaismikrobiyhteisön (mikrobiomi) analysointiin yksittäisten lajien sijasta - SYVÄSEKVENSOINTI
 - Geenisekvensseihin perustuva genotyypitys suoraan sekapopulaatioista
 - Aiemmin tunnistamattomien taudinaiheuttajien havaitseminen



www.illumina.com

”who are there?” ”what do they do?”



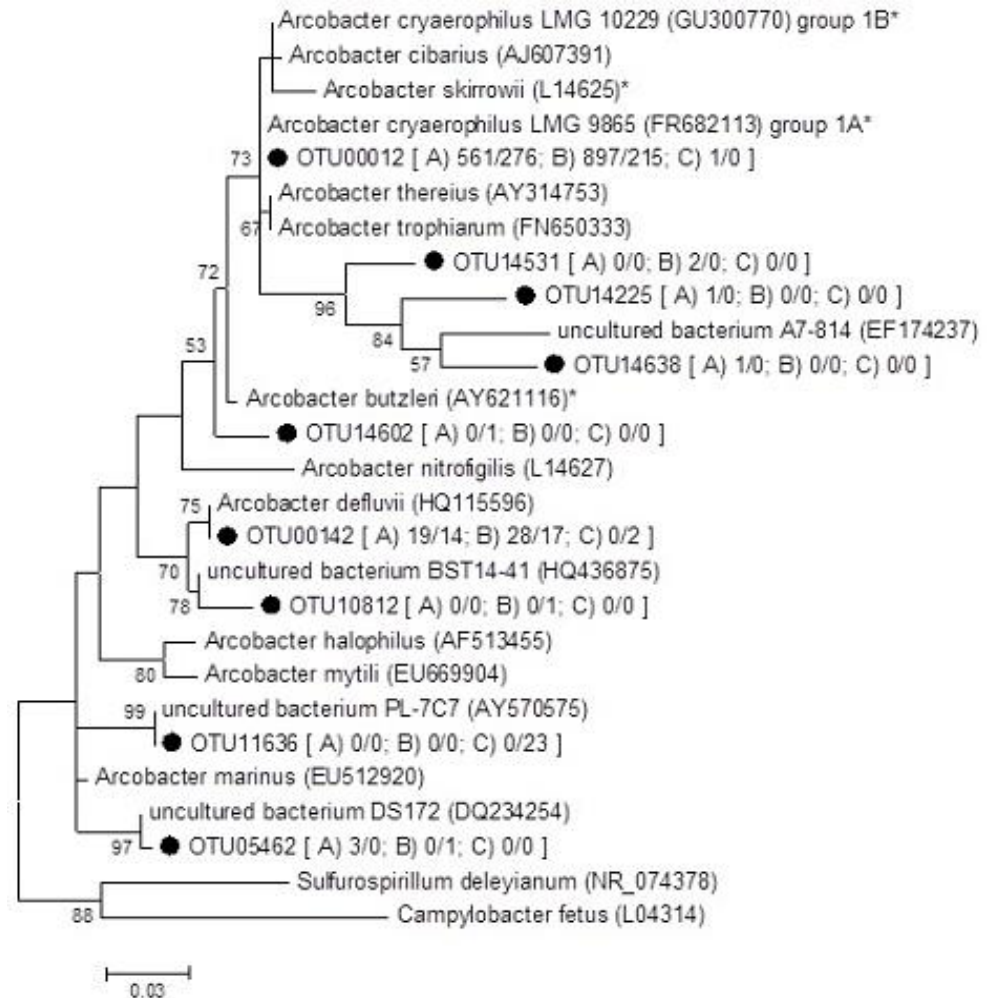
Arcobacter spp. Vuorelan talousvesiepidemiassa, heinäkuussa 2012

Näytteet:

- A) vesitorni ennen puhdistusta,
- B) verkostovesi kontaminaation aikana
- C) vesitorni puhdistuksen jälkeen

*Lajeilla *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ja *A. skirrowii* voi olla yhteys ihmisten suolistotulehduksiin.

Jalava, K. ym. Novel microbiological and spatial statistical methods to improve strength of epidemiological evidence in a community-wide waterborne outbreak. PLoS ONE, 2014.



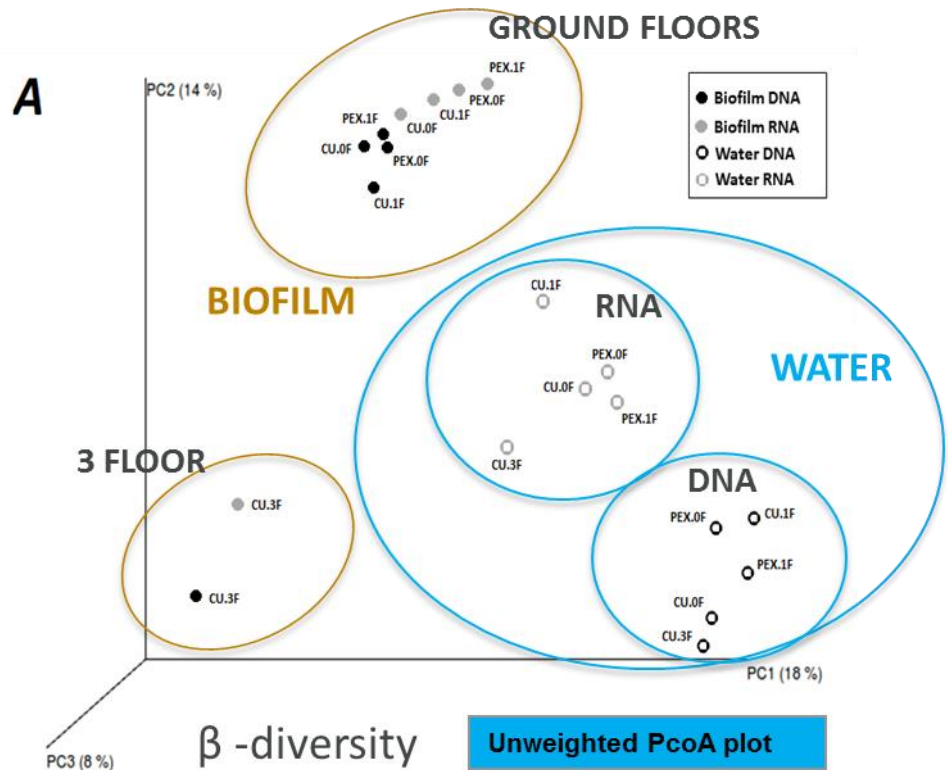
Talon vesijohtoverkoston bakteeriyhteisöt paljastuvat uudella geenitutkimusmenetelmällä

Veden laatu muuttui verkoston umpiperissä – juoksutus ennen käyttöä

Mykobakteereita löydettiin kuparilinjasta, mutta ei PEX-linjasta

rRNA:n tutkimiseen perustuva NGS-menetelmä voi tulevaisuudessa antaa lisäarvoa riskinarviointiin

Ei-patogeenisen legionellan ribosomaalista DNA:ta mutta ei rRNA:ta havaittiin Illumina NGS kirjastoissa



Inkinen, J. ym. Diversity of ribosomal 16S DNA- and RNA-based bacterial community in an office building drinking water system. Journal of Applied Microbiology, 2016.

Uudet SFS-EN ISO standardit / Vesimikrobiologia, indikaattorit

- *Escherichia coli* ja koliformiset bakteerit, SFS-EN ISO 9308-1
 - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014)
 - Tulossa tekninen korjaus: inkubointiajaksi 21-24 h + toimivuusominaisuuksia tarkennettu
- *Clostridium perfringens*, SFS-EN ISO 14189
 - Julkaistaan pian (ml. suomenkielinen käännös)
- *Pseudomonas aeruginosa*, ISO 16266
 - Vanha osa 1: CN-alustalla kasvavien pesäkkeiden varmistustestit
 - Uusi osa 2: Pseudalert

Uudet SFS-EN ISO standardit / Vesimikrobiologia, taudinaiheuttajabakteerit

- *Legionella*
 - Viljelymenetelmän ISO 11731 revisio valmistuu pian
 - qPCR-menetelmän ISO/TS 12869 revisio meneillään

- *Campylobacter* spp.
 - Viljelymenetelmän ISO 17995 revisio alkanut

Uudet SFS-EN ISO standardit / Vesimikrobiologia, yleiset ohjeet

- Elatusalustojen laadunvarmennus, SFS-EN ISO 11133
 - Tulossa käänös ja tekninen korjaus
 - Korvannut standardin SFS 9998
- Kalvosuodatinten testaus
 - Valmistelussa ISO 7704
 - Korvaa standardin SFS 5034
- Validointi, SFS-ENV ISO 13843
 - Revisio tulossa FDIS-äänestykseen

Kiitos mielenkiinnosta!



TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS

Terveydensuojelun osasto, Vesi ja terveys -yksikkö
Erikoistutkija, dos., FT, Tarja Pitkänen
tarja.pitkanen@thl.fi, @TarjaPitkanen