

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

# **Entwicklung einer Methode zur Schnellextraktion von DNA aus Abwasserproben zur Analyse mittels real-time PCR**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Sarah Schurig  
aus Weißwasser

Leipzig, 2023

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Ludwig Hölze, Fachgruppe Infektions- und Umwelthygiene  
bei Nutztieren, Universität Hohenheim, Stuttgart

Tag der Verteidigung: 19.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
	2.1 <i>Mikrobielle Risiken im Abwasser</i> .....	3
	2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
	2.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	7
	2.1.3 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	11
	2.2 <i>Ablauf der Abwasseraufbereitung in Deutschland</i> .....	14
	2.3 <i>Abwassermonitoring</i> .....	15
	2.3.1 <i>Aktuelle Gesetzeslage und Empfehlungen</i> .....	15
	2.3.2 <i>Zusätzliche Einsatzmöglichkeiten</i> .....	17
	2.4 <i>Nachweismethoden im Abwasser: der Vergleich zwischen Kultur         und real-time PCR</i> .....	18
	2.5 <i>Extraktionsverfahren mikrobieller DNA</i> .....	20
	2.5.1 <i>Konventionelle Extraktionsverfahren</i> .....	22
	2.5.2 <i>Festphasen-Nukleinsäureextraktion</i> .....	23
<b>3</b>	<b>PUBLIKATION</b> .....	<b>26</b>
	3.1 <i>Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation</i> .....	26
	3.2 <i>Publikation</i> .....	26
<b>4</b>	<b>DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>70</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>76</b>

# Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
AIEC	Adherent-invasive <i>E. coli</i>
APEC	Aviäre pathogene <i>E. coli</i>
cm	Zentimeter
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDEC	Edema Disease <i>E. coli</i> (Ödemkrankheits-bildende <i>E. coli</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen)
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
Nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>Potential hydrogenii</i>
PON	Point-of-Need
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEPEC	Septikämisch pathogene <i>E. coli</i>
ss-DNA	Single-stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
USA	United States of America (Vereinte Staaten von Amerika)

VBNC	Viable but non-culturable cells (Lebens-, aber nicht kulturfähige Zellen)
WOAH	World Organization for Animal Health (Weltorganisation für Tiergesundheit)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

---



# 1. Einleitung

Urbanes Abwasser enthält verschiedene Schadstoffe, welche mittels Abwasseraufbereitungsanlagen eliminiert werden. Um eine gefahrlose Einleitung des Wassers in die Umwelt und damit in den Wasserkreislauf zu gewährleisten, wird im Rahmen der Abwasserverordnung die Beseitigung chemischer und biologischer Substanzen in Klärwerken überwacht. Dabei wird jedoch ein relevanter Bestandteil - die Mikroorganismen, welche im Abwasser trotz einer Vielzahl apathogener Spezies ein Gesundheitsrisiko darstellen können – nur unzureichend erfasst. Diese sind beispielsweise durch den Eintrag von Regenwasser nicht nur humanen, sondern auch tierischen Ursprungs. Die hohe Umweltstabilität einiger dieser Pathogene fördert eine ineffiziente Erregereliminierung und dadurch eine Integration in öffentliche Gewässer. Dies hat zur Folge, dass die Gesundheit sowohl von Tieren als auch von Menschen gefährdet wird, da viele der Mikroorganismen ein zoonotisches Potential besitzen. Regelmäßig werden in Tier- und Menschenpopulationen wasserassoziierte Infektionsausbrüche wie zum Beispiel durch *Escherichia coli* (*E. coli*) oder *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) detektiert. Auch wenn mikrobiologische Parameter noch nicht in die routinemäßigen Abwasseruntersuchungen einbezogen werden, sollten diese daher Beachtung finden, um den Eintrag von Infektionserregern in den Wasserkreislauf und eine Gefährdung von Tier, Mensch und Umwelt zu verhindern. Zusätzlich kann mikrobielles Abwassermonitoring als Warnsystem eingesetzt werden, um Resistenzentwicklungen und epidemiologische Zusammenhänge bestimmter Pathogene in tierischen oder humanen Populationen frühzeitig zu detektieren.

Globale Organisationen, wie die Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH), die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) oder die Weltgesundheitsorganisation (WHO), haben die Gefahr und das Potenzial des Abwassers bereits erkannt und entsprechende Empfehlungen und Leitlinien verfasst. Diese beinhalten unter anderem die Forderung der Entwicklung und Verbesserung adäquater Nachweisverfahren zur Bestimmung von Pathogenen im Wasser.

Um einen Eintrag von pathogenen Mikroorganismen in die Umwelt zu vermeiden, ist es relevant, den Erregernachweis im Abwasser schnell und laborunabhängig garantieren zu können. Die in vielen Fällen eingesetzten kulturbasierten

Detektionsverfahren beinhalten jedoch einen komplexen und zeitintensiven Arbeitsablauf und der Nachweis ist durch den Anteil lebens-, aber nicht kulturfähiger Zellen (VBNC) im Abwasser limitiert. Eine Lösung bieten hier die schnelleren DNA-basierten Detektionsmethoden wie die real-time PCR, welche auch mobil einsetzbar ist. Das Verfahren besitzt im Vergleich zu der Kulturanzucht eine ähnliche Spezifität und Sensitivität.

Eine Grundvoraussetzung für molekulare Nachweismethoden ist ein geeignetes DNA-Extraktionsverfahren, welches ebenfalls einen schnellen, effizienten und laborunabhängigen Arbeitsablauf garantieren muss. Die bereits existierenden Extraktionsverfahren variieren in ihren Grundprinzipien und entsprechen aufgrund hoher Kosten, großem Zeitaufwand oder der Dependenz von komplexen Laborbedingungen oft nicht den genannten Anforderungen.

Das Ziel der Dissertation war es, eine Schnellextraktionsmethode zur Detektion von DNA in Abwasser zu entwickeln, welche ein schnelles, zuverlässiges und mobiles Abwassermonitoring von Mikroorganismen garantiert. Für eine optimale DNA-Extraktion, wurden zusätzlich zu einer sogenannten „*Reverse Purification*“ unterschiedliche Vorbehandlungen durchgeführt, die einzeln oder in Kombination angewendet wurden. Die Extraktionseffizienz wurde mittels real-time PCR bestimmt und den Ergebnissen einer Silica-Säulen-basierten Referenzmethode gegenübergestellt. Für die Zoonoseerreger *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *E. coli* und *C. parvum* wurde eine DNA-Extraktionsmethode entwickelt, welche schnell und mobil durchführbar ist.

## 2. Literaturübersicht

### *2.1 Mikrobielle Risiken im Abwasser*

Neben anorganischen Schadstoffen enthält urbanes Abwasser eine Vielzahl unterschiedlicher und potenziell pathogener Mikroorganismen. Auch wenn der überwiegende Anteil dieser Pathogene durch Aufbereitungsanlagen in den Klärwerken eliminiert wird, gibt es Erreger, welche durch ihre hohe Tenazität infektiös bleiben, zurück in den Wasserkreislauf integriert werden und so die Gesundheit von Tieren und Menschen gefährden (PAPAJOVÁ et al. 2022). Die Erreger werden dabei vor allem durch menschliche aber auch durch tierische Exkremente in das Abwassersystem eingetragen, da es beispielsweise durch Regenfälle zu einer Kontamination des urbanen Abwassers mit tierischer Biomasse kommen kann (FAO, WOAH, WHO 2020). Durch Starkregenereignisse werden Abwasseraufbereitungsanlagen zusätzlich überlastet oder zerstört und können so keine suffiziente Erregereliminierung gewährleisten. Mit Regen assoziierte Erosionen und Überschwemmungen erhöhen zudem den Eintrag von tierischer Biomasse in das urbane Abwassersystem (SINGH et al. 2019).

Vor allem zoonotische Krankheitserreger gefährden dabei die Gesundheit unterschiedlichster Organismen, da sowohl Tiere als auch Menschen in gleichem Maße die Eintragsquelle und den gefährdeten Zielorganismus darstellen. Als Zoonose werden dabei Krankheitserreger bezeichnet, bei welchen eine natürliche Transmission zwischen Wirbeltieren und dem Menschen detektiert werden kann (FAO/WHO 1959). Der genaue zoonotische Anteil der im Wasser vorkommenden Pathogene ist aufgrund fehlender Studien und einer daraus resultierenden schlechten Datenlage schwer zu definieren. Es ist allerdings davon auszugehen, dass er erheblich ist, da es sich bei 61 % aller bekannten und 75 % aller neu auftretenden Pathogene in der Umwelt um Zoonosen handelt (TAYLOR et al. 2001). Um über den Abwasserkreislauf ein Individuum infizieren zu können, muss der Erreger zum einen in ausreichender Konzentration vom erkrankten Tier beziehungsweise Menschen ausgeschieden werden und zum anderen muss die infektiöse Dosis des Pathogens so niedrig sein, dass ein Organismus auch bei geringen Erregerkonzentrationen infiziert wird. Außerdem muss die Latenzzeit der Pathogene lang genug sein, um eine ausreichende Keimlast im Wasser zu erreichen, bevor Symptome auftreten und die Infektion

behandelt wird. Des Weiteren muss der Krankheitserreger eine ausreichende Persistenz und Pathogenität im Wasser besitzen (FEACHEM et al. 1985).

Bei vielen wasserassoziierten Krankheitserregern ist das zoonotische Potenzial bereits bekannt (Tabelle 1). Es wird eine hohe Dunkelziffer der durch Wasserkontamination auftretenden Infektionsausbrüche vermutet, da fehlende Rückverfolgbarkeit und subklinische Fälle den Erregernachweis erschweren (ZAHEDI et al. 2020, CHOFFNES und MACK 2009). Vor allem Enteropathogene wie *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Giardia intestinalis* und *C. parvum* verursachen aber weltweit immer wieder Infektionsausbrüche in Tier- und Menschenpopulationen (RHODEN et al. 2021, JENKINS et al. 2021).

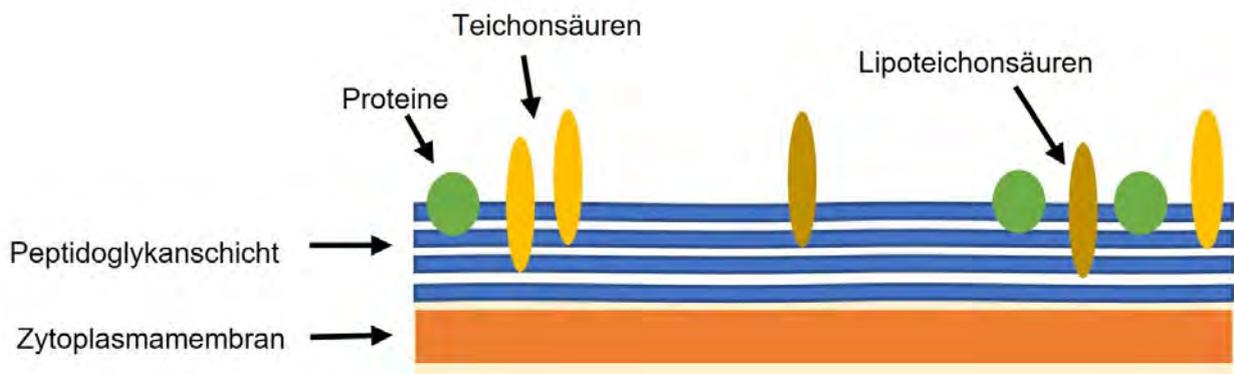
**Tabelle 1:** Liste der am häufigsten vorkommenden wasserassoziierten Zoonoseerreger. Die Tabelle wurde in Anlehnung an die WHO (2004) erstellt.

<u>Wasserassoziierter Infektionsweg</u>	<u>relevante Zoonoseerreger</u>
orale Aufnahme	<i>Salmonella</i> sp. <i>E. coli</i> O157:H7 <i>Campylobacter</i> sp <i>Francisella tularensis</i> . <i>Yersinia</i> sp. <i>Cysticercus</i> sp. <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Balantidium coli</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Giardia</i> sp. <i>Microsporidia</i> sp.
Inhalation	<i>Mycobacteria</i> sp.
Hautkontakt	Hepatitis E <i>Leptospira</i> sp. <i>Balantidium coli</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Giardia</i> sp.

Bei der Detektion von Pathogenen im Abwasser ist zu beachten, dass die wasserassoziierten Zoonosen unterschiedlichsten Erregergruppen angehören (WHO 2004). In den folgenden Abschnitten wird konkreter auf jeweils einen Vertreter der grampositiven und -negativen Bakterien, sowie der Parasiten eingegangen.

### 2.1.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* ist ein fakultativ anaerobes, kokkoides, grampositives Bakterium mit einer Größe von 0,8 bis 1,0  $\mu\text{m}$ , welches sich in Haufen organisiert. Bei Inkubation auf Blut-Agar bildet es gelblich-weiße, circa 1 mm große Kolonien (SELBITZ et al. 2015). Die Zellwand dieser grampositiven Bakterien besitzt einen robusten Charakter und ermöglicht daher eine hohe Umweltstabilität (MADIGAN et al. 2015)(Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus von grampositiven Bakterien, modifiziert nach MADIGAN et al. (2015). Den Hauptbestandteil der Zellwand stellt zu 90 % eine 20 bis 40 nm breite, homogene und quervernetzte Peptidoglykanschicht dar, in deren Geflecht Teichon- und Lipoteichonsäuren eingelagert sind (GIESBRECHT et al. 1998). Diese Bestandteile induzieren eine negative Ladung der Zellwand, sowie die Bindung von Calcium- und Magnesium-Ionen. Zusätzlich dazu besitzt die Zellwand eine innere Zytoplasmamembran aus Phospholipiden und Proteinen, angeordnet in einer Lipiddoppelschicht (MADIGAN et al. 2015).

*S. aureus* ist ein ubiquitär vorkommender Kommensale von Haut und Schleimhaut. Er besitzt pathogenes Potenzial, welches in Fällen von Immunsuppression, erhöhter Erregerlast, veränderten Wirteigenschaften oder durch Zerstörung von natürlichen Körperbarrieren ein Gesundheitsrisiko darstellt (MCVEY et al. 2022). Der Erreger verursacht folglich bei vielen verschiedenen Tierarten vor allem eitrige Entzündungen von Haut und Schleimhaut, sowie beim Menschen zusätzlich Lebensmittelintoxikationen. Ein typisches Krankheitsbild ist außerdem die Mastitis bei

Nutztieren, welche durch mangelnde Melkhygiene ausgelöst wird. Weitere Entitäten sind unter anderem Aborte bei Rindern oder die Botryomykose - eine chronische, abszedierende Wundinfektion bei Pferden. Septikämien und Entzündungen des Bewegungsapparates sind beim Geflügel typische Symptome von Infektionen mit *S. aureus* (SELBITZ et al. 2015).

Eine antibiotische Therapie dieser Entitäten ist in den meisten Fällen sowohl bei Tieren als auch beim Menschen indiziert. Ein überhöhter Einsatz der Medikamente induzierte im Laufe der Jahre jedoch eine Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen (PRICE et al. 2012). Viele *S. aureus*-Stämme bilden Beta-Laktamasen – bakterielle Enzyme, welche die Wirkung bestimmter Antibiotika durch die Spaltung des Betalaktamrings schwächen. Dies limitiert in vielen Fällen die Therapiemöglichkeiten und gefährdet die Gesundheit von Tier und Mensch (SELBITZ et al. 2015). Die Erregerstämme kommen vermehrt in Krankenhäusern vor, und auch in tiermedizinischen Kliniken kann bereits eine Ausbreitung des resistenten Keims vermutet werden. Von besonders großer Bedeutung sind dabei die Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)-Stämme (MCVEY et al. 2022). Bei verschiedenen Tierarten und dem Menschen existieren dabei eine Vielzahl unterschiedlicher MRSA-Stämme (PANTOSTI 2012). Eine Prävalenz von bis zu 20 % in europäischen Milchviehbeständen zeigt, dass MRSA in Nutztierhaltungen stark verbreitet ist (SCHNITT und TENHAGEN 2020).

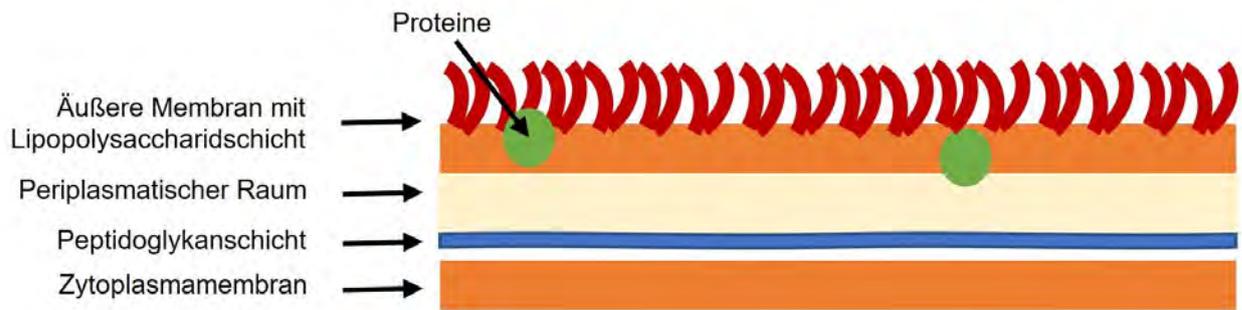
Auch die zoonotische Gefahr von *S. aureus* ist hoch. Die Vermutung, dass Staphylokokken stark wirtsspezifisch sind, konnte mittlerweile widerlegt werden, da Übertragungen zwischen Tieren und Menschen in beide Richtungen nachgewiesen wurden (OSADEBE et al. 2013, MCVEY et al. 2022, VAN DUIJKEREN et al. 2004). Untersuchungen von Zelllinien zeigten eine Übertragung von MRSA zwischen Menschen und Nutztieren und eine ständige Adaption des Erregers in Bezug auf Resistenzentwicklungen (PRICE et al. 2012). Auch eine MRSA-Infektion eines Hundes, übertragen durch den infizierten Besitzer wurde auf diese Weise detektiert (VAN DUIJKEREN et al. 2004). Somit stellen sowohl Mensch als auch Tier eine potenzielle Erregerquelle für das Abwasser dar und sind in gleichem Maße durch das Bakterium gefährdet.

Obwohl MRSA kein klassischer Abwasserkeim ist, konnte er bereits in vielen Fällen im Abwasser identifiziert werden. Dabei sind die nachgewiesenen Stämme oft eng verwandt mit in Krankenhäusern vorkommenden MRSA-Stämmen. Dies lässt vermuten, dass die Keime über das Wasser im infektiösen Stadium in die Klärwerke

gelangen (BÖRJESSON et al. 2010). Die Verweildauer des Bakteriums im Klärwerk ist dabei ausschlaggebend für seine Pathogenität. Verkürzte Verweildauern, wie beispielsweise bei Starkregen, verursachen eine erhöhte Erregerlast im geklärten und in die Umwelt abgegebenen Wasser. Da MRSA in Gewässern eine Überlebensdauer von bis zu 14 Tagen besitzt, kann die Gesundheit von Tier und Mensch über einen längeren Zeitraum gefährdet werden (TOLBA et al. 2008). Auch nach acht Tagen Verweildauer im Klärwerk können immer noch 10 % der infektiösen Bakterien detektiert werden (LI et al. 2015). Wissenschaftler konnten einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Detektion von *S. aureus* in Jagdwild und in Flusswasser feststellen, was vermuten lässt, dass *S. aureus* in der Lage ist, Tiere wasserassoziiert zu infizieren (CONCEPCIÓN PORRERO et al. 2014).

### 2.1.2 *Escherichia coli*

*E. coli* sind gramnegative, 1,0 x 2,0 µm große Stäbchenbakterien, welche bei einer Kultivierung auf Blutagar grünlich-weiße Kolonien mit einer Größe von 1 bis 3 mm ausbilden (BASAVARAJU und GUNASHREE 2021). Sie zählen zu der Gattung *Escherichia* und besitzen in dieser Gruppe die größte klinische Relevanz. Die Zellwand des Bakteriums ist 15 nm breit und besteht im Vergleich zu den grampositiven Bakterien aus einer relativ dünnen Peptidoglykanschicht, wodurch die mechanische Stabilität der Bakterien verringert ist (Abbildung 2) (MADIGAN et al. 2015).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus von gramnegativen Bakterien, modifiziert nach MADIGAN et al. (2015). Die Zellwand besteht wie bei allen gramnegativen Bakterien mit einem Anteil von lediglich 10 % aus einer dünnen Peptidoglykanschicht (MATUŁA et al. 2019). Die innere Zytoplasmamembran beinhaltet eine Lipiddoppelschicht. Den Hauptbestandteil bildet die äußere Zellmembran mit einer aus Lipid- und Polysaccharidkomplexen bestehenden Lipopolysaccharidschicht. Primäre Funktionen dieser Schicht sind die Strukturgebung und die Ausbildung von Antigenstrukturen (MADIGAN et al. 2015).

Für *E. coli* existieren viele unterschiedliche Serotypen, welche anhand der O-, H- und K-Antigene eingeteilt werden. Die O-Antigene beschreiben die Komposition der äußeren Polysaccharidketten des Bakteriums. Kapselantigene werden als H-Antigene und Geißelantigene als K-Antigene bezeichnet. Mittlerweile sind 174 O-, 53 H- und 80 K-Antigene bekannt, welche die Erregerspezifität, Pathogenität und klinische Manifestation des Erregers beeinflussen (BERG 1998, MCVEY et al. 2022).

*E. coli* besiedelt als natürliches Reservoir in großen Mengen den unteren Säugetierdarm und wird daher in Konzentrationen von bis zu  $10^{10}$  Bakterien pro Gramm ausgeschieden (SELBITZ et al. 2015). Als Teil der mikrobiellen Darmflora ist der Mikroorganismus apathogen und entwickelt erst durch Genveränderungen und der damit einhergehenden Ausbildung von Virulenzfaktoren eine Pathogenität (MCVEY et al. 2022).

Basierend auf McVey et al. lässt sich *E. coli* anhand der klinischen Manifestation in unterschiedliche Pathovaren einteilen (Tabelle 2). Die Lokalisation der Infektion separiert die Spezies in intestinal pathogene und extraintestinal pathogene *E. coli*. Intestinale Pathovaren werden in den meisten Fällen fäkal-oral übertragen. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Enteropathogene (EPEC), Enterotoxische (ETEC),

Shigatoxin-bildende (STEC), Adhärenz-invasive (AIEC) und Ödemkrankheits-bildende *E. coli* (EDEC). EPEC, ETEC und STEC bilden Enterotoxine aus, welche das Darmepithel schädigen und bei verschiedenen Tierarten (vor allem bei Jungtieren) Durchfallerkrankungen verursachen. Die Therapie erfolgt im Gegensatz zu *S. aureus* symptomatisch durch Rehydratation und Elektrolytausgleich. AIEC steht beim Menschen im Zusammenhang mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und konnte auch bei Hunden mit histiozytärer ulzerativer Kolitis isoliert werden. EDEC verursachen bei Absatzferkeln durch eine Zerstörung der Endothelzellen Ödeme in verschiedenen Organen wie beispielsweise in Lunge, Gehirn oder Unterbauch. Prophylaktische Maßnahmen wie Impfungen und ein geeignetes Fütterungsmanagement sind empfehlenswert, da der abrupte Futterwechsel nach dem Absetzen der Ferkel die Hauptursache der Erkrankung ist. Zu extraintestinal pathogenen *E. coli* zählen Uropathogene (UPEC), Aviäre pathogene (APEC) und Septikämisch pathogene *E. coli* (SEPEC). UPEC infizieren aufsteigend den Harntrakt von Hunden und Katzen mit einer Prädisposition für weibliche Tiere und kann durch die Applikation von Antibiotika behandelt werden. APEC werden von Wirtschaftsgeflügel über die Lungen oder durch Wundinfektionen aufgenommen und breiten sich in vielen Fällen systemisch aus. Wird der Erreger vom Embryo über das Ei aufgenommen, verläuft die Krankheit meistens letal. Prophylaktisch können bestandsspezifische Impfstoffe eingesetzt werden und bei einem Ausbruch wird der Einsatz von Antiinfektiva empfohlen. SEPEC verursachen bei Kälbern und Lämmern Erkrankungen des Atmungstrakts in Kombination mit Septikämien und besitzen eine hohe Letalität. Die Übertragung erfolgt dabei oft vertikal über den Nabel, aber auch über Sekrete, Kot und Urin. Die Infektionsausbreitung kann prophylaktisch durch ausreichende Kolostrumgabe und therapeutisch durch Antibiotika oder eine Kombination aus Zykllooxygenase-Inhibitoren und Dexamethason bekämpft werden. Nekrotische *E. coli* werden konjunktival, umbilikal oder oral übertragen und verursachen bei Kälbern und Lämmern vor allem im Fall von Kolostrummangel Diarrhö, gefolgt von Septikämien. *E. coli* ist außerdem an Mastitis-Ausbrüchen bei Rindern und Schweinen beteiligt (MCVEY et al. 2022).

**Tabelle 2:** Übersicht der häufigsten vorkommenden Pathovaren von *E. coli* bei verschiedenen Tierarten nach MCVEY et al. (2022).

<b>Pathovare</b>	<b>klinische Ausprägung</b>	<b>Spezies</b>
<b><u>Intestinal pathogen</u></b>		
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Diarrhö	Kaninchen, Kalb, Schwein, Hund, Katze
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	sekretorische Diarrhö	Kalb, Saugferkel, Lamm, Hund, Pferd
Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC)	Diarrhö	Kalb, Lamm, Damwild, Ziege, Hund, Katze
Adherent-invasive <i>E. coli</i> (AIEC)	chronische granulomatöse Darmentzündung	Hund
Ödemkrankheits-bildende <i>E. coli</i> (EDEC)	Ödeme	Absatzferkel
<b><u>Extraintestinal pathogen</u></b>		
Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	Zystitis, Pyelonephritis,	Hund, Katze
Aviäre pathogene <i>E. coli</i> (APEC)	systemische Infektion	Wirtschaftsgeflügel
Septikämisch pathogene <i>E. coli</i> (SEPEC)	Septikämie	Kalb, Lamm
<b><u>sonstige</u></b>		
nekrotische <i>E. coli</i>	Diarrhö, Septikämie	Kalb, Lamm

Beim Menschen haben vor allem ETEC, EPEC, STEC und UPEC eine klinische Relevanz, wobei Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) als Untergruppe des STEC das größte zoonotische Potenzial besitzen. EHEC verursachen beim Menschen eine hämorrhagische Kolitis und können in 5-10 % der Fälle zu einem hämolytisch-urämischem Syndrom führen, weswegen sie nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig sind. UPEC und EPEC können ebenfalls ein zoonotisches Potenzial zugesprochen werden (MCVEY et al. 2022). Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass die Ähnlichkeit der Erregerstämme bei Menschen und Tieren in einem Haushalt so groß ist, dass von einer gegenseitigen Übertragung von *E. coli* ausgegangen werden kann (EWERS et al. 2010). Auch eine Übertragung des Erregers von Wildnagern auf Farmtiere konnte so nachgewiesen werden (GUENTHER et al. 2010). Des Weiteren treten immer wieder Fälle auf, bei denen sich Menschen durch tierische Fäkalien im Wasser mit *E. coli* infizieren (EFFLER et al. 2001). Dies beweist nicht nur,

dass das Bakterium zoonotische Eigenschaften besitzt, sondern auch, dass eine Erregerübertragung über Wasser möglich ist und auf natürliche Weise immer wieder stattfindet.

Der Gehalt an *E. coli* ist in Abwasser mit  $10^6$  koloniebildenden Einheiten pro 100 Milliliter sehr hoch. Auch wenn circa 95 % der im Abwasser vorkommenden *E.coli* durch die mechanisch-biologische Aufbereitung in Klärwerken eliminiert werden, wird so ein ernstzunehmender Teil der Bakterien in Gewässer abgegeben (RABONI et al. 2016). Studien haben gezeigt, dass die Erregerlast auch bei *E. coli* mit sinkender Verweildauer zunimmt und das Pathogen bei Starkregenereignissen vermehrt in die Umwelt abgegeben wird (LI et al. 2015). Auch Beta-Laktamasen bildende *E. coli*-Stämme, welche aufgrund antimikrobieller Resistenzen ein besonders hohes Risiko darstellen, konnten in Gewässern nahe der Klärwerke extrahiert werden und lagen in erhöhten Konzentrationen nach Starkregenereignissen vor (ASLAN et al. 2018).

Die Abgabe der Erreger in die Gewässer stellt ein besonderes Risiko für die Umwelt dar, da *E. coli* in Wasser bis zu 109 Tage überlebensfähig ist (SCOTT et al. 2006). Durch phylogenetische Untersuchungen wurden im aufbereiteten Abwasser gefundene *E. coli*-Stämme zusätzlich in einem Radius von 20 Kilometern in der Umwelt und in Vögeln isoliert (ANASTASI et al. 2012). Mit *E. coli* kontaminiertes Abwasser stellt demnach nicht nur für die Wildtiere ein Risiko dar, sondern gefährdet auch Nutztiere, die mit dem kontaminierten Wasser oder infizierten Wildtieren in Kontakt kommen. Dies fördert sowohl die Erregerausbreitung als auch die Entwicklung von Multiresistenzen.

### 2.1.3 *Cryptosporidium parvum*

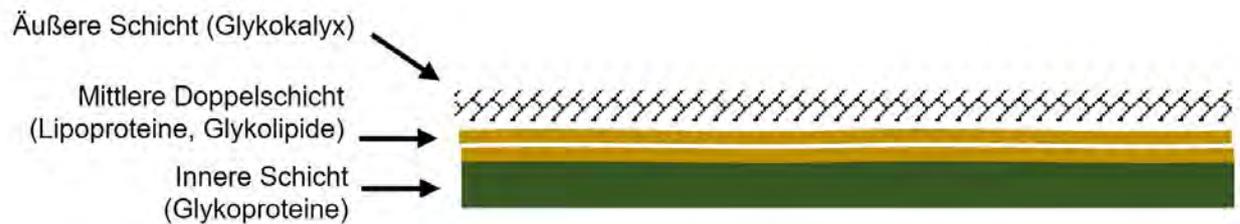
*C. parvum* sind ubiquitär vorkommende Protozoen, die den Dünndarm verschiedener Tierarten (vor allem Wiederkäuer) infizieren und katarrhalische Enteritiden hervorrufen. Die Übertragung der Erreger erfolgt fäkal-oral, hauptsächlich direkt von Tier zu Tier, aber auch indirekt durch kontaminierte Gegenstände, Wasser und Futtermittel (DEPLAZES et al. 2021).

Die Infektion mit dem Parasiten gilt bei Kälbern als Haupttodesursache und besitzt bei Rindern in Mitteleuropa eine Prävalenz von 80 %. Der Krankheitsverlauf ist vor allem für junge oder immunsupprimierte Tiere fatal und äußert sich klinisch in Diarrhö, aber auch Fieber, Exsikkosen und Azidosen, bis hin zu Todesfällen. Es wird eine

symptomatische Behandlung in Form von Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich empfohlen. Präventiv muss auf eine gute Stallhygiene, ausreichende Kolostrumgabe und eine artgerechte Haltung geachtet werden. Bei gesunden Tieren sind die Symptome nach 4-6 Tagen selbstlimitierend (DEPLAZES et al. 2021).

Die Entwicklung des Parasiten ist homoxen. Die Präpatenzzeit beträgt 3-6 Tage und die Patenzzeit 1-2 Wochen. *C. parvum* wird oral in Form von 4-6 cm großen Oozysten aufgenommen, welche aus vier Sporozoiten und einer robusten Wand bestehen. Im Darm werden die Sporozoiten freigesetzt und von Enterozyten durch eine parasitophore Vakuole eingeschlossen. Der intrazelluläre, aber extrazytoplasmatische Sporozoit transformiert sich zum Trophozoiten und danach zum Meronten Typ 1. Diese Entwicklungsstufe enthält acht Merozoiten, welche nach der Freisetzung von weiteren Enterozyten eingeschlossen werden, in denen sie sich zu Meronten Typ 2 mit vier Merozoiten entwickeln. Im weiteren Verlauf reift *C. parvum* zu Gamonten, die später zu Mikro- und Makrogameten werden und sich durch Syngamie zu Zygoten und dann zu Oozysten entwickeln. Die Oozysten werden entweder als infektiöses Stadium in die Umwelt ausgeschieden oder sie verursachen bei besonders immunsupprimierten Tieren eine Autoinfektion. Junge Tiere haben mit bis zu  $10^7$  Oozysten pro Gramm Kot eine besonders hohe Erregerausscheidungsrate (DEPLAZES et al. 2021).

Auf Grundlage des morphologischen Aufbaus der Zellwand besitzen die Oozysten eine starke Umweltstabilität und eine starke Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen (Abbildung 3). Jedoch konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, welche Schicht diese hohe Stabilität induziert (HARRIS und PETRY 1999).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Oozystenwand von *C. parvum*, modifiziert nach LENDNER und DAUGSCHIES (2014). Die Wand der Oozysten besteht aus mehreren Schichten. Die innere feste Schicht der Wand besitzt eine Breite von 26 nm und besteht hauptsächlich aus Glykoproteinen. Sie ist durch Filamente mit den Sporozoiten in der Oozyste verbunden. Die innere Wandschicht wird von einer 12 nm breiten Doppelschicht aus Lipoproteinen und Glykolipiden umgeben und weist eine Protease-Resistenz auf. Die Außenschicht besteht aus einer 5 nm breiten, filamentösen Glykokalyx mit verschiedenen Polysacchariden (LENDNER und DAUGSCHIES 2014, HARRIS und PETRY 1999).

Der Erregernachweis erfolgt meist durch den mikroskopischen Nachweis ausgeschiedener Oozysten in Kotausstrichen, welche sich mit der modifizierten Ziehl-Neelsen Färbung oder der Ausschlussfärbung nach Heine anfärben lassen. Auch Immunfluoreszenztests, Antikörpertests oder Sektionen können als Diagnostikverfahren genutzt werden. Die Artdifferenzierung innerhalb der Gattung *Cryptosporidium* ist jedoch schwierig und muss molekularbiologisch erfolgen. Die real-time PCR ist eine geeignete Methode, um *C. parvum* DNA-basiert nachzuweisen (DEPLAZES et al. 2021).

*C. parvum* besitzt weltweit eine große Bedeutung als Zoonose. Die Prävalenz ist besonders bei Kindern sehr hoch. Bei einer Stuhlproben-Untersuchung von symptomatisch auffälligen Kindern unter fünf Jahren konnte der Erreger in 21,8 % der Fälle nachgewiesen werden. Meistens verläuft die Erkrankung beim Menschen jedoch mild und wird deshalb nicht als solche erkannt. Auch hier kann durch Immunsuppressionen eine starke Durchfallsymptomatik auftreten, welche unbehandelt letal verlaufen kann (HOVE et al. 2007).

In den vergangenen Jahren kam es immer wieder zu Ausbrüchen, die mit kontaminiertem Wasser oder Abwasser in Verbindung gebracht wurden. Einer der größten Ausbrüche fand 1993 in Wisconsin statt, bei dem durch ein Defizit der

Abwasseraufbereitungsanlagen 403.000 Menschen an einer Infektion mit *C. parvum* erkrankten (MAC KENZIE et al. 1994).

Die immer wieder auftretenden Fälle haben verschiedene Ursachen. Zum einen besitzt *C. parvum* eine hohe Tenazität. Die Oozysten bleiben bei kühlen Temperaturen bis zu einem Jahr außerhalb des Organismus infektiös. Der Mikroorganismus ist zudem gegenüber vielen Desinfektionsmitteln und auch Temperaturen zwischen -20 °C und 65 °C resistent. Dies hat zur Folge, dass mechanische, chemische und biologische Abwasseraufbereitungsverfahren nur begrenzt wirksam sind und infektiöse Stadien des Erregers in die Umwelt abgegeben werden. UV-Licht ist die effektivste Art, den Erreger in Abwasseraufbereitungsanlagen zu eliminieren, jedoch wird dieses Verfahren in den meisten Kläranlagen nicht eingesetzt (CAREY et al. 2004). Eine weitere Ursache für die hohe Anzahl der wasserassoziierten Infektionsausbrüche ist die hohe Erregerkonzentration im Abwasser, verursacht durch die hohe Prävalenz in Tier- und Menschenpopulationen und hohe Ausscheidungsraten. In einfließendem Abwasser wurden in Klärwerken in verschiedenen Ländern Prävalenzen von bis zu 100 % und Konzentration von bis zu 60.000 Oozysten pro Liter mit durchschnittlichen Werten von 10-200 Oozysten pro Liter nachgewiesen (NASSER 2016). Durch diese hohe Erregerlast im Abwasser implizieren auch geringe prozentuale Erregerrückstände im aufbereiteten Wasser relevante Erregerkonzentrationen, die in die Umwelt entlassen werden. Bereits niedrige Erregerkonzentrationen sind bei *C. parvum* ausreichend, um die Gesundheit von Tier und Mensch zu gefährden. Bei jungen Kälbern beträgt die infektiöse Dosis 100 Oozysten (DEPLAZES et al. 2021). Diese Gründe haben zur Folge, dass Wasser für den Erreger *C. parvum* einen der Hauptübertragungswege darstellt (SELBITZ et al. 2015).

## ***2.2 Ablauf der Abwasseraufbereitung in Deutschland***

Der Prozess der Abwasseraufbereitung lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen: die mechanische, chemische und biologische Reinigung. Nachdem das Abwasser über die Kanalisation in das Klärwerk gelangt, werden zuerst die Grobstoffe durch Rechen und Filter mechanisch eliminiert. Im Abwasser vorkommender Sand setzt sich durch eine Reduktion der Fließgeschwindigkeit am Boden ab und wird daraufhin abgesaugt. Im weiteren Verlauf werden die feineren Feststoffe im

Vorklärbecken als abgesetzter Schlamm oder oben schwimmende Fette eliminiert. Bei der chemischen Reinigung erfolgt eine Fällung und Flockung der gelösten Feststoffe wie beispielsweise Phosphat durch das chemische Fällungsmittel Eisen-III-Chlorid. Im Belebungsbecken zersetzt eine klärwerkspezifische Komposition aus Mikroorganismen vor allem organische Bestandteile im Wasser und nutzt diese für den eigenen Stoffwechsel. Das Nachklärbecken dient dazu, das abgesetzte Schlammgemisch aus organischen Bestandteilen und Mikroorganismen vom Beckengrund zu entfernen. Im Anschluss wird das aufgereinigte Wasser über öffentliche Gewässer zurück in den Wasserkreislauf eingeschleust. Ziel dieser Aufbereitung ist es, einen gefahrlosen Kontakt mit dem geklärten Abwasser für Tier, Mensch und Umwelt durch die Eliminierung chemischer, biologischer und mikrobiologischer Kontaminanten sicherzustellen (LEIPZIGER WASSERWERKE 2019).

## *2.3 Abwassermonitoring*

### 2.3.1 Aktuelle Gesetzeslage und Empfehlungen

In Deutschland wird die Abwasserüberwachung hauptsächlich durch die Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung) geregelt. Diese Vorschrift schreibt zwar die Untersuchung des Abwassers anhand chemischer und biologischer Parameter, jedoch trotz der oben genannten wasserassoziierten, zoonotischen Gefahren keine mikrobiologischen Analyseverfahren vor (DEUTSCHES BUNDESMINISTERIUM 2004). Eine Auflistung der in der Verordnung enthaltenen zu untersuchenden Parameter findet sich in Anhang 1.

Dieses Defizit mikrobiologischer Analysen steht damit im Gegensatz zu dem Großteil anderer reglementierter Untersuchungen im Wasserkreislauf. Die Vorgaben hier variieren je nach Verwendungszweck des Wassers. So beinhaltet beispielsweise die Verordnung (EU) 2020/741 des europäischen Parlaments und des Rates über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung neben einer Überwachung der Trübung, der gesamten suspendierten Feststoffe und des biochemischen

Sauerstoffbedarfs nach fünf Tagen auch mikrobiologische Parameter. Dazu zählen die maximalen Keimzahlen von *E. coli*, *Legionella* (bei einem Risiko der Aerosolbildung) und intestinalen Nematoden (bei Bewässerung von Weideflächen oder Futterpflanzen). Außerdem sind darin Grenzwerte für die Indikatormikroorganismen *E. coli*, Coliphagen, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, das Rotavirus und *Cryptosporidium* für die Nutzung des Wassers zur Bewässerung roh zu verzehrender Pflanzen festgelegt. Dabei werden die Proben gemäß der Norm EN ISO 19458 entnommen und die Erreger durch Analysemethoden nach Norm EN/IEC-17025 bestimmt (EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION 2020b).

Auch die Trinkwasserqualität wird zusätzlich zu chemischen Parametern (zum Beispiel: Bor, Chrom und Nitrat) ebenfalls durch mikrobiologische Grenzwerte (*E. coli* und Enterokokken) und Indikatororganismen (zum Beispiel: *Clostridium perfringens*, Coliforme Bakterien, Kolonienzahl bei 22 °C / 36 °C) überwacht. Diese Anforderungen finden sich in der Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung) (DEUTSCHES BUNDESMINISTERIUM 2001).

Für Tränkwasser enthält dahingegen kein Gesetz detaillierte mikrobiologische Parameter und Grenzwerte. Die Verordnung (EU) 183/2005 des europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene (Futtermittelhygieneverordnung) schreibt lediglich die Verwendung eines für die entsprechende Tierart geeigneten Tränkwassers und die Konstruktion von kontaminationsfreien Tränkanlagen vor (EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION 2005). In der Verordnung (EU) 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit (Basisverordnung) wird Tränkwasser als Futtermittel definiert, wodurch eine Aufnahme des Wassers ohne Beeinträchtigung der Tiergesundheit vorausgesetzt wird (EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION 2002). Beide Verordnungen sind sehr vage formuliert, wodurch entsprechende Maßnahmen der Tierhalter variieren können.

Wichtige Gesundheitsorganisationen wie die WHO, die WOAH oder die FAO haben die mikrobiologischen Gefahren, die von Wasser und vor allem von Abwasser ausgehen, bereits erkannt. Daher wurde beispielsweise im Rahmen einer Kooperation

ein technisches Briefing zum Thema „Wasser-, Sanitär-, Hygiene- und Abwassermanagement zur Verhinderung von Infektionen und zur Verringerung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen“ veröffentlicht. Darin wird unter anderem die Dringlichkeit der Selektion und Progression geeigneter Detektionsverfahren für Pathogene im Abwasser akzentuiert (FAO, WOA, WHO 2020). Bereits 2010 wurde sauberes Wasser und ein geeignetes Abwassersystem von den Vereinten Nationen zu einem von 13 Hauptzielen ernannt, die es bis 2030 weltweit für eine nachhaltige Entwicklung zu erreichen gilt (UNITED NATIONS 2015). Noch dazu sieht die WHO den Eintrag von Pathogenen über tierische Biomasse in den Wasserkreislauf als unterschätztes Risiko für die weltweite Gesundheit an und fordert flächendeckende und regelmäßige Monitoring-Programme (DUFOR 2012).

### 2.3.2 Zusätzliche Einsatzmöglichkeiten

Die Überwachung von Pathogenen im Abwasser hat zusätzlich zu der Vermeidung von wasserassoziierten Infektionsausbrüchen noch weitere Vorteile. Die Monitoring-Programme der „Wastewater Based Epidemiology“ dienen als Frühwarnsystem für verschiedenste Institutionen, um bestimmte Krankheitsausbrüche in Menschen- und Tierpopulationen zu detektieren (MAO et al. 2020). Ursprünglich basierten diese Studien darauf, einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen bestimmter Substanzen, welche in das Abwasser abgegeben werden und deren Konsum in der Gesellschaft herzustellen (zum Beispiel Tabak) (DAUGHTON 2001). Mit der Ausweitung der Methode auf Mikroorganismen könnten zukünftig Krankheitsausbrüche in einer Population nachgewiesen werden, noch bevor von klinischen Manifestationen berichtet wird. So können frühzeitig Maßnahmen getroffen werden, um einer Ausbreitung entgegenzuwirken und mögliche Massenausbrüche zu verhindern. Außerdem können wichtige Daten über die Verteilung von Krankheitserregern und über den Gesundheitszustand einer Population gesammelt werden, ohne einzelne Individuen untersuchen zu müssen (MAO et al. 2020).

Auch die Überwachung des Abwassers in Bezug auf multiresistente Entwicklungen birgt großes Potential. Multiresistente Keime stellen eine große und weltweit steigende Gesundheitsgefahr für Tiere und Menschen dar und zählen bis 2050 zu einer der Haupttodesursachen in der menschlichen Bevölkerung (O'NEILL 2014). Antibiotika

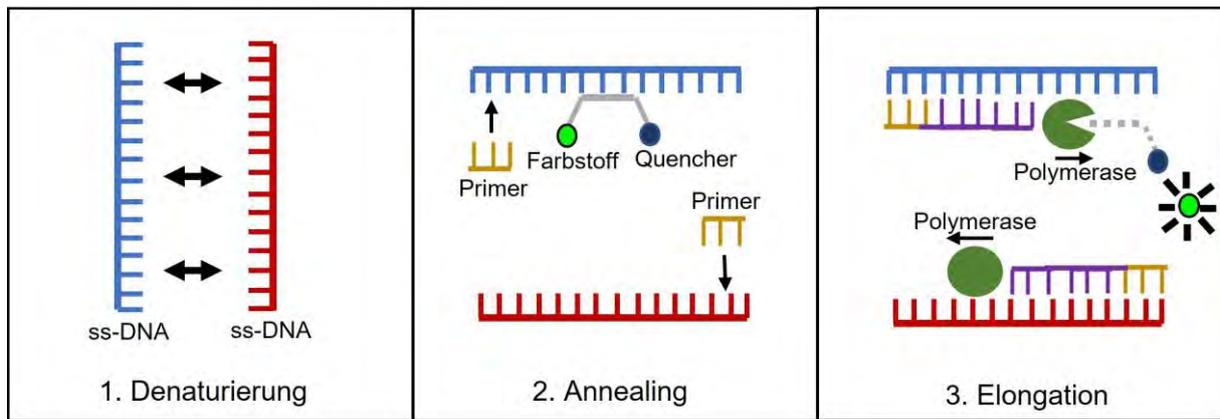
werden bei vielen infektiösen Krankheitsbildern in der Tiermedizin angewendet, wie zum Beispiel der Behandlung einer Mastitis in Rinderbeständen (BARLOW 2011) oder bei Respirationstrakts- und Harnwegsinfektionen von Hunden und Katzen (OLIN und BARTGES 2015, LAPPIN et al. 2017). Auch in der Humanmedizin werden Antibiotika bei einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen in hohem Maße appliziert (BROWNE et al. 2021). Viele dieser eingesetzten Antibiotikagruppen sind dabei von höchster Priorität und für die Gesundheit unerlässlich (WHO 2018). Durch einen übermäßigen oder fehlerhaften Einsatz der Medikamente können die Erreger jedoch antimikrobielle Multiresistenzen bilden, welche zu Behandlungsengpässen und demzufolge zu Gesundheitsrisiken führen (AARESTRUP et al. 2008). Viele applizierte Antibiotika werden als aktive Metaboliten über Fäkalien oder Urin ausgeschieden und gelangen so in das Abwasser, welches ein ideales Reservoir für die Resistenzentwicklung von Pathogenen darstellt (KRISTIANSSON et al. 2011, QIU et al. 2016). Außerdem findet sich in Exkrementen bereits eine Vielzahl multiresistenter Keime, welche ebenfalls in das Abwasser ausgeschieden, aber dort teilweise nicht vollständig eliminiert werden (QIAN et al. 2018).

#### *2.4 Nachweismethoden von Mikroorganismen im Abwasser: der Vergleich zwischen kultureller Anzucht und real-time PCR*

Für die Detektion von Mikroorganismen in Wasser existieren verschiedene Methoden. Während die real-time PCR zur Detektion von Parasiten bereits weitreichend etabliert worden ist, wird für die meisten bakteriellen Nachweise die kulturelle Anzucht beispielsweise in Europa (Richtlinie (EU) 2020/2184 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch) oder in den USA (Code of Federal Regulations: 40 CFR § 136.3) gesetzlich vorgeschrieben (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2022, FEDERAL GOVERNMENT U.S. 2021, EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION 2020a). Dabei wird das Probenmaterial auf einem Medium ausgestrichen und die Bakterien wachsen innerhalb einer bestimmten Inkubationszeit (oft 12-24 Stunden) zu Kolonien. Um die Vermehrung der Mikroorganismen in dem Medium zu garantieren, wird die Flüssigkeit mit Nährstoffen

wie Fleischbouillon oder Schafblut und weiteren Agenzien wie Pepton, Kochsalz und Natriumphosphat versetzt. Zur Selektion und Identifizierung von Mikroorganismen werden heutzutage vorrangig durch Agar-Agar gelierte Festnährböden nichtselektiv oder selektiv eingesetzt. Selektive Festnährböden ermöglichen durch die Zugabe von Farbstoffen oder antimikrobiellen Substanzen die vorläufige Identifikation bestimmter Pathogenspezies. Zusätzlich dazu sind Inkubationstemperatur und Sauerstoffgehalt entscheidend für den Kultivierungserfolg. Diese Anzuchtbedingungen werden durch die spezies-spezifischen Wachstumsoptima der Bakterien bedingt (MESSELHÄUßER 2010). Die kulturelle Anzucht von Bakterien zum Nachweis spezifischer Pathogene ist dabei streng reglementiert und durch die nationale und internationale Organisation für Normung standardisiert. Ein Beispiel ist hier die Vorgabe der europäischen Union zur Detektion von *E. coli* im Trinkwasser, welche eine Anzucht auf Chromogenen Coliform Agar für 18-24 Stunden bei 34-38 °C nach ISO Norm 9308-1:2014 vorschreibt (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 2014).

Zusätzlich zu diesen konventionellen Verfahren können für das Abwassermonitoring auch DNA-basierte Detektionsmethoden, wie beispielsweise die weit verbreitete und häufig eingesetzte real-time PCR, verwendet werden (MEDEMA et al. 2020). Der schematische Ablauf einer real-time PCR findet sich in Abbildung 4. Die Dauer dieses DNA-basierten Pathogennachweises variiert zwar erregerspezifisch, beträgt aber in den meisten Fällen nur ein bis zwei Stunden und ist dadurch im Vergleich zu der kulturellen Anzucht wesentlich schneller (HOLZAPFEL und WICKERT 2007).



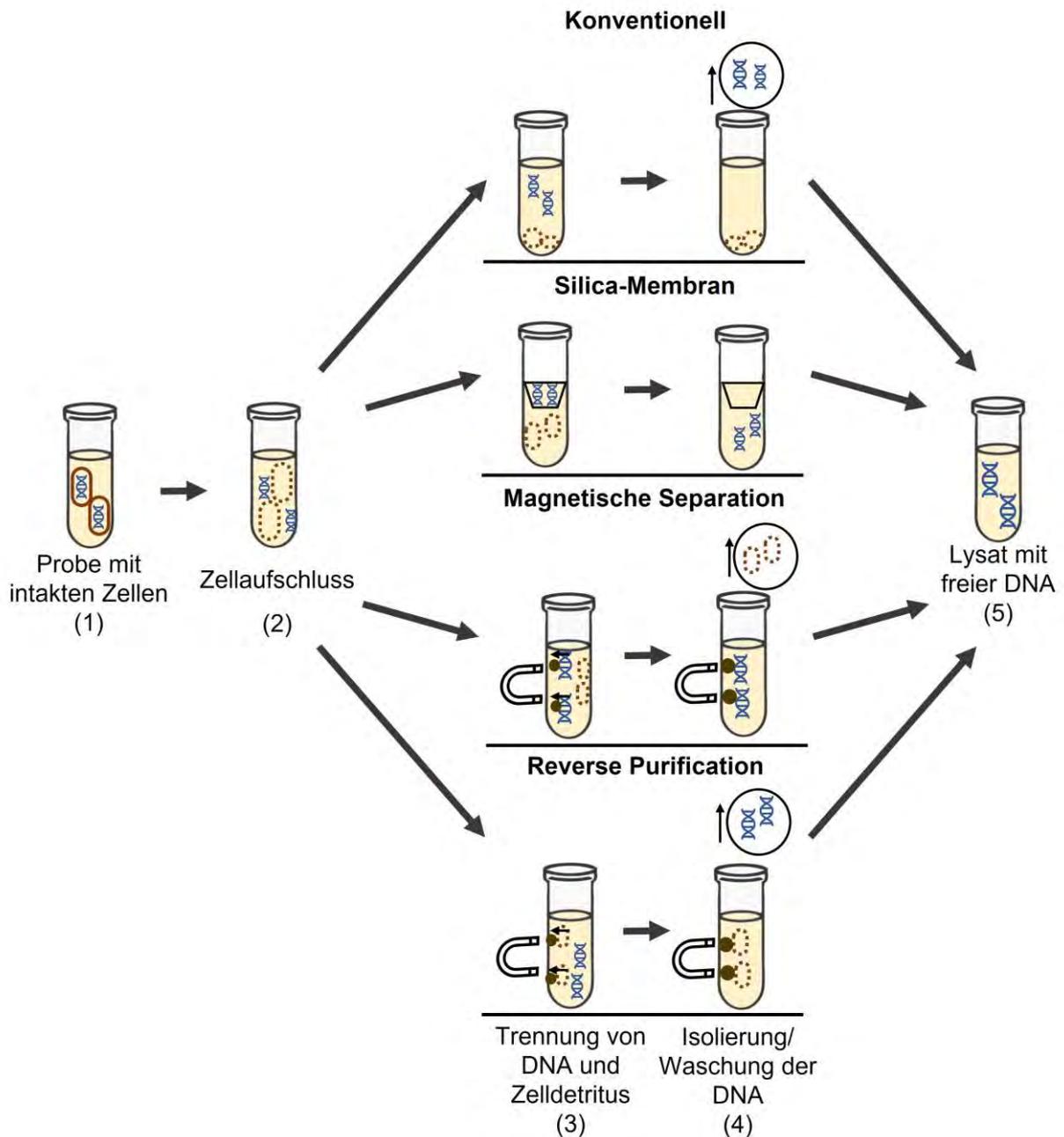
**Abbildung 4:** Darstellung eines DNA-Amplifikationszyklus der real-time PCR. In dem thermozyklischen Verfahren wird zunächst die Doppelstrang-DNA durch einen Hitzeschritt denaturiert und in Einzelstränge separiert. Im Annealing-Schritt binden spezifische Primer unter bestimmten Bindungstemperaturen an die dazugehörige Sequenz in der einzelsträngigen DNA (ss-DNA). In einem Elongationsschritt lagert sich eine Polymerase an den Primer an und die DNA wird durch den Einbau von Nukleotiden komplementär zum Ausgangsstrang amplifiziert (ABLEITNER 2014). Um den Amplifikationsfortschritt in Echtzeit zu detektieren, wird eine Sonde eingesetzt, welche an eine spezifische Genomsequenz bindet. Der darin enthaltene fluoreszierende Farbstoff wird dabei von einem Quencher inhibiert. Da die Polymerasen eine Exonukleasefunktion besitzen, wird bei der Amplifikation der Quencher abgespalten und der Farbstoff fluoresziert. Dabei existiert ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Menge amplifizierter Nukleinsäuren, wodurch der Amplifikationsfortschritt anhand der Fluoreszenzintensität kalkuliert werden kann (HOLZAPFEL und WICKERT 2007).

Die große Zeitersparnis mittels real-time PCR beeinflusst dabei weder Spezifität noch Sensitivität und erzielt analoge oder bessere Werte im Vergleich zur kulturellen Anzucht (KLEIN et al. 2010, CALL et al. 2001). Noch dazu können durch DNA-basierte Detektionsmethoden auch VBNC-Mikroorganismen nachgewiesen werden, welche oft in Fäkalien und Abwasser vorhanden sind (VALLEDOR et al. 2020). Prozesse in der Abwasserbehandlung, wie beispielsweise die Desinfektion mit Chlor oder auch der Einfluss von Sonnenstrahlung, erhöhen dabei die Anzahl an VBNC-Zellen im Wasser (OLIVER et al. 2005, BESNARD et al. 2002). Es ist relevant, auch diese Organismen

zu identifizieren, da sie trotzdem infektiös sein können (COLWELL et al. 1996). Eine Grundvoraussetzung für die Detektion pathogener DNA im Abwasser mittels real-time PCR ist die Existenz freier Nukleinsäuren. Um diese aus den Erregerzellen zu extrahieren, werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Bei der Selektion eines adäquaten Extraktionsverfahrens muss die stark variierende Extraktionseffizienz der einzelnen Methoden beachtet werden (KNUDSEN et al. 2016).

### *2.5 Extraktionsverfahren für Nukleinsäuren*

Die DNA-Extraktionsmethoden können anhand ihrer unterschiedlichen Verfahrensweisen in konventionelle und in Festphasen-Nukleinsäureextraktionen unterteilt werden (Abbildung 5) (TAN und YIAP 2009).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des grundsätzlichen Aufbaus einer Nukleinsäuren-Extraktion basierend auf ANON. (2023). Zuerst erfolgt ein mechanischer, chemischer und/oder enzymatischer Zellaufschluss (2). Nachdem Proteine verdaut und Dnasen/Rnasen inaktiviert wurden, werden die freien Nukleinsäuren durch verschiedene Verfahren vom Zelldetritus separiert (3). Die DNA wird schließlich durch unterschiedliche Methoden von den eingesetzten Extraktionsreagenzien und dem Zelldetritus getrennt (4) (ANON. 2023). Das Lysat mit der freien DNA kann dann für weitere molekulare Detektionsmethoden verwendet werden (5).

### 2.5.1 Konventionelle Extraktionsverfahren

Die konventionelle DNA-Extraktion basiert vorrangig auf chemischen Reaktionen, bei denen die Nucleinsäuren durch organische und anorganische Reagenzien aufgereinigt werden. Da viele der eingesetzten Chemikalien gesundheitsgefährdend und die Verfahren komplex, kosten- und zeitintensiv sind, wird diese Extraktionsart nur noch selten in der Praxis angewendet (TAN und YIAP 2009).

Zu den konventionellen Extraktionsverfahren zählt unter anderem die organische Isolation. Nach einer Zugabe von Lysepuffer, Phenol und Chloroform, sowie einer Zentrifugation trennt sich die Zelllösung in zwei Phasen – eine untere hydrophobe Phase mit Zelldetritus, Proteinen und Lipiden und eine obere wässrige DNA-Lösung. Mit Hilfe von Alkohol werden die in der wässrigen Lösung enthaltenen Salze ausgewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt kann der Überstand verworfen und das entstandene DNA-Pellet in einem Lagerungspuffer (zum Beispiel Tris-EDTA-Puffer oder Wasser) resuspendiert werden (BUCKINGHAM 2019).

Eine weitere Variante ist die alkalische Extraktion, welche vorrangig bei der Isolation von Plasmiden verwendet wird. Die Denaturierung von zirkulärer und linearer DNA ist abhängig vom pH-Wert, wodurch bei der inkrementellen Einstellung eines basischen Milieus die chromosomale DNA denaturiert, während die Plasmid-DNA intakt zurückbleibt. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat verstärkt die Lyse der Zellhülle und Proteine und induziert eine Komplexbildung aus Zelldetritus, Proteinen und denaturierten chromosomalen Nucleinsäuren. Nach Zentrifugation kann der Plasmid-DNA-enhaltende Überstand für molekulare Detektionsverfahren verwendet werden (BIRNBOIM und DOLY 1979).

Zur Separation von chromosomaler und Plasmid-DNA kann außerdem eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ethidium-Bromid und Cäsium-Chlorid verwendet werden. Ethidium-Bromid lagert sich in linearen DNA-Strängen stärker ein und verursacht ein verändertes Dichteverhalten der Nucleinsäuren in Cäsium-Chlorid. Ein mehrstündiger Zentrifugationsschritt induziert eine Phasenteilung und die Nucleinsäuren-enhaltende Phase kann entnommen werden. Mithilfe von hydrophoben Reagenzien wird Ethidium-Bromid schließlich von der DNA separiert und die Nucleinsäuren werden mit Alkohol ausgewaschen (SONG et al. 1999, WINK 2021).

## 2.5.2 Festphasen-Nukleinsäureextraktion

Die Festphasen-Nukleinsäureextraktion wird in den meisten kommerziellen Extraktionskits verwendet. Durch verschiedene Prinzipien wird die Probe in zwei Phasen geteilt - eine feste und eine in den meisten Fällen flüssige Phase. Die Nukleinsäuren verbleiben in einer der beiden Phasen und werden beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration von der verbleibenden flüssigen Phase oder durch Verdampfung von der festen Phase separiert. Die Entnahme der DNA ist durch eine eindeutige Trennung der beiden Schichten in Form von unterschiedlichen Aggregatzuständen effizienter als bei den konventionellen Extraktionsverfahren. Mit alkoholhaltigen Waschpuffern werden Komponenten, wie zum Beispiel Proteine gelöst, welche in der gleichen Phase wie die Nukleinsäuren enthalten sein können. Bei einer Bindung der DNA an die feste Phase wird diese mittels Tris-EDTA-Puffer oder Wasser von der festen zurück in eine flüssige Phase überführt. Dieser Schritt ist ausschlaggebend für die Extraktionseffizienz der Methode (MACDONALD 1995, ANON. 2023).

Ein Beispiel der Festphasen-Nukleinsäureextraktion ist die Silica-Membran. Chaotrophe Salze fördern die Zell-Lyse, inaktivieren Nukleasen und induzieren die Bindung der negativ geladenen DNA an die Festphase - das positiv geladene Silica-Material (ANON. 2023). Durch Zentrifugation wird der Überstand entfernt, während die DNA an der Silica-Membran haften bleibt. Waschschriffe mit Wasser oder Tris-EDTA-Puffer lösen die DNA in einem basischen Milieu von der Festphase (ESSER et al. 2006). Auch andere Materialien wie Nitrozellulose oder Polyamid können als Membranen eingesetzt werden (ARNOLD et al. 2005).

Eine weitere Möglichkeit ist die Aufreinigung durch sogenannte „*Magnetic Beads*“. Nach einer Zell-Lyse werden der Zelllösung diese paramagnetischen Partikel zugegeben. Diese sind mit magnetisierbarer Zellulose beschichtet und besitzen so eine Affinität zu Nukleinsäuren. Auch hier ist die Bindungsfähigkeit der DNA-Moleküle an die *Magnetic Beads* von einer spezifischen Salzkonzentration abhängig. Durch die Positionierung des Reagiergefäßes in einem Magnetständer lagern sich die *Magnetic Beads* und die daran haftenden Nukleinsäuren an der Gefäßwand an und der Überstand kann entfernt werden. Nach mehreren Waschschriffen wird die DNA anschließend von den paramagnetischen Partikeln durch Zugabe eines Puffers separiert. Nachdem die Kugeln unter Einsatz des Magnetständers erneut an der

Gefäßwand haften, kann der Überstand mit den enthaltenden Nukleinsäuren für molekular diagnostische Verfahren genutzt werden (BERENSMEIER 2006). Dieses Prinzip existiert auch in Form von Magnetstäben, an denen die DNA durch die *Magnetic Beads* haftet und so ohne die anderen Zellbestandteile in ein anderes Gefäß überführt werden kann (QIAGEN INC. 2010). Die beschriebenen Verfahren eignen sich aufgrund eines hohen Zeitaufwandes und ihrer Laborabhängigkeit jedoch nur sehr eingeschränkt für eine schnelle und unkomplizierte Extraktion von Nukleinsäuren (QIAGEN INC. 2010).

Die in dieser Studie verwendete Methode der DNA-Extraktion basiert auf einer *Reverse Purification* der Nukleinsäuren. Dabei ist die Beschichtung der *Magnetic Beads* so konstruiert, dass nach der Zell-Lyse nicht die Nukleinsäuren, sondern Zelldetritus, Proteine und andere Bestandteile an die *Magnetic Beads* binden. Demzufolge verbleiben die Nukleinsäuren nach der Positionierung in einem Magnetstand frei in der Lösung. Die DNA-Lösung kann anschließend ohne weitere Wasch- und Lösungsschritte direkt für die DNA-basierten Diagnostik-Methoden genutzt werden (XPEDITE DIAGNOSTICS INC. 2021). Eine Grundvoraussetzung für die effiziente DNA-Extraktion ist ein adäquater Zellaufschluss. Dabei ist zu beachten, dass die Morphologie der im Abwasser vorkommenden Pathogene und demzufolge auch die Empfindlichkeit gegenüber der Lyseverfahren stark variiert (KNUDSEN et al. 2016). So ist beispielweise die Resistenz der dünnen und labilen Zellhülle gramnegativer Bakterien gegenüber den Lyseverfahren eher gering. Grampositive Bakterien besitzen hingegen aufgrund ihrer prominenten Peptidoglykanschicht eine sehr robuste Zellwand (MADIGAN et al. 2015). Die Oozystenwand von Parasiten ist ebenfalls aufgrund ihrer Konstitution sehr stabil, was den Zellaufschluss in beiden Fällen erschwert (LENDNER und DAUGSCHIES 2014).

## 3. Publikation

### 3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation

Hiermit bestätige ich, dass ich die Literaturrecherche, die Versuche, die Interpretation und die Erstellung des Erstentwurfes des Manuskriptes eigenständig durchgeführt habe. Prof. Dr. Uwe Truyen, Dr. Ahmed Abd El Wahed und Dr. Andy Wende haben mich bei der Versuchsplanung, der Ergebnisanalyse und der Überarbeitung des Manuskriptes unterstützt. Alle dargestellten Grafiken, Tabellen und statistischen Analysen wurden von mir erstellt. Die Fertigstellung und Einreichung des Manuskriptes wurde von allen Co-Autoren unterstützt und akzeptiert.

### 3.2 Publikation

#### **Rapid Reverse Purification DNA Extraction Approaches to Identify Microbial Pathogens in Wastewater**

Sarah Schurig <sup>1,2</sup>, Rea Kobiaka <sup>1</sup>, Andy Wende <sup>2</sup>, Md Anik Ashfaq Khan <sup>1</sup>, Phillip Lübcke <sup>3</sup>, Elias Eger <sup>4,5</sup>, Katharina Schaufler <sup>3,4,5</sup>, Arwid Dausgies <sup>6</sup>, Uwe Truyen <sup>1</sup> and Ahmed Abd El Wahed <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany;

<sup>2</sup> Xpedite Diagnostics GmbH, 80687 Munich, Germany;

<sup>3</sup> Institute of Pharmacy, University of Greifswald, 17489 Greifswald, Germany;

<sup>4</sup> Institute of Infection Medicine, Christian-Albrecht University Kiel, 24105 Kiel, Germany;

<sup>5</sup> University Medical Center Schleswig-Holstein, 24105 Kiel, Germany

<sup>6</sup> Institute of Parasitology, Centre for Infectious Disease, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany;

Erhalten: 10. Februar 2023

Akzeptiert: 18. März 2023

Publiziert: 22. März 2023

Microorganisms 2023, 11, 813; <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030813>



## Article

# Rapid Reverse Purification DNA Extraction Approaches to Identify Microbial Pathogens in Wastewater

Sarah Schurig <sup>1,2</sup>, Rea Kobialka <sup>1</sup>, Andy Wende <sup>2</sup>, Md Anik Ashfaq Khan <sup>1</sup>, Phillip Lübcke <sup>3</sup>, Elias Eger <sup>4,5</sup>, Katharina Schaufler <sup>3,4,5</sup>, Arwid Dausgchies <sup>6</sup>, Uwe Truyen <sup>1</sup> and Ahmed Abd El Wahed <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany

<sup>2</sup> Xpedite Diagnostics GmbH, 80687 Munich, Germany

<sup>3</sup> Institute of Pharmacy, University of Greifswald, 17489 Greifswald, Germany

<sup>4</sup> Institute of Infection Medicine, Christian-Albrecht University Kiel, 24105 Kiel, Germany

<sup>5</sup> University Medical Center Schleswig-Holstein, 24105 Kiel, Germany

<sup>6</sup> Institute of Parasitology, Centre for Infectious Disease, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany

\* Correspondence: ahmed.abd\_el\_wahed@uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-97-38153

**Abstract:** Wastewater monitoring became a promising solution in the early detection of outbreaks. Despite the achievements in the identification of pathogens in wastewater using real-time PCR, there is still a lack of reliable rapid nucleic acid extraction protocols. Therefore, in this study, samples were subjected to alkali, proteinase K and/or bead-beating followed by reverse purification magnetic beads-based separation. Wastewater samples spiked with *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum* were used as examples for Gram-positive and -negative bacteria and protozoa, respectively. All results were compared with a spin column technology as a reference method. Proteinase K with bead beating (vortexing with 0.1 mm glass beads for three minutes) was particularly successful for bacterial DNA extraction (three- to five-fold increase). The most useful extraction protocol for protozoa was pre-treatment with proteinase K (eight-fold increase). The selected methods were sensitive as far as detecting one bacterial cell per reaction for *S. aureus*, ten bacterial cells for *E. coli* and two oocysts for *C. parvum*. The extraction reagents are cold chain independent and no centrifuge or other large laboratory equipment is required to perform DNA extraction. A controlled validation trial is needed to test the effectiveness at field levels.

**Keywords:** DNA extraction; reverse purification; wastewater; surveillance



**Citation:** Schurig, S.; Kobialka, R.; Wende, A.; Ashfaq Khan, M.A.; Lübcke, P.; Eger, E.; Schaufler, K.; Dausgchies, A.; Truyen, U.; Abd El Wahed, A. Rapid Reverse Purification DNA Extraction Approaches to Identify Microbial Pathogens in Wastewater. *Microorganisms* **2023**, *11*, 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030813>

Academic Editors: Carlo Salerno, Stefano Amalfitano and Simon Swift

Received: 10 February 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 18 March 2023

Published: 22 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Classical surveillance methods for the identification of endemic or emerging pathogens have a limited significance with increasing populations [1]. Therefore, the monitoring of wastewater became an important tool to tackle the spread of antimicrobial-resistant bacteria [2], poliovirus [3] and SARS-CoV-2 [4], mostly originating from humans and animals. The World Health Organization declared that especially zoonotic microorganisms entering the water cycle from animal excreta are an underestimated hazard for humans and animals as well as the environment [5]. Animal waste represents 80% of the global fecal biomass and is expected to increase in the coming years [6]. This huge amount has an influence on the composition of the microbial profile of surface water, leading to an increased risk of waterborne zoonotic diseases. The exact burden of the environment as a reservoir is difficult to determine due to a lack of data and legislation. Wastewater screening has increased the potential for pathogen surveillance to prospectively reduce the risk of (re)infection of humans and animals, including the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) and the protozoan *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) [5,7–9]. *S. aureus* and *E. coli* are, in many cases, commensal but can cause diseases in both humans and animals. Symptoms of *S. aureus* infections in humans and animals include skin lesions, endocarditis, pneumonia

and/or septicemia, in addition to mastitis in animals [10,11]. Depending on the *E. coli* subtype, gastrointestinal, urinary tract infections, meningitis and/or septicemia were recorded [12]. *C. parvum* induces gastrointestinal symptoms, such as diarrhea and/or vomiting, mainly in humans and cattle [13,14].

With water scarcity expected to affect half of the world's population by 2025, the use of inadequately treated wastewater, e.g., in agriculture and the community, will be a serious and increasing risk to livestock, wildlife and humans [15]. Routine governmental monitoring for contaminants in water does exist in Europe and North America to prevent waterborne diseases. However, they often cover only a small number of pathogens and are limited to culture-based methods [16–18]. Nevertheless, culturing pathogens is time-consuming, and, in addition, not all pathogens are culturable. In contrast, molecular diagnostics such as polymerase chain reaction (PCR) are faster and cover wide ranges of microorganisms with a higher specificity and sensitivity [19,20]. For molecular detection, a suitable DNA extraction method is crucial and can influence the outcomes of the PCR assay [21]. Many extraction methods have been established to assure DNA quality. Most of them are costly, time-consuming and require complex electrical equipment [22]. Moreover, introducing variations in nucleic acid extraction protocols can be deemed necessary due to differences in characteristic cellular features among pathogens. Therefore, rapid and simple extraction procedures with minimum handling will lead to better quality nucleic acids, which improves the final molecular results.

The aim of this study was to evaluate a rapid, portable and reliable extraction method that achieves a high amount of extracted DNA for the subsequent detection of pathogens by real-time PCR. Cell suspensions with *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum* were used as representatives for Gram-positive and -negative bacteria and parasites, respectively.

The extraction and purification of DNA that will be applied here relies on the reverse purification principle utilized by the SwiftX DNA kit. Reverse purification means that cell debris and impurities are bound by magnetic beads during the cell lysis step. The debris- and inhibitor-loaded magnetic beads are then attracted by a magnet, which leads to a clearance of the crude lysate. After magnetic separation, the nucleic acids in the supernatant can be used directly for amplification or for storage.

Different pre-treatment options, such as the addition of proteinase K (PK), alkaline treatment (AT) or bead beating (BB) were evaluated separately or in combination. As a reference, a spin column technique was applied in this study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Preparation

Cell suspensions of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 799) and *Escherichia coli* (DSM 682) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures in Braunschweig, Germany, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Before use, these samples were cultivated overnight on Columbia Blood Agar with sheep blood (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Bacterial colonies were removed from the agar plate, resuspended in  $700\ \mu\text{L}$  phosphate-buffered saline (PBS) and pelleted ( $6000\times g$ , 3 min) using a microcentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). Oocysts of *Cryptosporidium parvum* (provided by the Institute of Parasitology, Centre for Infectious Disease, Leipzig University, Leipzig, Germany) were stored in a solution containing 2% of  $250\ \mu\text{g}/\text{mL}$  Amphotericin B (Biochrom GmbH, Cambridge, UK), 2% of  $10,000\ \text{U}/\text{mL}$  Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% of  $1\ \text{mg}/\text{mL}$  Gentamycin (Biochrom GmbH, Cambridge, UK) and 95% PBS at  $4^{\circ}\text{C}$ . The oocyst solution was also pelleted ( $16,600\times g$ , 5 min). The pellets of *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum* were washed in  $200\ \mu\text{L}$  PBS and pelleted at  $6000\times g$  for three minutes and the supernatant was discarded. *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum* were pelleted separately or combined based on the experiment layout.

## 2.2. DNA Extraction

### 2.2.1. Spin Column-Based Method

A DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used as the spin column reference method. DNA of *S. aureus* and *E. coli* was extracted following the manufacturer's instructions for Gram-positive and -negative bacteria, respectively. The only modification for *S. aureus* was the inclusion of bead beating as the pellet was resuspended in 400 µL PBS and transferred into a Soil Grinding SK38 Precellys Lysing Tube (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France). The suspension was mixed in Precellys 24 Tissue Homogenizer (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) at 6500 rpm for one minute. A total of 200 µL of the cell suspension was treated as described in the manufacturer's basic protocol. For *C. parvum*, 100 µL of 1.2% taurocholic acid sodium salt hydrate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the cell suspension followed by incubation at 37 °C for 120 min. The suspension was pelleted (13,000 × g, 5 min) and resuspended in 80 µL PBS, 100 µL ATL Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 20 µL PK. The procedure was continued as the recommendation by the manufacturer's protocol for Gram-negative bacteria. This was considered a "spin column" reference method.

### 2.2.2. Rapid Principle of DNA Extraction and Pre-Treatment Options

As the main procedure of DNA extraction, the "SwiftX DNA" Kit (Xpedite Diagnostics, Munich, Germany) was used according to the instructions of the manufacturer. Different pre-treatments were applied as follows: None (I), addition of PK (II), AT at room temperature (III) or 95 °C (IV) and BB (V). No pre-treatment included an incubation step at 95 °C for 15 min, as required by the manufacturer's basic protocol. In the case of AT, 200 mM sodium hydroxide was added to the lysis mixture, incubated for 15 min and neutralized with 200 mM hydrochloric acid. An overview of the various procedures can be seen in Table 1. The detailed standard operation procedures (SOP) of the DNA extractions can be found in the Supplementary Materials (S1). After the selection of the best pre-treatment procedure, a combination of multiple pre-treatments was tested as follows: PK was combined with AT at 95 °C (protocols II + IV) or BB (protocols II + V). In each run, one sample with no extraction procedure, one sample using only BB and one sample extracted by a spin column reference method with and without BB were included as control.

Table 1. Overview of working steps for different extraction protocols.

Protocol ID	Extraction Method	Buffer + Magnetic Beads	Proteinase K	Alkali	Bead Beating	10 min 60 °C	15 min RT	15 min 95 °C	Magnetic Separation
I	No pre-treatment	x						x	x
II	Proteinase K	x	x			x		x	x
III	Alkaline treatment RT	x		x			x		x
IV	Alkaline treatment 95 °C	x		x				x	x
V	Bead beating	x			x			x	x

RT = room temperature.

### 2.2.3. Bead Beating

For the bead beating tests, DNA of *E. coli* and *S. aureus* was extracted with a combination of BB and PK (II + V). The pellets were resuspended in 300 µL DLN Buffer (Xpedite Diagnostics, Munich, Germany) and transferred into a 2 mL microcentrifuge tube containing 250 mg of glass beads (Sigmund Lindner, Warmensteinbach, Germany). Glass bead sizes were Ø 0.1 mm (0.09–0.15 mm), Ø 0.5 mm (0.4–0.6 mm) or Ø 1.0 mm (0.70–1.30 mm). The suspension was mixed at 2000 rpm in the Vortexer (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA) for three minutes or in the Hulamixer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for five minutes. A total of 200 µL of each cell suspension was transferred into a new microcentrifuge tube, mixed with 10 µL PK and treated using protocol II. In the case of *C. parvum*, DNA was extracted either with protocol II or using PK in combination with 0.1 mm or 0.5 mm glass beads in the Vortexer as described before. The performance of BB

for *C. parvum* was also evaluated with prefilled tubes containing 0.1 mm zirconium beads (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA).

#### 2.2.4. Limit of Detection (LOD)

A total of  $10^7$  (*S. aureus*) and  $10^8$  (*E. coli*) bacterial cells and  $10^5$  oocysts of *C. parvum* were counted with an Olympus BX40 microscope (Microscopy Technologies, Tokyo, Japan), using a Neubauer Chamber—An amount of 200  $\mu$ L of wastewater, provided as unfiltered influent water retrieved from the sewage treatment plant Greifswald-Ladebow, Greifswald, Germany, was spiked with the bacterial cells and oocysts. A tenfold serial dilution of the spiked wastewater was prepared. For the DNA extraction of *S. aureus* and *E. coli*, 200  $\mu$ L of each dilution was mixed with 200  $\mu$ L DLN Buffer and the procedure was continued as described in Section 2.2.3. using 0.1 mm glass beads and the Vortexer for BB. In the case of *C. parvum*, protocol II (Table 1) with DLN buffer was used. Nucleic acids of each dilution after extraction were tested using real-time PCR. For the determination of LOD, this was repeated three times. The detailed protocols of the DNA extractions can be found in the supplementary (S2). A layout of the final extraction procedure is illustrated in Figure 1.

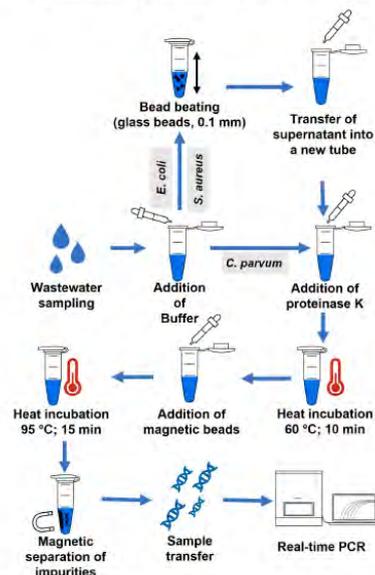


Figure 1. Flowchart of the rapid extraction method selected for determining the limit of detection for *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum*.

#### 2.3. Real-Time PCR

All extracted samples were screened in real-time PCR operated in a Stratagene Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) according to the pipetting scheme and thermal profile stated in Table 2. The selection of primers and probes, volumes and thermal profiles was based on the study of Luciani et al. for *S. aureus* [23] and Tillman et al. for *E. coli* [24]. In the case of *C. parvum*, the real-time PCR protocol described by Dresley et al. [25] was employed.

Table 2. Real-time PCR protocols for *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum*.

	Mastermix	Thermal Profile <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i>	10.00 µL QuantiNova Probe Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) 0.64 µL Primer/Probe Mix 1.28 µM forward primer StaphF 1.28 µM reverse primer StaphR 0.64 µM probe StaphP 8.36 µL PCR clean water 1.00 µL template	Denaturation: 95 °C; 120 s Amplification (45 cycles): Denaturation: 95 °C; 5 s Annealing and extension: 60 °C; 30 s
<i>E. coli</i>	10.00 µL QuantiNova Probe Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) 1.00 µL Primer/Probe Mix 0.40 µM forward primer gadE-F 0.40 µM reverse primer gadE-R 0.20 µM probe gadE-Probe 8.00 µL PCR clean water 1.00 µL template	Denaturation: 95 °C; 120 s Amplification (35 cycles) <sup>1</sup> : Denaturation: 94 °C; 15 s Annealing and extension: 56 °C; 45 s
<i>C. parvum</i>	12.50 µL Maxima probe/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 0.30 µL forward primer (0.30 µM) CP_hsp70_fwd 0.90 µL forward primer (0.90 µM) CP_hsp70_rvs 0.20 µL forward primer (0.20 µM) Hsp70_snd 6.10 µL PCR clean water 5.00 µL template	Denaturation: 95 °C; 900 s Amplification (40 cycles): Denaturation: 95 °C; 15 s Annealing and extension: 60 °C; 60 s

<sup>1</sup> Forty cycles for the determination of limit of detection; <sup>2</sup> Thermal profile of *C. parvum* was used in case of multiplexing with *S. aureus*.

#### 2.4. Determination of Nucleic Acid Concentration

Nucleic acid concentration was measured using a Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a Qubit 2.0 Fluorometer in combination with a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the instructions of the manufacturers.

#### 2.5. Statistical Analysis

The LOD with 95% probability and the probability of detection (POD) were determined by the method of Wilrich and Wilrich recommended in the ISO standard 16140-2:2016 using the PODLOD program version 11 (Freie Universität Berlin, Berlin, Germany) [26]. The correlation between nucleic acid measurement by Qubit, Nanodrop and real-time PCR was determined according to the distribution of data using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Based on the quantification cycle ( $C_q$ ), the total amount of extracted DNA was calculated using the following formula making the highest  $C_q$  adapted to the reagent volume 100%:

$$DNA_{Norm.ex.} = \frac{1}{200 * 2^{(C_{q1} - C_{q_{low}})}} * V$$

$$DNA_{Norm.ex.100\%} = \frac{100 * DNA_{Norm.ex.}}{DNA_{Norm.ex.high}}$$

$DNA_{Norm.ex.}$  = total amount of recovered DNA (%)

$C_{q1}$  = measured quantification cycle for the sample of interest

$C_{q_{low}}$  = lowest quantification cycle of each run

$V$  = total volume (µL)

$DNA_{Norm.ex.100\%}$  =  $DNA_{Norm.ex.}$  normalized to a maximum amount of 100%

$DNA_{Norm.ex.high}$  = highest amount of  $DNA_{Norm.ex.}$  of each run (%)

### 3. Results

#### 3.1. Comparison of Various Extraction Procedures

Several pre-treatment options were tested to identify the most efficient DNA extraction procedure for *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum*. All tested protocols are summarized in Table 1. For *S. aureus*, the addition of a BB step to the SwiftX protocol resulted in the highest DNA

recovery and was more than two-fold higher than the spin column reference method (Figure 2). The combination of PK or AT with the SwiftX protocol resulted in no significant effect on the DNA yield. The most efficient extraction methods for *E. coli* were SwiftX combined with AT at 95 °C or the addition of PK. Surprisingly, DNA recovery rates using the spin column reference method were five times lower (Figure 2). For the extraction of *C. parvum*, the SwiftX protocols showed a zero- to five-fold better performance than the spin column reference protocol. The AT at 95 °C or preincubation with PK increased the amount of recovered DNA compared to the spin column reference method four- and five-fold, respectively (Figure 2).

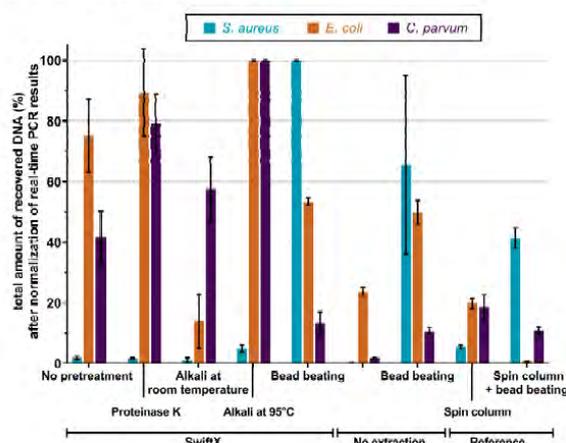


Figure 2. Performance of various extraction protocols with and without pre-treatment. The percentage of recovered DNA for different pre-treatment protocols was measured after the normalization of real-time PCR results. Cell suspension of  $10^7$  bacterial cells of *S. aureus*,  $10^8$  bacterial cells of *E. coli* or  $10^6$  oocysts of *C. parvum* was pelleted and extracted. DNA was measured by real-time PCR. The highest percentage of recovered DNA was achieved using SwiftX with bead beating in the case of *S. aureus*. SwiftX with proteinase K or alkaline treatment for *E. coli* and *C. parvum* revealed the best DNA recovery rate.

### 3.2. Evaluation of Combined Pre-Treatment Protocols

The best single pre-treatment protocols (Figure 2) were combined to determine the most effective mixture with SwiftX. Pre-treatments with none, PK, PK + BB and PK + AT at 95 °C were tested. The results are shown in Figure 3. For *S. aureus*, the highest amount of DNA was obtained in the protocol of SwiftX with PK + BB, which was the only method to outperform the spin column reference technique (an increase of DNA amount by a factor of three). In contrast, all combinations of pre-treatment and SwiftX for the extraction of *E. coli* performed three to seven times higher than the spin column reference method. Prominently, a seven- and five-fold increase was achieved for the SwiftX protocol with PK or a combination of PK and BB, respectively. Likewise, the DNA of *C. parvum* was recovered in a six- to ten-fold higher amount with all variations of the SwiftX protocol compared to the spin column reference method. Nevertheless, the best results were achieved using pre-treatment with PK, PK + BB or PK + AT.

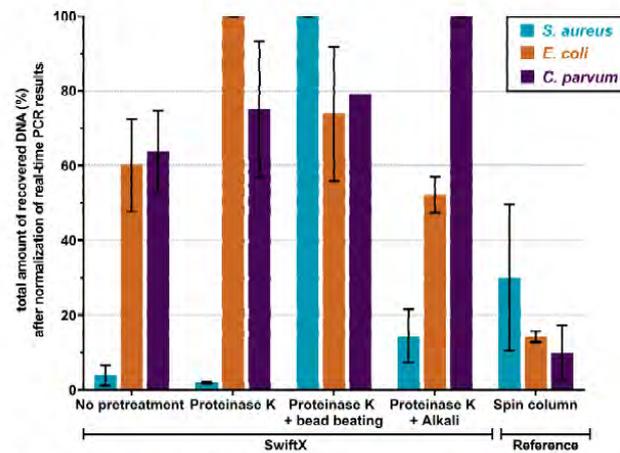


Figure 3. Results of the combination of various pre-treatment protocols. Between  $10^6$  and  $10^8$  of bacterial cells of either *S. aureus* or *E. coli*, as well as oocysts of *C. parvum*, were prepared to test a maximum dual pre-treatment based on the best performer in Figure 2. Highest percentage of recovered DNA was achieved using SwiftX combined with proteinase K and bead beating for *S. aureus*. For *E. coli*, proteinase K or a combination of proteinase K and bead beating proved to be most efficient, while proteinase K or a combination of proteinase K and either bead beating or alkaline treatment worked the best for *C. parvum*.

### 3.3. Influence of Different Bead-Beating Methods and Glass Bead Sizes on the DNA Extraction Performance

DNA was extracted from a bacterial cell suspension of *S. aureus* and *E. coli* using the SwiftX protocol combined with a BB step with glass beads in sizes 0.1 mm, 0.5 mm or 1.0 mm. Additionally, performances of a simple hulamixer or Vortexer for the BB step were compared to each other to avoid the use of an expensive complex BB device. The use of 0.1 mm glass beads together with the Vortexer outperformed all tested extraction methods for *S. aureus* (Figure 4). In contrast, the different BB variations for the DNA extraction of *E. coli* did not show a significant difference. In the case of *C. parvum*, glass beads in sizes 0.1 mm and 0.5 mm, as well as 0.1 mm zirconium beads, were used for DNA extraction with the SwiftX protocol. Results were comparable to the use of SwiftX with PK; no advantages were recorded for *C. parvum* DNA recovery.

### 3.4. Correspondence of Quantification Cycle Determined by Real-Time PCR and Nucleic Acid Concentration Measured by Nanodrop and Qubit

No substantial correlation could be identified between the nucleic acid concentration measured by Nanodrop or Qubit and the  $C_q$  values by real-time PCR for *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum*, as shown in S3.

### 3.5. Time and Pipetting Steps of Various Extraction Protocols

To identify the best protocol for rapid extraction time, working steps, reagents volume and number for electrical devices for each protocol were compared. While SwiftX required three to five working steps in a total of 30 or 35 min, the spin column reference method needed more time (up to 270 min) and seven to nine pipetting steps. A BB step needs larger volumes of reagents (400–480  $\mu$ L) and a tissue homogenizer or Vortexer. A heat block was crucial for all protocols and a high-speed centrifuge was a must for the spin column reference method, while it was not required for the SwiftX technology (Table 3).

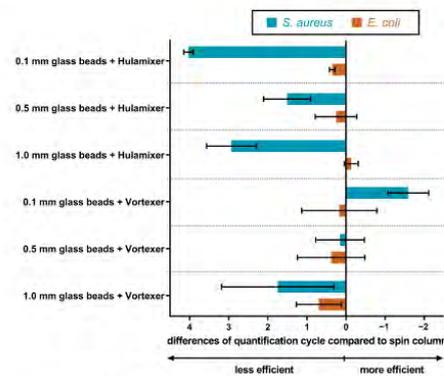


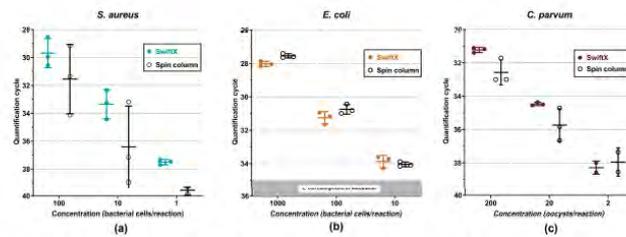
Figure 4. Effect of glass bead size and bead beating force on the extraction performance. To identify the optimal protocol for DNA recovery, SwiftX was combined with bead beating using glass beads with different sizes (0.1 mm, 0.5 mm or 1.0 mm). The real-time PCR results of SwiftX protocols and the spin column reference technique were compared. The use of 0.1 mm glass beads combined with the Vortexer showed the best results for *S. aureus*, while equal performance was achieved for *E. coli*.

Table 3. Number of working steps, time (min.), added volume of reagents (in  $\mu\text{L}$ ) and the number of additional electric devices for different extraction protocols for *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum*.

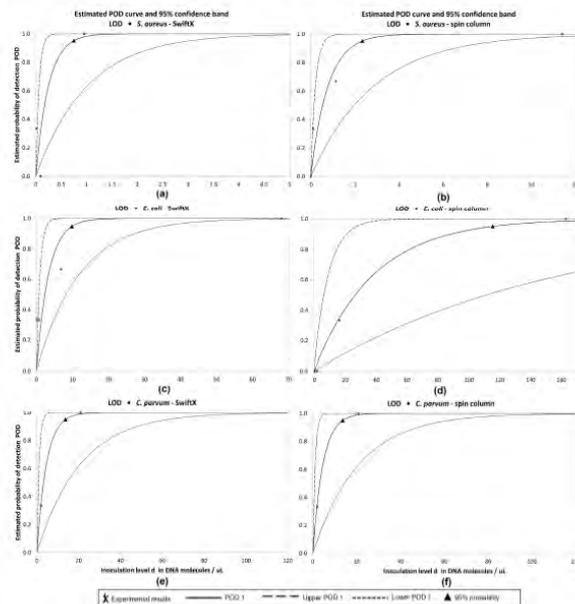
Extraction Method	Working Steps	Time (min.)	Added Reagents ( $\mu\text{L}$ )	Use of Electric Devices
SwiftX + no pre-treatment	3	30	200	-
SwiftX + proteinase K	3	30	200	-
SwiftX + proteinase K + bead beating	4	35	480	Tissue homogenizer (or Vortexer)
SwiftX + proteinase K + alkali 95 °C	5	35	300	-
Spin column				
<i>S. aureus</i>	7	40	400	Centrifuge + tissue homogenizer
<i>E. coli</i>	6	150	200	Centrifuge
<i>C. parvum</i>	9	270	200	Centrifuge

### 3.6. Determination of LOD for the Extraction Method of Choice

The combination of the SwiftX protocol with the use of PK + BB was chosen as the method of choice for *S. aureus* and *E. coli*. For *C. parvum*, the SwiftX protocol including PK treatment was selected. The LOD of the DNA extraction method for each pathogen was determined in a ten-fold serial dilution of spiked wastewater to simulate the real case scenario. An amount between  $10^3$  and  $10^6$  bacterial cells or oocysts per microliter was used to spike the wastewater and was extracted with the respective protocol using the spin column reference method as control. Down to one bacterial cell of *S. aureus* per reaction was detected by combining the methods of choice with real-time PCR. The detected amount of DNA for each dilution was on average 0.7 log levels higher than the spin column reference method (Figure 5a). The number of detected cells per microliter in each dilution of *E. coli* sample after extraction with SwiftX and PK + BB were comparable to those achieved with the spin column reference method. In lower dilutions, ten DNA molecules per reaction were consistently detected due to the background level of *E. coli* in the wastewater (Figure 5b). Down to two oocysts of *C. parvum* per reaction were detected by both the SwiftX and spin column reference techniques (Figure 5c). With a 95% probability, 0.74 copies per reaction with SwiftX and 2.33 copies per reaction with the spin column reference method were calculated for *S. aureus*. In the case of *E. coli*, 9.94 and 115.1 copies per reaction were identified for SwiftX and the spin column reference method, respectively. For the extraction of *C. parvum* DNA, both methods, the SwiftX protocol and the spin column reference method, achieved 13.55 copies per reaction. The probability of detection curves are shown in Figure 6.



**Figure 5.** Determination of limit of detection in spiked wastewater samples extracted by the most efficient extraction procedures for *S. aureus* (a), *E. coli* (b) and *C. parvum* (c). SwiftX protocol was combined with proteinase K and a bead-beating step for *S. aureus* and *E. coli*, whereas for *C. parvum*, the proteinase K and SwiftX protocol was applied. Ten-fold serial dilutions of spiked wastewater were screened. After extraction, the quantification cycle of each dilution was measured using real-time PCR. All results were compared to a spin column reference method. Down to one bacterial cell of *S. aureus* per reaction was detected (a), while the threshold was ten with *E. coli* (b). For *C. parvum*, the limit of detection was two oocysts per reaction (c). Because of the *E. coli* pre-existence in wastewater, the shaded zone in (b) represents the background values.



**Figure 6.** Probability of detection of method of choice for the extraction of *S. aureus* (a,b), *E. coli* (c,d) and *C. parvum* (e,f). Between  $10^3$  and  $10^6$  bacterial cells or oocysts per microliter were spiked into wastewater in a ten-fold serial dilution. In the case of *S. aureus* and *E. coli*, DNA was extracted using SwiftX in combination with proteinase K and bead beating. For *C. parvum*, the SwiftX protocol was combined in a preincubation with proteinase K. The efficiency of the extraction protocols was compared to a spin column reference method. The probability of the detection function was calculated by the Wilrich and Wilrich model using quantification cycles measured by real-time PCR. The 95% probability is depicted as a triangle. For *S. aureus*, 0.74 copies per reaction with SwiftX (a) and 2.33 with the spin column reference method (b) were calculated. For *E. coli*, 9.94 and 115.1 copies per reaction were measured for SwiftX (c) and the spin column reference method (d), respectively. In the case of *C. parvum*, 13.55 copies per reaction were determined for both the SwiftX (e) and the spin column reference method (f).

#### 4. Discussion

In this study, a portable rapid DNA extraction method based on reverse purification separation was established for the extraction of pathogen DNA from wastewater. The method included a pre-treatment with PK and BB for bacteria and a pre-treatment with PK for protozoa, respectively.

In all experiments, molecular testing (real-time PCR) was selected over culture-based detection methods which required 12 h of incubation and specially trained laboratory staff. Real-time PCR is much faster while enabling a high sensitivity and specificity of the analysis [20,27]. As clearly shown in our study and by other groups, DNA extraction is a very crucial step to obtain a sufficient amount and quality of DNA for real-time PCR, which is instrumental in avoiding false negative results [21,22]. In this regard, it is not only the quality of the assay that affects the sensitivity of the detection method, but also the extraction procedure.

Although all tested combinations of sample pre-treatment led to detectable amounts of DNA, the quality and yield varied among the different treatments. This was expected, as the outer layer structures of the tested pathogens are very different. Gram-positive bacteria such as *S. aureus* have a thick homogeneous cell wall (20–40 nm) containing a wide peptidoglycan layer [28,29]. The cell wall of Gram-negative bacteria such as *E. coli* is much thinner (15 nm) and composed of an inner membrane, a thin peptidoglycan monolayer and an outer membrane [28–30]. The oocyst wall of *C. parvum* is very rigid. It is 40 nm thick and contains an inner filamentous and an outer glycoprotein layer [31]. When PK was used separately or in combination, the amount of extracted DNA increased, especially for *E. coli* and *C. parvum*, as the PK eliminates interfering proteins in the solution and protects free DNA by inactivating DNases [32]. Moreover, the protease degrades the filamentous layer of the oocyst wall resulting in an increase in extraction efficiency for *C. parvum* [31]. For *S. aureus*, PK was likely not adequate to disrupt the thick cell wall of the Gram-positive bacterium. An additional BB step proved to be essential for the extraction of DNA from *S. aureus*. These results are in accordance with data obtained from previous studies [33–35]. Modification of the BB method improved the extraction efficiency for *E. coli*. This emphasizes that bead size, BB duration and BB device can influence the DNA yield and need to be adjusted to the specific pathogen. Likewise, Proctor et al. have previously made the same observation [36]. With the use of the reverse purification principle, the cleared lysate still contains certain organic and inorganic compounds, which can influence measurements by real-time PCR [37], which is why an applicability testing of reverse purification-based methods is advised before implementation in the subsequent workflow. A previous study by Hansen et al. reported a significant inhibitory effect when using the SwiftX DNA kit for direct DNA extraction from fecal samples [38]. Thus, our observation that there was no difference in the performance of DNA extraction from PBS and wastewater, respectively, was somewhat surprising. This may be explained by the significantly lower concentration of fecal matter in wastewater compared to actual fecal samples. In our case, the lysate after DNA extraction was clear and colorless. However, direct extraction of DNA from solid fecal samples may not be successful as substances such as bilirubin, which gives the brownish fecal coloration and can interfere with the real-time PCR, might only be insufficiently removed [39].

The developed method comprises several advantages. First, DNA can be extracted very rapidly with a maximum working time of 35 min. Second, the procedure involves no more than four steps and is therefore easy to learn and to implement. Third, it requires only two basic electrical devices: a heating block and a small Vortexer. Both can be operated as part of a mobile suitcase lab under field conditions [40]. Fourth, the reagents are heat stable and do not require refrigeration or freezer storage, which again improves field applicability. In contrast, the spin column reference method requires an expensive tissue homogenizer, a high-speed centrifuge and more handling time.

Down to one bacterial cell per reaction was detected for *S. aureus*, ten bacterial cells for *E. coli* and two oocysts for *C. parvum*, which was similar to the spin column reference

method. Establishing a highly sensitive extraction and detection procedure is crucial, especially in the case of water testing, where pathogen concentrations might be low [41,42]. Rainfall and runoff, as well as regional and seasonal differences, can cause huge variations in the pathogen's quantity and may result in a drastic dilution effect of the wastewater [43]. Despite the efficacy of the method established in this study, a concentration step (e.g., ultrafiltration) might be needed in a future application to avoid false negative results. Additionally, this would provide the capability to study larger volumes of wastewater. In the experiments performed to determine the best pre-treatment options, the SwiftX protocols resulted in an up to 10-fold increase of recovered DNA compared to the spin column reference method. The differences can be explained by the loss of DNA due to the number of working steps and the need for a high-speed centrifuge in the reference method. In the case of the reverse purification method, fewer working and sample transfer steps are required, which results in less stress and loss of DNA molecules.

Despite the many advantages of the reverse purification methods, their compatibility with the sample type of interest must be examined to avoid any potential inhibitors impairing the downstream applications. The method was successfully implemented for nucleic acid extraction from skin [44], feces [38], urine [45], cervicovaginal lavage [46] and blood [40], but in combination with isothermal amplification methods, which are known to resist several common inhibitors of real-time PCR chemistries [47]. Sample purity and the concentration of nucleic acids are usually measured by Nanodrop or Qubit. In our experiment, no correlation was found between the results of these measurements and the detectability in the molecular assays. Even though nucleic acid concentrations could be measured by Nanodrop, the dynamic ranges and the ratios of wavelengths indicate that they are due to background noise. Quantification of DNA concentration by Nanodrop is based on UV absorption measurement at a DNA-specific wavelength, while the Qubit instrument conducts a fluorescence-based measurement of a DNA-bound dye. Li and Wu et al. found that the UV absorption method and the fluorescence method can be affected by the presence of organic and chemical contaminants [48]. Since in the reverse purification both remnants of cells and lysis buffer components remain as background, the measurements of DNA concentrations by Nanodrop and Qubit have likely been influenced. Consequently, the use of DNA concentration measurement in combination with the established extraction method is not recommended. Overall, our findings suggest that the rapid extraction methods formulated in this study are field-applicable and need further controlled trials to confirm. Moreover, the effectiveness of the extraction of nucleic acids also needs to be determined in the detection of antimicrobial resistance genes and viruses, as these are important contributors to the health risks imposed by wastewater.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11030813/s1>, S1: Standard operation protocols for separated pre-treatment options; S2: Best performing extraction protocols; S3: Comparison of quantification cycle and nucleic acid concentration.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.S., A.W., A.A.E.W. and U.T.; methodology, S.S., A.W., A.A.E.W. and U.T.; software, S.S. and M.A.A.K.; validation, S.S., A.W. and A.A.E.W.; formal analysis, S.S., A.W. and M.A.A.K.; investigation, S.S.; resources, A.W., P.L., E.E., K.S., A.D., A.A.E.W. and U.T.; data curation, S.S.; writing—original draft preparation, S.S., R.K. and A.A.E.W.; writing—review and editing, R.K., A.W., M.A.A.K., K.S., A.A.E.W. and U.T.; visualization, S.S.; supervision, A.W., A.A.E.W. and U.T.; project administration, U.T.; funding acquisition, A.W., A.A.E.W. and U.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partly supported by the BMBF-funded projects “IFZO Fragmented Transformations—Sustainability in the Baltic Sea region: The ecosystem Baltic Sea as nucleus of a regional integrating sustainability transformation? Antibiotics and resistant germs in the Baltic Sea” (K.S. and P.L.), “Disarming pathogens as a different strategy to fight antimicrobial-resistant Gram-negatives” (K.S.) and “Holistic system for the rapid establishment of an antibiogram for nosocomial infections” (K.S.).

**Data Availability Statement:** All data and standard operation procedures are provided in the manuscript or the Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors thank Dana Ruster and Evelin Brumme for the expert technical support.

**Conflicts of Interest:** All authors declare no conflict of interest except Dr. Andy Wende, who is the founder of Xpedite Diagnostics GmbH and has commercial interest in the SwiftX technology. This does not alter the author's adherence to all good scientific practices, as well as scientific policies on data and materials sharing.

## References

- Li, J.; Zhu, Y.; Wu, X.; Hoffmann, M.R. Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens in Ambient Waters at the Point of Sample Collection: A Brief Review. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, S84–S90. [CrossRef] [PubMed]
- Hendriksen, R.S.; Munk, P.; Njage, P.; van Bunnik, B.; McNally, L.; Lukjancenko, O.; Röder, T.; Nieuwenhuijse, D.; Pedersen, S.K.; Kjeldgaard, J.; et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1124. [CrossRef]
- Hovi, T.; Shulman, L.M.; van der Avoort, H.; Deshpande, J.; Roivainen, M.; EM, D.E.G. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 1–13. [CrossRef]
- Medema, G.; Heijnen, L.; Elsinga, G.; Italiaander, R.; Brouwer, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2020**, *7*, 511–516. [CrossRef]
- Dufour, A. *Animal Waste, Water Quality and Human Health*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012; p. 488.
- Berendes, D.M.; Yang, P.J.; Lai, A.; Hu, D.; Brown, J. Estimation of global recoverable human and animal faecal biomass. *Nat. Sustain.* **2018**, *1*, 679–685. [CrossRef]
- Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water and other nonrecreational water—United States, 2009–2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **2013**, *62*, 714–720.
- Rhoden, K.; Alonso, J.; Carmona, M.; Pham, M.; Barnes, A.N. Twenty years of waterborne and related disease reports in Florida, USA. *One Health* **2021**, *13*, 100294. [CrossRef] [PubMed]
- Jenkins, M.; Ahmed, S.; Barnes, A.N. A systematic review of waterborne and water-related disease in animal populations of Florida from 1999–2019. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0255025. [CrossRef]
- Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G., Jr. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 603–661. [CrossRef]
- Haag, A.F.; Fitzgerald, J.R.; Penadés, J.R. Staphylococcus aureus in Animals. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [CrossRef]
- Bélangier, L.; Garenau, A.; Harel, J.; Boulianne, M.; Nadeau, E.; Dozois, C.M. Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2011**, *62*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
- Xiao, L.; Feng, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2008**, *52*, 309–323. [CrossRef] [PubMed]
- Robertson, L.J.; Björkman, C.; Axén, C.; Fayer, R. Cryptosporidiosis in Farmed Animals. *Cryptosporidium Parasite Dis.* **2013**, *149*–235. [CrossRef]
- Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organization for Animal Health; World Health Organization. *Technical Brief on Water, Sanitation, Hygiene and Wastewater Management to Prevent Infections and Reduce the Spread of Antimicrobial Resistance*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy; World Organisation for Animal Health: Paris, France; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020.
- European Union. Directive (EU) 98/83/EC of the European Parliament and of the Council of 3 November 1998 on the Quality of Water Intended for Human Consumption. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A31998L0083> (accessed on 3 January 2023).
- Ontario Ministry of the Environment and Climate Change, Laboratory Services Branch. Protocol for the Sampling and Analysis of Industrial/Municipal Wastewater of the 01 January 2016. Available online: [https://files.ontario.ca/protocol\\_for\\_the\\_sampling\\_and\\_analysis\\_of\\_industrial\\_municipal\\_wastewater.pdf](https://files.ontario.ca/protocol_for_the_sampling_and_analysis_of_industrial_municipal_wastewater.pdf) (accessed on 3 January 2023).
- Federal Government, U.S. Code of Federal Regulations of 1 July 2021. Title 40; Part 136—Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants. Available online: <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-D/part-136> (accessed on 3 January 2023).
- Valledor, S.; Valledor, I.; Gil-Rodríguez, M.C.; Seral, C.; Castillo, J. Comparison of several Real-Time PCR Kits versus a Culture-dependent Algorithm to Identify Enteropathogens in Stool Samples. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4301. [CrossRef] [PubMed]
- Call, D.R.; Brockman, F.J.; Chandler, D.P. Detecting and genotyping Escherichia coli O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *67*, 71–80. [CrossRef] [PubMed]
- Mumy, K.L.; Findlay, R.H. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *57*, 259–268. [CrossRef]
- Knudsen, B.E.; Bergmark, L.; Munk, P.; Lukjancenko, O.; Priemé, A.; Aarestrup, F.M.; Pamp, S.J. Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *mSystems* **2016**, *1*, e00095-16. [CrossRef]

23. Luciani, L.; Inchauste, L.; Ferraris, O.; Charrel, R.; Nougairède, A.; Piorkowski, G.; Peyrefitte, C.; Bertagnoli, S.; de Lamballerie, X.; Priet, S. A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1798. [[CrossRef](#)]
24. Tillman, G.E.; Simmons, M.; Wasilenko, J.L.; Narang, N.; Cray, W.C., Jr.; Bodeis-Jones, S.; Martin, G.; Gaines, S.; Seal, B.S. Development of a real-time PCR for *Escherichia coli* based on *gadE*, an acid response regulatory gene. *Let. Appl. Microbiol.* **2015**, *60*, 196–202. [[CrossRef](#)]
25. Dresely, I.; Dausgschies, A.; Lendner, M. Establishment of a germ carrier assay to assess disinfectant efficacy against oocysts of coccidian parasites. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 273–281. [[CrossRef](#)]
26. Wilrich, C.; Wilrich, P.T. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J. AOAC Int.* **2009**, *92*, 1763–1772. [[CrossRef](#)]
27. Klein, M.; Brown, L.; van den Akker, B.; Peters, G.M.; Stuetz, R.M.; Roser, D.J. Monitoring bacterial indicators and pathogens in cattle feedlot waste by real-time PCR. *Water Res.* **2010**, *44*, 1381–1388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Giesbrecht, P.; Kersten, T.; Maidhof, H.; Wecke, J. Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1371–1414. [[CrossRef](#)]
29. Salton, M.R.J.K.K. Chapter 2: Structure. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch: Galveston, TX, USA, 1996; Volume 4.
30. Matula, K.; Richter, L.; Janczuk-Richter, M.; Nogala, W.; Grzeszkowiak, M.; Peplińska, B.; Jurga, S.; Wyroba, E.; Suski, S.; Bilski, H.; et al. Phenotypic plasticity of *Escherichia coli* upon exposure to physical stress induced by ZnO nanorods. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8575. [[CrossRef](#)]
31. Harris, J.R.; Petry, F. *Cryptosporidium parvum*: Structural components of the oocyst wall. *J. Parasitol.* **1999**, *85*, 839–849. [[CrossRef](#)]
32. Gautham, A. *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*, 1st ed.; Springer International Publishing; Imprintin Springer: Cham, Switzerland, 2022; p. 48.
33. Halstead, F.D.; Lee, A.V.; Couto-Parada, X.; Polley, S.D.; Ling, C.; Jenkins, C.; Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Gray, J.J.; Iturriza-Gómara, M.; et al. Universal extraction method for gastrointestinal pathogens. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 1535–1539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, F.; Zhang, T. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 4607–4616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mary, C.; Chapey, E.; Dutoit, E.; Guyot, K.; Housseine, L.; Jeddi, F.; Menotti, J.; Paraud, C.; Pomares, C.; Rabodonirina, M.; et al. Multi-centric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium* spp. and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2556–2563. [[CrossRef](#)]
36. Proctor, C.; Soldat, S.M.; Easparro, B.; Nash, R.; Atwood, J. Evaluating the impact of bead media diameter and material composition on bacterial cell lysis and genomic DNA extraction. *Fed. American Soc. Exp. Biol.* **2019**, *33*, 648.6. [[CrossRef](#)]
37. Wilson, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3741–3751. [[CrossRef](#)]
38. Hansen, S.; Roller, M.; Alslim, L.M.A.; Böhlken-Fascher, S.; Fechner, K.; Czerny, C.P.; Abd El Wahed, A. Development of Rapid Extraction Method of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA from Bovine Stool Samples. *Diagnostics* **2019**, *9*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Al-Soud, W.A.; Rådström, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 485–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mondal, D.; Ghosh, P.; Khan, M.A.; Hossain, F.; Böhlken-Fascher, S.; Matlashewski, G.; Kroeger, A.; Oliario, P.; Abd El Wahed, A. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hamilton, K.A.; Waso, M.; Reyneke, B.; Saeidi, N.; Levine, A.; Lalancette, C.; Besner, M.C.; Khan, W.; Ahmed, W. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wastewater and Surface Water Environments. *J. Environ. Qual.* **2018**, *47*, 1006–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sidhu, J.P.; Toze, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 187–201. [[CrossRef](#)]
43. Lipp, E.K.; Kurz, R.; Vincent, R.; Rodriguez-Palacios, C.; Farrah, S.R.; Rose, J.B. The Effects of Seasonal Variability and Weather on Microbial Fecal Pollution and Enteric Pathogens in a Subtropical Estuary. *Estuaries* **2001**, *24*, 266–276. [[CrossRef](#)]
44. Gunaratna, G.; Manamperi, A.; Böhlken-Fascher, S.; Wickremasinge, R.; Gunawardena, K.; Yapa, B.; Pathirana, N.; Pathirana, H.; de Silva, N.; Sooriyaarachchi, M.; et al. Evaluation of rapid extraction and isothermal amplification techniques for the detection of *Leishmania donovani* DNA from skin lesions of suspected cases at the point of need in Sri Lanka. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 665. [[CrossRef](#)]
45. Frimpong, M.; Kyei-Tuffuor, L.; Fondjo, L.A.; Ahor, H.S.; Adjei-Kusi, P.; Maiga-Ascofare, O.; Phillips, R.O. Evaluation of a real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Schistosoma haematobium* infection in resource-limited setting. *Acta Trop.* **2021**, *216*, 105847. [[CrossRef](#)]
46. Archer, J.; Patwary, F.K.; Sturt, A.S.; Webb, E.L.; Phiri, C.R.; Mweene, T.; Hayes, R.J.; Ayles, H.; Brienen, E.A.T.; van Lieshout, L.; et al. Validation of the isothermal *Schistosoma haematobium* Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay, coupled with simplified sample preparation, for diagnosing female genital schistosomiasis using cervicovaginal lavage and vaginal self-swab samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, e0010276. [[CrossRef](#)]

47. El Wahed, A.A.; Patel, P.; Maier, M.; Pietsch, C.; Rüster, D.; Böhlken-Fascher, S.; Kissenkötter, J.; Behrmann, O.; Frimpong, M.; Diagne, M.M.; et al. Suitcase Lab for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 2627–2634. [[CrossRef](#)]
48. Li, X.; Wu, Y.; Zhang, L.; Cao, Y.; Li, Y.; Li, J.; Zhu, L.; Wu, G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal. Biochem.* **2014**, *451*, 18–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 4. Diskussion und Schlussfolgerung

Abwassermonitoring ist ein wichtiges Werkzeug zum Erhalt der Gesundheit von Tier, Mensch und Umwelt und gewinnt bei verschiedensten Problemstellungen immer mehr an Bedeutung (DUFOUR 2012). Auch einige Vertreter bekannter Zoonosen sind im Abwasser auffindbar, welche aufgrund unterschiedlicher Übertragungswege und eines breiten Wirtsspektrums im Abwasser eine besondere Relevanz für eine potenzielle Gesundheitsgefährdung besitzen (WHO 2004). Durch eine regelmäßige mikrobiologische Abwasserüberwachung können diese Pathogene detektiert werden, bevor sie von Klärwerken in öffentliche Gewässer geleitet werden und den Wasserkreislauf kontaminieren. Abwassermonitoring kann zudem als Frühwarnsystem für Resistenzentwicklungen, neue Erregervarianten oder epidemiologische Zusammenhänge bestimmter Pathogene in tierischen oder humanen Populationen eingesetzt werden (MAO et al. 2020, MEDEMA et al. 2020, KRISTIANSSON et al. 2011, QIU et al. 2016).

In dieser Studie wurde eine Extraktionsmethode für DNA aus Abwasser entwickelt, mit welcher Pathogene mittels real-time PCR im Abwasser weltweit schnell und zuverlässig identifiziert werden können. Auf Grundlage einer enzymatischen und mechanischen Zell-Lyse, kombiniert mit einer *Reverse Purification* wurden pro Reaktion in experimentell kontaminiertem Abwasser bis zu einer Zelle des grampositiven Bakteriums *S. aureus*, zehn Zellen des gramnegativen Bakteriums *E. coli* und zwei Oozysten des Parasiten *C. parvum* extrahiert und detektiert.

Routinemäßige diagnostische Testverfahren sind in vielen Ländern durch Defizite in der Infrastruktur, der Strom- und Wasserversorgung oder durch Fachkräftemangel stark limitiert und daher nicht flächendeckend einsetzbar (URDEA et al. 2006). In diesen Fällen ist es wichtig, Abwassermonitoring auch mobil zu ermöglichen. Dezentralisierte Detektionsverfahren sind durch den reduzierten Transport-, Material- und Personalaufwand weniger zeit- und kostenintensiv und garantieren dennoch eine zuverlässige Detektion positiver Fälle (SANBORN 1982). Die große Zeitersparnis trägt dazu bei, eine Veränderung mikrobiologischer Parameter rechtzeitig zu detektieren und durch entsprechende Maßnahmen zu intervenieren (PRICE 2001). Die Abhängigkeit zwischen der Qualität der Proben und den äußeren Einflüssen bei der Sammlung wird bei zentralisierten Diagnostikabläufen zudem häufig unterschätzt

(VAUGHT und HENDERSON 2011). Sowohl die damit einhergehende ungekühlte Lagerung der Proben länger als 24 Stunden als auch wiederholtes Einfrieren und Auftauen verursacht eine Verminderung des nachweisbaren Nukleinsäuren-Gehaltes (HUANG et al. 2017, CARDONA et al. 2012). Daher kann besonders eine Reduktion von Lagerungs- und Transportzeit bei der mobilen Abwasseruntersuchung die Detektion der Pathogene positiv beeinflussen. Damit ein Diagnostikverfahren weltweit und am „Point-of-Need“ (PON) einsetzbar ist, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Die Methode muss kosten- und zeiteffizient sowie mobil und unabhängig von Kühlketten und komplexen Laborgeräten einsetzbar sein. Noch dazu sollte das Verfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (DRAIN et al. 2014). Vor allem die Kompetenz des Personals vor Ort beeinflusst in diesen Fällen die Ergebnisse, weshalb eine adäquate Schulung unerlässlich ist (PRICE 2001). Auf Grundlage dessen sollte das Protokoll zudem einfach umsetzbar und auch die Ergebnisanalyse einfach sein (DRAIN et al. 2014).

Die im Rahmen der Dissertation eingesetzte real-time PCR bietet als DNA-basiertes Detektionsverfahren für die Bestimmung von Pathogenen im Abwasser dahingehend einige Vorzüge. Der größte Vorteil gegenüber der konventionellen Zellanzucht ist in Hinblick auf ein PON-Diagnostikverfahren die Schnelligkeit. Die Anzucht der Zellkulturen beinhaltet eine mehrstündige Inkubation (zum Beispiel: 18-24 h für *E. coli*), wohingegen die real-time PCR in vielen Fällen in weniger als zwei Stunden durchführbar ist (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 2014). Das molekulare Detektionsverfahren erfüllt zudem die Anforderungen an eine adäquate Spezifität und Sensitivität (KLEIN et al. 2010, CALL et al. 2001). Ein zusätzlicher Nutzen der real-time PCR ist die Laborunabhängigkeit. Durch gezielte Weiterentwicklungen existieren transportable Geräte, welche eine Identifikation der Nukleinsäuren innerhalb kürzester Zeit ermöglichen (KOMATSU et al. 2022). Dabei ist allerdings zu beachten, dass mittels real-time PCR keine Differenzierung zwischen intakten, infektiösen Mikroorganismen und freier DNA erfolgt (JOSEPHSON et al. 1993). Durch die Vorbehandlung mit spezifischen Enzymen oder Farbstoffen kann die freie DNA im Abwasser jedoch eliminiert oder gebunden werden, wodurch die nachfolgende durchgeführte real-time PCR lediglich DNA aus intakten Pathogenen amplifiziert und detektiert (LI et al. 2014a, RAUSCH et al. 2023). Des Weiteren ist die Bestimmung von antimikrobiellen Resistenzgenen, Pathogenitätsprofilen, Mutationsentwicklungen und evolutionären Ursprüngen mittels real-time PCR limitiert,

wodurch für diese Fragestellungen ein Next-Generation-Sequencing in Betracht gezogen werden sollte (DALLMAN et al. 2015, DIAMOND et al. 2022, ZHAO et al. 2016).

Die Grundvoraussetzung für eine Detektion von Pathogenen im Abwasser mittels DNA-basierten Detektionsverfahren ist eine vorausgehende Nukleinsäuren-Extraktion. Es ist dabei elementar eine geeignete Extraktionsmethode zu wählen, da diese den Gehalt der in der real-time PCR detektierbaren DNA beeinflusst (KNUDSEN et al. 2016). Für die Extraktion von Nukleinsäuren werden viele unterschiedliche kommerzielle Extraktions-Kits eingesetzt, welche in ihren Mechanismen stark variieren (Tabelle 3). Sie unterscheiden sich nicht nur in dem Umfang ihrer Arbeitsschritte, sondern auch in Hinblick auf die Laboranforderungen sowie den Zeit- und Kostenaufwand. Die meisten Extraktions-Kits entsprechen dabei nicht den oben genannten Anforderungen an eine Erregerdetektion im Bereich PON. Die Extraktionen beanspruchen in vielen Fällen mehrere Stunden, sind kostenintensiv, erfordern eine Kühlung der Reagenzien beziehungsweise den Einsatz komplexer elektrischer Laborgeräte, wie beispielsweise einer Zentrifuge (KNUDSEN et al. 2016).

**Tabelle 3:** Exemplarische Darstellung variierender Charaktereigenschaften von etablierten, kommerziellen Extraktions-Kits in Hinblick auf Extraktionsmethode, Dauer, Kosten, Kühlung und den obligaten Einsatz elektrischer Geräte basierend auf KNUDSEN et al. (2016) sowie den entsprechenden Handbüchern (QIAGEN INC. 2020b, ANALYTIK JENA GMBH 2021, INVITROGEN, INC. 2012, MP BIOMEDICALS INC. 2021, MO BIO LABORATORIES, INC. 2014).

<b>Extraktions-Kit</b>	<b>Extraktions- methode</b>	<b>Dauer (h) á 20 Proben</b>	<b>Kosten pro Reaktion (€)</b>	<b>Kühlung</b>	<b>elektrische Geräte</b>
InnuPure C16 (Analytic Jena AG)	<i>Magnetic Beads</i>	4	7.3	nein	Nukleinsäure- Extraktionsgerät
Easy-DNA gDNA purification kit (Invitrogen)	Phenol- Chloroform	8.8	4.5	ja	Zentrifuge, Heizblock
MP FastDNA Spin kit (MP Biomedicals)	Silica- Membran	5	14.1	nein	Zentrifuge, FastPrep- Instrument
PowerSoil DNA isolation kit (MoBio)	Silica- Membran	5.3	5.5	ja	Zentrifuge
QIAamp Fast DNA stool minikit (Qiagen)	Silica- Membran	2.6	6.2	nein	Zentrifuge, Heizblock

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Nukleinsäuren-Extraktionsverfahren angewendet, welches durch einen schnellen, einfachen und laborunabhängigen Arbeitsablauf in Kombination mit der real-time PCR eine Detektion von Pathogenen im Abwasser vor Ort ermöglichen soll. Das Grundprinzip des eingesetzten Extraktions-Kits beinhaltet dabei eine *Reverse Purification*. Das Protokoll ist aufgrund der Abstinenz von Waschschritten und komplexen elektrischen Geräten schnell, unkompliziert und mobil einsetzbar (XPEDITE DIAGNOSTICS INC. 2021). So wurde das angewendete Verfahren der *Reverse Purification* beispielsweise zur mobilen Detektion von *Leishmania donovani* in Blutproben oder dem Ebola-Virus in Serum- und Tupferproben unter der Verwendung eines Kofferlabors erfolgreich eingesetzt (MONDAL et al. 2016, FAYE et al. 2015).

Die Effizienz der Zell-Lyse wird maßgeblich durch die Pathogen-spezifische Struktur der Zellhüllen beeinflusst. Um eine universell anwendbare Extraktion für verschiedene Pathogene im Abwasser zu garantieren, wurden daher *S. aureus*, *E. coli* und *C. parvum* als Vertreter unterschiedlicher Zellwandstrukturen eingesetzt. Das grampositive Bakterium *S. aureus* besitzt durch seine prominente

Peptidoglykanschicht eine sehr robuste und breite Zellwand, wodurch ein starker Zellaufschluss unerlässlich ist (GIESBRECHT et al. 1998). Die *C. parvum*-DNA wird von einer breiten und widerstandsfähigen Oozystenwand eingeschlossen, welche eine starke Umweltstabilität des Parasiten garantiert (LENDNER und DAUGSCHIES 2014). Dementsprechend ist auch für dieses Pathogen ein effizienter Zellaufschluss elementar. Die dünne Zellhülle von gramnegativen Bakterien und damit auch von *E. coli* ist im Vergleich dazu labiler und ermöglicht eine unkompliziertere Zell-Lyse (MATUŁA et al. 2019). Allen drei zoonotischen Erregern wurde von der WHO ein hoher Stellenwert in der Abwasser-assoziierten Gefährdung der globalen Gesundheit zugesprochen. Die Organisation etablierte dahingehend Kriterien, nach welchen die Relevanz verschiedener Zoonoseerreger im Abwasser beurteilt werden kann. Zu den Voraussetzungen für eine Gefährdung zählen dabei die Evidenz eines zoonotischen Potenzials und einer wasserassoziierten Übertragung, die Frequenz, der Schweregrad und die geografische Verteilung der wasserassoziierten Infektionsausbrüche sowie die Resistenz gegenüber Abwasserbehandlungen. Sowohl *E. coli* als auch *C. parvum* wurden der Kategorie 1 zugeordnet und gelten demnach als höchst relevante Zoonoseerreger im Abwasser. Auch *S. aureus* besitzt aufgrund der Ausbildung von antimikrobiellen Resistenzen eine zoonotische Relevanz im Abwasser und wird der Kategorie 2 zugeteilt (DUFOR 2012). Weitere Erregergruppen, wie beispielsweise Viren können im Abwasser ebenfalls identifiziert werden und beeinflussen die Gesundheit von Tier, Mensch und Umwelt (WHO 2004). Daher ist es sinnvoll, das entwickelte Extraktionsverfahren zukünftig um weitere Erregerspezies zu erweitern.

Um die Effizienz der Nukleinsäuren-Extraktion adäquat beurteilen zu können, wurden die Pathogene vergleichend mit einer kommerziellen Silica-Säulen-basierten Referenzmethode extrahiert. Diese Methode wurde in vielen Studien erfolgreich bei der mikrobiellen Untersuchung von Abwasserproben eingesetzt (WALDEN et al. 2017, LI et al. 2018, VALEIX et al. 2020). Basierend auf vorherigen Studien wurde dem Protokoll der Referenzmethode für *S. aureus* in dieser Dissertation ein zusätzlicher *Bead Beating*-Schritt hinzugefügt, um die Ausbeute der extrahierten DNA zu steigern (GUO und ZHANG 2013). In Hinblick auf die Eigenschaften einer schnellen PON-Detektionsmethode besitzt das Referenzverfahren jedoch aufgrund einer langen Extraktionsdauer und einem obligaten Zentrifugationsschritt gravierende Defizite (QIAGEN INC. 2020a). Außerdem erreichte die Referenzmethode im Vergleich zu den in der Dissertation etablierten Extraktionsverfahren bis zu 10-fach niedrigere

Extraktionsmengen. Es kann vermutet werden, dass die Ursache dafür in einer übermäßigen Beanspruchung der lysierten und labilen Nukleinsäuren liegt, da in der *Reverse Purification* im Vergleich dazu weder Zentrifugations- noch Waschschrte eingesetzt werden (XPEDITE DIAGNOSTICS INC. 2021, QIAGEN INC. 2020a). Außerdem kann eine Übersättigung der Säulenmembran in Erwägung gezogen werden, da bei den Versuchen Erregerkonzentrationen von mindestens  $10^6$  Zellen pro Extraktion eingesetzt wurden und sich diese Konzentrationen im oberen Detektionslimit der Referenzmethode befinden (QIAGEN INC. 2020a).

Da die Grundvoraussetzung einer effektiven Extraktion der Nukleinsäuren eine effiziente vorausgehende Zell-Lyse darstellt, wurde das Grundverfahren der *Reverse Purification* in dieser Dissertation um ein mechanisches (*Bead Beating*), enzymatisches (Proteinase K) und chemisches Lyse-Verfahren (alkalische Inkubation bei 95 °C oder Raumtemperatur) ergänzt (ANON. 2023). Es zeigte sich eine starke Variation der Effektivität der DNA-Extraktion innerhalb der Lyse-Verfahren und Erregergruppen, was die variierende DNA-Ausbeute vorheriger Studien bei dem Einsatz verschiedener Extraktionsverfahren bestätigte (KNUDSEN et al. 2016). Die enzymatische Hitzeinkubation mit Proteinase K hatte einen gravierenden Effekt auf *E. coli* und *C. parvum* und erhöhte die Extraktionseffizienz im Vergleich zu der Referenzmethode um das Vier- bis Fünffache. Durch die enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K werden interferierende Proteine, DNasen und RNasen eliminiert, welche die Detektion und Stabilität der extrahierten Nukleinsäuren negativ beeinflussen würden (GAUTAM 2022). Zudem infiltriert und destabilisiert das Enzym die filamentöse Schicht der Oozystenwand von *C. parvum* und generiert so einen effizienteren Zellaufschluss mittels Lyse-Puffer und Hitzeinkubation (HARRIS und PETRY 1999). Für *S. aureus* erwies sich die Zell-Lyse mit einer alleinigen enzymatischen Vorbehandlung aufgrund der robusten Zellwand des grampositiven Bakteriums als unzureichend (25-fache Reduktion der Extraktionseffizienz im Vergleich zu der Referenzmethode).

Eine alkalische Behandlung der Pathogene erzielte in Kombination mit einer Hitzeinkubation im Falle von *E. coli* und *C. parvum* ebenfalls eine erhöhte Extraktionseffizienz (fünffach erhöht). Dieser Einfluss wurde bereits in vorherigen Studien beobachtet und mit einer hitzebedingten Modifikation der Membranstruktur und einer daraus resultierenden erhöhten Vulnerabilität der Zellhülle gegenüber einem alkalischen Milieu begründet (MORONO et al. 2014). Um die Nukleinsäuren durch die

alkalische Inkubation nicht zu schädigen, betrug bei einem pH-Wert von 12,5 die maximale alkalische Inkubationszeit 15 Minuten. Im Fall von *S. aureus* evozierte die alkalische Lyse im Vergleich zu der Referenzmethode eine Reduktion der DNA-Ausbeute, was darauf hindeutet, dass eine chemische Vorbehandlung für grampositive Bakterien unzureichend ist.

Die mechanische Lyse hingegen erhöhte die Extraktionseffizienz für *S. aureus* um mehr als das Doppelte im Vergleich zu der Referenzmethode und zeigte daher analog zu Resultaten vorheriger Studien einen relevanten Einfluss auf die DNA-Extraktion von grampositiven Bakterien (HALSTEAD et al. 2013, GUO und ZHANG 2013). Im Gegensatz dazu verbesserte für *E. coli* und *C. parvum* ein ergänzender *Bead Beating*-Schritt die Extraktionsleistung gegenüber dem alleinigen Einsatz von Proteinase K nicht. Ursache hierfür könnte eine ausreichende Effizienz des enzymatischen Zellaufschlusses sein, wodurch die Menge extrahierter DNA durch eine zusätzliche mechanische Zell-Lyse nicht mehr gesteigert werden kann. Eine weitere Ursache ist die Variation der Extraktionseffizienz der mechanischen Zell-Lyse in Abhängigkeit von dem eingesetzten *Bead Beating*-Verfahren. Das Material, die Menge und die Größe der Kugeln haben nachweislich einen signifikanten Einfluss auf den Extraktionserfolg des mechanischen Zellaufschlusses (PROCTOR et al. 2019). Diese Vermutung bestätigte sich während der Versuche im Rahmen der Dissertation durch Steigerung der Extraktionsmengen von *S. aureus* und *E. coli* in Abhängigkeit von der Glaskugelgröße und dem *Bead Beating*-Verfahren.

Für die Erprobung des Extraktionsverfahrens in Kombination mit Abwasser wurden auf Grundlage der Vorversuche verschiedene Protokolle ausgewählt. Basierend auf dem Anspruch dieser Studie eine möglichst simple und schnelle Erregerdetektion zu ermöglichen, wurde für beide Bakterien ein äquivalentes Extraktionsprotokoll ausgewählt. Da sich *Bead Beating* als essenzieller Bestandteil bei der Lyse von grampositiven Zellen herausgestellt hat, beinhaltete das Protokoll für die Bakterien eine Hitzeinkubation mit Proteinase K und einen mechanischen Zellaufschluss. Durch die Adaptation der *Bead Beating*-Prozedur wurde die Ausbeute extrahierter DNA für die Mikroorganismen erhöht. Im Fall von *C. parvum* wurde eine alleinige Hitzeinkubation mit Proteinase K ausgewählt, da dieses Protokoll den Anspruch, eine simple und schnelle Detektionsmethode zu etablieren, am ehesten erfüllte.

Obwohl sich im Abwasser verschiedenste Inhibitoren befinden, welche die Detektion mittels real-time PCR beeinflussen und diese in der hier entwickelten

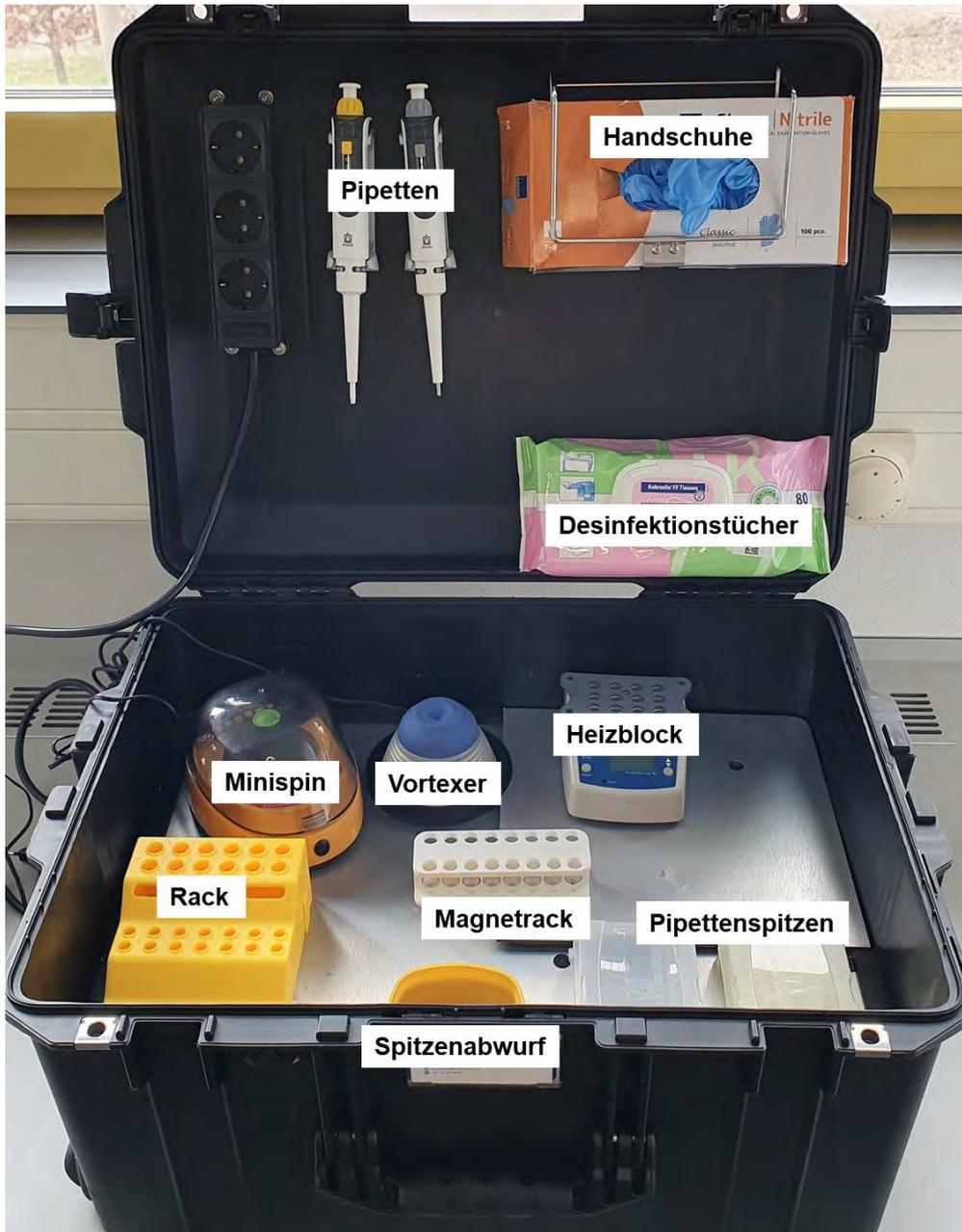
Extraktionsmethode nicht vollständig eliminiert wurden, konnte im Vergleich zu experimentell kontaminierter Phosphatgepufferter Salzlösung keine Abweichung der Extraktionseffizienz in Abwasser detektiert werden (WILSON 1997). Das in dieser Dissertation verwendete Grundprinzip der DNA-Extraktion wurde bereits für verschiedene Probenmaterialien wie Blut, Urin, Haut oder *zervikovaginaler Lavage* erfolgreich angewendet (GUNARATNA et al. 2018, FRIMPONG et al. 2021, MONDAL et al. 2016, ARCHER et al. 2022). Jedoch wurde das Protokoll dabei anstelle der real-time PCR mit einer isothermalen Amplifikationsmethode genutzt, welche eine höhere Resistenz gegenüber Inhibitoren aufweist (EL WAHED et al. 2021). Vorherige Studien erfassten bei der Untersuchung von Fäkalproben eine Beeinflussung der real-time PCR in Verbindung mit der *Reverse Purification*, die auf den Inhibitor Bilirubin zurückgeführt werden konnte (AL-SOUD und RÅDSTRÖM 2001, HANSEN et al. 2019). Es ist anzunehmen, dass die real-time PCR in dieser Studie aufgrund des hohen Verdünnungsgrades der Fäkalien im Abwasser nicht durch fäkale Inhibitoren beeinflusst wurde. Auch wenn bei der Messung des Nukleinsäuren-Gehaltes keine Beeinträchtigung der real-time PCR durch das Abwasser detektiert wurde, werden in der *Reverse Purification* chemische und organische Rückstände nicht vollständig eliminiert und verbleiben nach der Extraktion in dem zu untersuchenden Lysat (XPEDITE DIAGNOSTICS INC. 2021). Bei zukünftigen Experimenten ist eine Beeinflussung der molekularen Detektionsverfahren durch Kontaminanten bei Anwendung des entwickelten Extraktionsverfahrens zu prüfen und der Versuchsaufbau entsprechend zu adaptieren.

In einigen Studien wurden zur Evaluation von Extraktionsmethoden spektralphotometrische oder fluorometrische Verfahren zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wie beispielsweise Nanodrop™ (Spektralphotometer) und Qubit™ (Fluorometer) eingesetzt. Daher wurden diese Verfahren im Rahmen der Dissertation ebenfalls angewendet (AMOAH et al. 2019). Die Messung der Nukleinsäurekonzentration via Qubit™ basiert auf einer Bestimmung der Fluoreszenzintensität eines DNA-gebundenen Farbstoffes. Bei der Detektion der Nukleinsäuren mittels Nanodrop™ wird die Höhe der Absorption einer DNA-spezifischen Wellenlänge bestimmt (THERMOFISHER SCIENTIFIC INC. 2022). Für beide Messverfahren wurde im Rahmen der Versuche eine fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen und denen der real-time PCR festgestellt. Auf Grundlage vorheriger Studien ist davon auszugehen, dass die Analysemethoden durch

organische und chemische Kontaminanten beeinflusst wurden (LI et al. 2014b). Demnach lässt sich das Protokoll für eine Quantifizierung der Nukleinsäuren mittels Qubit™ oder Nanodrop™ nur bedingt einsetzen.

Unter Anwendung der Extraktionsmethode in einer Verdünnungsreihe mit experimentell kontaminiertem Abwasser wurden analog zu der Referenzmethode niedrige Erregerkonzentrationen (bis zu einer Bakterienzelle pro Reaktion für *S. aureus*, zehn Bakterienzellen für *E. coli* und zwei Oozysten von *C. parvum*) extrahiert und detektiert. Die hohe Sensitivität des Extraktionsverfahrens ist essenziell für eine adäquate Identifikation der Pathogene. Im Abwasser liegen nur sehr niedrige Erregerkonzentrationen vor, welche saisonal und regional variieren und von Veränderungen des Abwasservolumens und der Fließgeschwindigkeit beeinflusst werden (SIDHU und TOZE 2009, ZAHEDI et al. 2020). Eine geringe Erregerlast im Abwasser reicht jedoch aufgrund der niedrigen infektiösen Dosis vieler Zoonosen aus, um ein Gesundheitsrisiko für Tiere und den Menschen darzustellen (KEENE et al. 1994, DUPONT et al. 1995). Um die Sensitivität des Detektionsverfahrens noch weiter zu steigern, sollte zukünftig eine Kombination des Verfahrens mit einer Aufkonzentrierung der Abwasserproben (zum Beispiel durch Ultrafiltration) in Betracht gezogen werden.

Das evaluierte Nukleinsäuren-Extraktionsverfahren bietet für die Detektion von Zoonosen im Abwasser eine Vielzahl von Vorteilen. Das Protokoll ist mit maximal vier Arbeitsschritten in 35 Minuten gegenüber der Referenzmethode (7-9 Arbeitsschritte in 40-270 Minuten) schnell und einfach durchführbar und damit gut in bestehende Laborabläufe zu implementieren. Da lediglich ein Heizblock und im Falle der Bakterien zusätzlich ein Vortexer für das Verfahren genutzt werden, ist die Methode zudem laborunabhängig einsetzbar. Eine Möglichkeit der transportablen Anwendung bietet dabei das mobile Kofferlabor, worin die genannten Geräte Platz finden und welches durch die Kombination mit Generatoren oder Photovoltaikanlagen unabhängig von dem Stromnetzwerk nutzbar ist (Abbildung 6) (MONDAL et al. 2016). Im Vergleich dazu setzt die Referenzmethode den laborgebundenen Einsatz einer Zentrifuge voraus.



**Abbildung 6:** Bild eines exemplarischen Aufbaus des transportablen Kofferlabors für die mobile Anwendung der etablierten Methode zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Abwasser basierend auf MONDAL et al. (2016).

Ein weiterer Vorzug des etablierten Verfahrens ist die Temperaturstabilität. Alle eingesetzten Reagenzien sind bei Raumtemperaturen lagerungsfähig und können somit unabhängig von jeglichen Kühlketten eingesetzt werden, was den PON-Einsatz des Verfahrens unterstützt.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der Dissertation eine Extraktionsmethode für Nukleinsäuren entwickelt werden, welche in Kombination mit der real-time PCR eine Detektion von *S. aureus*, *E. coli* und *C. parvum* im Abwasser ermöglicht. Das Protokoll entspricht den genannten Anforderungen an ein global einsetzbares und unabhängiges PON-Verfahren, indem es eine hohe Benutzerfreundlichkeit, eine mobile Einsetzbarkeit, einen geringen Kosten- und Zeitaufwand sowie eine Kühlketten- und Laborunabhängigkeit bei adäquater Sensitivität und Spezifität garantiert. Ein regelmäßiges Abwassermonitoring ist essenziell, um Tier, Mensch und Umwelt zu schützen und gewinnt durch verschiedenste Problemstellungen weltweit immer mehr an Bedeutung. Die Anwendung, Etablierung und Weiterentwicklung adäquater mikrobiologischer Detektionsverfahren ist dabei elementar (FAO, WOA, WHO 2020). Mit der im Rahmen der Dissertation entwickelten Extraktionsmethode wurde das Repertoire der vorhandenen Nachweismethoden erweitert und der Fokus auf eine ressourcen-unabhängige Detektion von Zoonosen im Abwasser gelegt. Zukünftig ist es relevant, das entwickelte Verfahren mithilfe reeller Abwasserproben im Feld zu testen, das Protokoll gegebenenfalls an weitere Erregerspezies zu adaptieren und um einen Aufkonzentrierungsschritt zu erweitern. Des Weiteren sollte die Kombination mit Next-Generation-Sequencing in Erwägung gezogen werden, um das detektierbare Erregerspektrum zu vergrößern.

# 5. Zusammenfassung

Sarah Schurig

## **Entwicklung einer Methode zur Schnellextraktion von DNA aus Abwasserproben zur Analyse mittels real-time PCR**

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2023

55 Seiten, 6 Abbildungen, 3 Tabellen, 131 Referenzen, 1 Publikation, 4 Anhänge

Schlüsselwörter: Abwassermonitoring, Zoonosen, DNA-Extraktion, Point-of-Need-Diagnostik, abwasserbasierte Epidemiologie

### **Einleitung**

Im urbanen Abwasser findet sich eine Vielzahl pathogener Mikroorganismen, welche ein Risiko für Tier, Mensch und Umwelt darstellen. Um die Integration dieser und vieler weiterer Schadstoffe in den öffentlichen Wasserkreislauf zu verhindern, ist deren Eliminierung durch Klärwerke und die Überwachung dieser Abläufe von besonderer Relevanz. Obwohl die Präsenz mikrobiologischer Parameter dabei bisher lediglich akzessorisch betrachtet wird, sollten besonders Zoonosen im Abwasser aufgrund ihrer hohen Gesundheitsgefahr für Tiere und Menschen Beachtung in den vorgeschriebenen Kontrollen finden. Hierfür eignen sich besonders molekularbiologische Methoden, wie beispielsweise die zeiteffiziente real-time PCR, welche eine hohe Sensitivität und Spezifität garantiert. Eine Grundvoraussetzung für diesen DNA-basierten Pathogennachweis ist eine schnelle und effiziente Nukleinsäuren-Extraktion am Point-of-Need. Viele existierende Extraktionsverfahren werden diesem Anspruch jedoch aufgrund zeitintensiver und komplexer Protokolle nicht gerecht.

### **Ziel der Untersuchung**

Ziel dieser Studie war es, eine Extraktionsmethode für mikrobielle DNA aus Abwasser zu entwickeln, mit welcher Pathogene mittels molekularer Detektionsmethoden wie beispielsweise real-time PCR nachgewiesen werden können.

## Material und Methoden

Die Extraktion der DNA des grampositiven Bakteriums *S. aureus*, des gramnegativen Bakteriums *E. coli* und des Parasiten *C. parvum* basierte auf einer „Reverse Purification“. Um einen effizienten Zellaufschluss und DNA-Nachweis zu garantieren, wurde das Verfahren um a) mechanische (*Bead Beating*), b) chemische (alkalische Inkubation bei Raumtemperatur oder 95 °C) und/oder c) enzymatische (Proteinase K) Vorbehandlungen ergänzt. Das *Bead Beating*-Protokoll wurde anschließend durch die Variation der Kugelgrößen und den Einsatz von Vortexer oder Hulamixer anstelle eines komplexen *Bead Beaters* adaptiert. Mithilfe einer Verdünnungsreihe der Pathogene in experimentell kontaminiertem Abwasser wurde das Detektionslimit bestimmt und bei 95 %-iger Wahrscheinlichkeit durch das Wilrich&Wilrich Modell kalkuliert. Zusätzlich dazu wurden die Nukleinsäurekonzentrationen der einzelnen Protokolle mittels Nanodrop™ (Spektralphotometer) und Qubit™ (Fluorometer) gemessen. Die Resultate wurden denen einer Silica-Säulen-basierten Referenzmethode gegenübergestellt.

## Ergebnisse

Die effizienteste Methode zum Zellaufschluss der Bakterien steigerte die Extraktionseffizienz gegenüber der Referenzmethode um das Vierfache und beinhaltete eine Kombination aus *Bead Beating* (mit 0,1mm Glaskugeln und einem Vortexer) und Proteinase K bei 60°C für 10 Minuten. Im Fall von *C. parvum* erwies sich Proteinase K als effektivste Vorbehandlung (siebenfacher Anstieg der Extraktionsmenge). Basierend auf der etablierten Extraktionsmethode wurde bis zu 0,74 Zellen pro Reaktion von *S. aureus*, 9,94 Zellen von *E. coli* und 13,55 Oozysten von *C. parvum* in experimentell kontaminiertem Abwasser extrahiert und detektiert. Zwischen den detektierten Nukleinsäurekonzentrationen und den ermittelten Extraktionseffizienzen in der real-time PCR wurde keine Korrelation festgestellt.

## Schlussfolgerung

Zur Extraktion mikrobieller DNA aus Abwasser wurde eine Methode für grampositive Bakterien (*S. aureus*), gramnegative Bakterien (*E. coli*) und Protozoen (*C. parvum*) entwickelt, welche eine schnelle und sensitive Erregerdetektion mittels real-time PCR garantiert. Diese Vorteile ermöglichen ein mobil einsetzbares Abwassermonitoring am Point-of-Need.

## 6. Summary

Sarah Schurig

### **Development of a rapid extraction method to detect DNA in wastewater by real-time PCR**

Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in May 2023

55 pages, 6 figures, 3 tables, 131 references, 1 publication, 4 appendices

Keywords: wastewater monitoring, zoonoses, DNA extraction, point-of-need testing, wastewater-based epidemiology

#### **Introduction:**

Wastewater contains various pathogenic microorganisms, which represent a risk for animals, humans and the environment. The wastewater treatment plants play a crucial role in eliminating such threat to avoid their discharge into the environment. Nevertheless, microbiological parameters are not included in the current regulatory monitoring protocols, particularly, the zoonotic pathogens are of one health significance. There are different methods for identification of pathogens, e.g. culture or serological and molecular assays, such as real-time PCR, which has revolutionized diagnostics with higher sensitivity and specificity. However, effective pathogen identification using real-time PCR requires an efficient, and fast DNA extraction. Many available extraction methods do not fulfill these criteria, as the protocols are time-consuming and require complex laboratory equipment.

#### **Objective:**

The aim of the doctoral thesis was to develop a rapid extraction method for isolation of microbial DNA from wastewater to be used for downstream application, e.g. real-time PCR.

#### **Material and Methods:**

The gram-positive bacterium *S. aureus*, the gram-negative bacterium *E. coli* and the parasite *C. parvum* were included in this thesis to test the efficacy of the reverse purification protocol. To assure the lysis of cell wall or membrane and the release of a large quantities of DNA, the following pre-treatment procedures were tested: a)

mechanical (bead beating), b) chemical (alkaline incubation at room temperature or 95 °C), and/or c) enzymatic (heat incubation with proteinase K). The bead beating procedure was adjusted by screening different bead sizes and applying Vortexer or Hulamixer instead of a complex bead beater. To determine the limit of detection, a serial dilution of pathogens in spiked wastewater was tested. The 95 % probability was calculated using the Wilrich&Wilrich model. In addition, the nucleic acid yield was determined by both Nanodrop™ (Spectrophotometry) and Qubit™ (Fluorometry). All steps were compared with a silica column-based reference protocol.

### **Results:**

The most efficient pre-treatment for the bacteria was a combination of a bead beating step (with 0.1 mm glass beads and Vortexer) and proteinase K at 60 °C for 10 minutes. Up to four-fold increase of the released DNA was observed compared to the reference method. In the case of *C. parvum*, heat incubation with proteinase K proved to be the most effective pre-treatment (seven-fold increase in extraction amount). Based on the established extraction method, down to 0.74 cells per reaction for *S. aureus*, 9.94 cells for *E. coli* and 13.55 oocysts for *C. parvum* could be extracted and detected in spiked wastewater. No correlation could be found between the determined nucleic acid concentrations by various methods and the outcomes in real-time PCR.

### **Conclusions:**

For the extraction of microbial DNA from wastewater, a protocol was developed for gram-positive (*S. aureus*) and -negative bacteria (*E. coli*), as well as for protozoa (*C. parvum*). The procedure enables a rapid and sensitive pathogen detection by real-time PCR. The method ensures a field-applicable wastewater monitoring suitable for point-of-need testing.

## 7. Referenzen

Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):733–50. doi: 10.1586/14787210.6.5.733.

Ableitner O. Einführung in die Molekularbiologie: Basiswissen für das Arbeiten im Labor. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2014.

Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):485–93. doi: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001.

Amoah ID, Singh G, Troell K, Reddy P, Stenström TA, Bux F. Comparative assessment of DNA extraction procedures for *Ascaris* spp. eggs. *J Helminthol.* 2019;94:e78. doi: 10.1017/S0022149X19000683.

Analytik Jena GmbH. Bedienungsanleitung InnuPure C16 touch Extraktionssystem; 2021. Verfügbar unter: [https://www.analytik-jena.de/fileadmin/import/assets/0000006588\\_Manual\\_InnuPure\\_C16\\_touch\\_de.pdf](https://www.analytik-jena.de/fileadmin/import/assets/0000006588_Manual_InnuPure_C16_touch_de.pdf).

Anastasi EM, Matthews B, Stratton HM, Katouli M. Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(16):5536–41. doi: 10.1128/AEM.00657-12.

Anon. DNA Purification; 2023 [Stand: 2023 Feb 22]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>.

Archer J, Patwary FK, Sturt AS, Webb EL, Phiri CR, Mweene T et al. Validation of the isothermal *Schistosoma haematobium* Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay, coupled with simplified sample preparation, for diagnosing female genital schistosomiasis using cervicovaginal lavage and vaginal self-swab samples. *PLOS Negl Trop Dis.* 2022;16(3):e0010276. doi: 10.1371/journal.pntd.0010276.

Arnold TE, Meyering MT, Chesterson RS. Nucleic acid binding matrix. United States patent US 6869532 B2, CUNO Incorporated; 2005. Verfügbar unter: <https://patentimages.storage.googleapis.com/27/64/a8/bc32e0dc0c8ae5/US6869532.pdf>.

Aslan A, Cole Z, Bhattacharya A, Oyibo O. Presence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewater Treatment Plant Effluents Utilized as Water Reuse for Irrigation. *Water.* 2018;10(6):805. doi: 10.3390/w10060805.

Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(4):383–407. doi: 10.1007/s10911-011-9235-z.

Basavaraju M, Gunashree BS. *Escherichia coli* : An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli* [Working Title]: IntechOpen.; 2021.

Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;73(3):495–504. doi: 10.1007/s00253-006-0675-0.

Berg RD. *Escherichia Coli*, Infection and Immunity. In: *Encyclopedia of Immunology*: Elsevier; 1998. p. 842–5.

Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F, Cappelier J-M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res*. 2002;33(4):359–70. doi: 10.1051/vetres:2002022.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513–23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513.

Börjesson S, Matussek A, Melin S, Löfgren S, Lindgren PE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? *J Appl Microbiol*. 2010;108(4):1244–51. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04515.x.

Browne AJ, Chipeta MG, Haines-Woodhouse G, Kumaran EPA, Hamadani BHK, Zarea S et al. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000-18: a spatial modelling study. *Lancet Planet Health*. 2021;5(12):e893-e904. doi: 10.1016/S2542-5196(21)00280-1.

Buckingham L. *Molecular Diagnostics, 3e: Fundamentals, Methods, and Clinical Applications*. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2019.

Bundesinstitut für Risikobewertung. Aufbereitete Abwässer: Protozoen auf pflanzlichen Lebensmitteln vermeiden: Stellungnahme Nr. 021/2022 des BfR vom 27. Juli 2022; 2022. doi: 10.17590/20220727-111138

Call DR, Brockman FJ, Chandler DP. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol*. 2001;67(1-2):71–80. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00437-8.

Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 2012;12:158. doi: 10.1186/1471-2180-12-158.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38(4):818–62. doi: 10.1016/j.watres.2003.10.012.

Choffnes ER, Mack A. *Global issues in water, sanitation, and health: Workshop summary*. Washington, D.C: National Academies Press; 2009.

Code of Federal Regulations (annual edition); Title 40 - Protection of Environment; Chapter I - Environmental protection agency (continued); Subchapter D - water programs (continued); Part 136 - Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants; Section § 136.3 - Identification of test procedures.: 40 CFR § 136.3; 2021. Verfügbar unter: <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2021-title40-vol25/CFR-2021-title40-vol25-sec136-3/summary>

Colwell RR, Brayton P, Herrington D, Tall B, Huq A, Levine MM. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J Microbiol Biotechnol.* 1996;12(1):28–31. doi: 10.1007/BF00327795.

Concepción Porrero M, Harrison EM, Fernández-Garayzábal JF, Paterson GK, Díez-Guerrier A, Holmes MA et al. Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. *Environ Microbiol Rep.* 2014;6(6):705–8. doi: 10.1111/1758-2229.12191.

Dallman TJ, Byrne L, Launders N, Glen K, Grant KA, Jenkins C. The utility and public health implications of PCR and whole genome sequencing for the detection and investigation of an outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O26:H11. *Epidemiol Infect.* 2015;143(8):1672–80. doi: 10.1017/S0950268814002696.

Daughton CG. Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: Pharmaceuticals in the environment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001;12(10):1067–76. doi: 10.1016/S1044-0305(01)00287-2.

Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, Samson-Himmelstjerna G von et al. *Parasitologie für die Tiermedizin*. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag;2021.

Diamond MB, Keshaviah A, Bento AI, Conroy-Ben O, Driver EM, Ensor KB et al. Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses. *Nat Med.* 2022;28(10):1992–5. doi: 10.1038/s41591-022-01940-x.

Drain PK, Hyle EP, Noubary F, Freedberg KA, Wilson D, Bishai WR et al. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(3):239–49. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70250-0.

Dufour A. *Animal Waste, Water Quality and Human Health*. Geneva: World Health Organization; 2012.

DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 1995; 332(13):855–9. doi: 10.1056/NEJM199503303321304.

Effler E, Isaäcson M, Arntzen L, Heenan R, Canter P, Barrett T et al. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(5):812–9. doi: 10.3201/eid0705.017507.

El Wahed AA, Patel P, Maier M, Pietsch C, Rüter D, Böhlken-Fascher S et al. Suitcase Lab for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Anal Chem.* 2021;93(4):2627–34. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04779.

Esser K-H, Marx WH, Lisowsky T. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nat Methods.* 2006;3(1):i–ii. doi: 10.1038/nmeth845.

Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T et al. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(4):651–60. doi: 10.1093/jac/dkq004.

FAO, WOA, WHO. Technical brief on water, sanitation, hygiene and wastewater management to prevent infections and reduce the spread of antimicrobial resistance; 2020. Verfügbar unter: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/en-oie-tripartite20technical20briefing20amr-web.pdf>

FAO/WHO. Joint WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses [meeting held in Stockholm from 11 to 16 August 1958] : second report.; 1959. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40435>.

Faye O, Faye O, Soropogui B, Patel P, El Wahed AA, Loucoubar C et al. Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification Ebola virus detection assay in Guinea in 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(44). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.44.30053.

Feachem RG, Bradley DJ, Garelich H, D. Duncan M. Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management: World Bank Studies in water supply and sanitation; no. 3. *Water Res.* 1985;19(1):131. doi: 10.1016/0043-1354(85)90337-9.

Frimpong M, Kyei-Tuffuor L, Fondjo LA, Ahor HS, Adjei-Kusi P, Maiga-Ascofare O et al. Evaluation of a real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Schistosoma haematobium* infection in resource-limited setting. *Acta Trop.* 2021;216:105847. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105847.

Gautam A. DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts. 1st ed. 2022. Cham: Springer International Publishing; Imprint Springer; 2022.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1371–414. doi: 10.1128/MMBR.62.4.1371-1414.1998.

Guenther S, Grobbel M, Heidemanns K, Schlegel M, Ulrich RG, Ewers C et al. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci Total Environ.* 2010;408(17):3519–22. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.05.005.

Gunaratna G, Manamperi A, Böhlken-Fascher S, Wickremasinge R, Gunawardena K, Yapa B et al. Evaluation of rapid extraction and isothermal amplification techniques for the detection of *Leishmania donovani* DNA from skin lesions of suspected cases at the point of need in Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):665. doi: 10.1186/s13071-018-3238-1.

Guo F, Zhang T. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(10):4607–16. doi: 10.1007/s00253-012-4244-4.

Halstead FD, Lee AV, Couto-Parada X, Polley SD, Ling C, Jenkins C et al. Universal extraction method for gastrointestinal pathogens. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 10):1535–9. doi: 10.1099/jmm.0.058743-0.

Hansen S, Roller M, Alslim LMA, Böhlken-Fascher S, Fechner K, Czerny C-P et al. Development of Rapid Extraction Method of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA from Bovine Stool Samples. *Diagnostics*. 2019;9(2). doi: 10.3390/diagnostics9020036.

Harris JR, Petry F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *J Parasitol*. 1999;85(5):839–49.

Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit*. 2007;37(2):120–6. doi: 10.1002/biuz.200610332.

Hove R ten, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(10):1001–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01788.x.

Huang L-H, Lin P-H, Tsai K-W, Wang L-J, Huang Y-H, Kuo H-C et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184692. doi: 10.1371/journal.pone.0184692.

International Organization for Standardization. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria; 2014 2014. Verfügbar unter: <https://www.iso.org/standard/55832.html>.

Invitrogen, inc. User Guide: Easy-DNA™ Kit for genomic DNA isolation; 2012. Verfügbar unter: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Feasydna\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Feasydna_man.pdf).

Jenkins M, Ahmed S, Barnes AN. A systematic review of waterborne and water-related disease in animal populations of Florida from 1999-2019. *PLoS One*. 2021; 16(7):e0255025. doi: 10.1371/journal.pone.0255025.

Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(10):3513–5. doi: 10.1128/aem.59.10.3513-3515.1993.

Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Williams LP, Hedberg K, Oxman GL et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med.* 1994;331(9):579–84. doi: 10.1056/NEJM199409013310904.

Klein M, Brown L, van den Akker B, Peters GM, Stuetz RM, Roser DJ. Monitoring bacterial indicators and pathogens in cattle feedlot waste by real-time PCR. *Water Res.* 2010;44(5):1381–8. doi: 10.1016/j.watres.2009.11.016.

Knudsen BE, Bergmark L, Munk P, Lukjancenko O, Priemé A, Aarestrup FM et al. Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *mSystems.* 2016;1(5). doi: 10.1128/mSystems.00095-16.

Komatsu T, Komatsu M, Nakajima H, Uemoto Y. Ultra-rapid real-time polymerase chain reaction assay for genotyping of the NT5E gene in Japanese black beef using a mobile PCR device, PCR 1100. *Anim Sci J.* 2022;93(1):e13763. doi: 10.1111/asj.13763.

Kristiansson E, Fick J, Janzon A, Grabic R, Rutgersson C, Weijdegård B et al. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One.* 2011;6(2):e17038. doi: 10.1371/journal.pone.0017038.

Lappin MR, Blondeau J, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Lloyd DH et al. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *J Vet Intern Med.* 2017;31(2):279–94. doi: 10.1111/jvim.14627.

Leipziger Wasserwerke. FESTSCHRIFT ZUM JUBILÄUM: Seit 125 Jahren - Abwasser, das sich gewaschen hat; 2019. Verfügbar unter: [https://files.l.de/ldetyp03/Leipziger/Wasserwerke/Wissenswertes/L-1901121\\_LWW\\_Festschrift\\_KW-Rosental\\_einzelseiten.pdf](https://files.l.de/ldetyp03/Leipziger/Wasserwerke/Wissenswertes/L-1901121_LWW_Festschrift_KW-Rosental_einzelseiten.pdf).

Lendner M, Dauschies A. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology.* 2014;141(11):1511–32. doi: 10.1017/S0031182014000237.

Li A-D, Metch JW, Wang Y, Garner E, Zhang AN, Riquelme MV et al. Effects of sample preservation and DNA extraction on enumeration of antibiotic resistance genes in wastewater. *FEMS Microbiol Ecol.* 2018;94(2). doi: 10.1093/femsec/fix189.

Li D, Tong T, Zeng S, Lin Y, Wu S, He M. Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR). *J Environ Sci (China).* 2014a;26(2):299–306. doi: 10.1016/s1001-0742(13)60425-8.

Li J, Zhao X, Tian X, Li J, Sjollega J, Wang A. Retention in treated wastewater affects survival and deposition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in sand columns. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(6):2199–205. doi: 10.1128/AEM.03740-14.

Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J et al. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*. 2014b;451:18–24. doi: 10.1016/j.ab.2014.01.016.

Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. 1994;331(3):161–7. doi: 10.1056/NEJM199407213310304.

MacDonald PD, Hrsg. Solid phase extraction applications guide and bibliography: A resource for sample preparation methods development. 6. ed. Milford, Mass.: Waters; 1995.

Madigan MT, Clark DP, Martinko JM, Stahl DA. *Brock Mikrobiologie kompakt*. 13., aktualisierte Auflage. Hallbergmoos: Pearson; 2015.

Mao K, Zhang K, Du W, Ali W, Feng X, Zhang H. The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Curr Opin Environ Sci Health*. 2020;17:1–7. doi: 10.1016/j.coesh.2020.04.006.

Matuła K, Richter Ł, Janczuk-Richter M, Nogala W, Grzeszkowiak M, Peplińska B et al. Phenotypic plasticity of *Escherichia coli* upon exposure to physical stress induced by ZnO nanorods. *Sci Rep*. 2019;9(1):8575. doi: 10.1038/s41598-019-44727-w.

McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, Wilkes R, Hrsg. *Veterinary microbiology*. Fourth edition. Hoboken, NJ: Wiley; John Wiley & Sons Inc; 2022. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119650836>.

Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ Sci Technol Lett*. 2020;7(7):511–6. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357.

Messelhäußer U. Kultivierungsverfahren für Bakterien. In: Busch U, Hrsg. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 5–18.

Mo Bio Laboratories, Inc. PowerSoil® DNA Isolation Kit; 2014. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/se/resources/resourcedetail?id=5c00f8e4-c9f5-4544-94fa-653a5b2a6373&lang=en>.

Mondal D, Ghosh P, Khan MAA, Hossain F, Böhlken-Fascher S, Matlashewski G et al. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):281. doi: 10.1186/s13071-016-1572-8.

Morono Y, Terada T, Hoshino T, Inagaki F. Hot-alkaline DNA extraction method for deep-subseafloor archaeal communities. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(6):1985–94. doi: 10.1128/AEM.04150-13.

MP Biomedicals Inc. User Manual: FastDNA™ Spin Kit for Soil: Instruction Manual: Rapid isolation for PCR-ready genomic DNA from soil and other environmental samples; 2021. Verfügbar unter: [https://www.mpbio.com/media/document/file/manual/dest/f/a/s/t/\\_/Fast\\_DNA\\_Spin\\_Kit\\_REV\\_2-2016\\_abs.pdf](https://www.mpbio.com/media/document/file/manual/dest/f/a/s/t/_/Fast_DNA_Spin_Kit_REV_2-2016_abs.pdf).

Nasser AM. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. *J Water Health.* 2016;14(1):1–13. doi: 10.2166/wh.2015.131.

O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations: The Review on Antimicrobial Resistance; 2014.

Olin SJ, Bartges JW. Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015;45(4):721–46. doi: 10.1016/j.cvsm.2015.02.005.

Oliver JD, Dagher M, Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J Water Health.* 2005;3(3):249–57. doi: 10.2166/wh.2005.040.

Osadebe LU, Hanson B, Smith TC, Heimer R. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* in Connecticut swine and swine farmers. *Zoonoses Public Health.* 2013;60(3):234–43. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01527.x.

Pantosti A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front Microbiol.* 2012;3:127. doi: 10.3389/fmicb.2012.00127.

Papajová I, Šmigová J, Gregová G, Šoltys J, Venglovský J, Papaj J et al. Effect of Wastewater Treatment on Bacterial Community, Antibiotic-Resistant Bacteria and Endoparasites. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(5). doi: 10.3390/ijerph19052750.

Price CP. Point of care testing. *BMJ.* 2001;322(7297):1285–8. doi: 10.1136/bmj.322.7297.1285.

Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *MBio.* 2012;3(1). doi: 10.1128/mBio.00305-11.

Proctor C, Soldat SM, Easparro B, Nash R, Atwood J. Evaluating the impact of bead media diameter and material composition on bacterial cell lysis and genomic DNA extraction. *FASEB J.* 2019;33(S1). doi: 10.1096/fasebj.2019.33.1\_supplement.648.6.

Qiagen Inc. QIAGEN Inc. QIAasympy® DNA Handbook. Alameda, Calif, USA; 2010. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de/Resources/ResourceDetail?id=925d1108-083f-4974-a496-a06917abe48f&lang=en>.

Qiagen Inc. QIAGEN - DNeasy® Blood & Tissue Handbook: For purification of total DNA from animal blood, animal tissue, rodent tails, ear punches, cultured cells, fixed tissue, bacteria, insects; 2020a. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/us/Resources/ResourceDetail?id=1c03b02a-1ddd-4b59-94ec-c0608de2f708&lang=en>.

Qiagen Inc. QIAGEN - QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook: For fast purification of genomic DNA from stool samples; 2020b. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/us/Resources/ResourceDetail?id=2a3f2c0b-2e8a-49fd-b442-829108ae1a4a&lang=en>.

Qian X, Gu J, Sun W, Wang X-J, Su J-Q, Stedfeld R. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *J Hazard Mater.* 2018;344:716–22. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.11.020.

Qiu J, Zhao T, Liu Q, He J, He D, Wu G et al. Residual veterinary antibiotics in pig excreta after oral administration of sulfonamides. *Environ Geochem Health.* 2016; 38(2):549–56. doi: 10.1007/s10653-015-9740-x.

Raboni M, Gavasci R, Torretta V. Assessment of the Fate of Escherichia coli in Different Stages of Wastewater Treatment Plants. *Water Air Soil Pollut.* 2016;227(12). doi: 10.1007/s11270-016-3157-8#.

Rausch F, Tanneberger F, Abd El Wahed A, Truyen U. Validation of the efficacy of air purifiers using molecular techniques. *PLoS One.* 2023;18(1):e0280243. doi: 10.1371/journal.pone.0280243.

Rhoden K, Alonso J, Carmona M, Pham M, Barnes AN. Twenty years of waterborne and related disease reports in Florida, USA. *One Health.* 2021;13:100294. doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100294.

Richtlinie (EU) 2020/2184 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch; 2020a. Verfügbar unter: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/eur18700.pdf>

Sanborn WR. Development of portable rapid diagnostic microbiology systems for support of primary health care delivery. *Indian J Pediatr.* 1982;49(398):311–6. doi: 10.1007/BF02834412.

Schnitt A, Tenhagen B-A. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds: An Update. *Foodborne Pathog Dis.* 2020; 17(10):585–96. doi: 10.1089/fpd.2019.2638.

Scott L, McGee P, Sheridan JJ, Earley B, Leonard N. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J Food Prot.* 2006;69(1):6–11. doi: 10.4315/0362-028x-69.1.6.

Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015.

Sidhu JPS, Toze SG. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environ Int.* 2009;35(1):187–201. doi: 10.1016/j.envint.2008.07.006.

Singh RP, Kolok AS, Bartelt-Hunt SL, Hrsg. *Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges.* Singapore: Springer Singapore; 2019.

Song J, Kanazawa I, Sun K, Murata T, Yokoyama KK. Removal of ethidium bromide and cesium chloride from plasmid DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques.* 1999;26(6):1056–60. doi: 10.2144/99266bm11.

Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:1–10. doi: 10.1155/2009/574398.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1411):983–9. doi: 10.1098/rstb.2001.0888.

ThermoFisher Scientific Inc. Easy choices for RNA and DNA quantification; 2022. Verfügbar unter: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/rna-and-dna-quantification-brochure.pdf>.

Tolba O, Loughrey A, Goldsmith CE, Millar BC, Rooney PJ, Moore JE. Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river-, sea- and swimming pool water. *Int J Hyg Environ Health.* 2008;211(3-4):398–402. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.06.003.

United Nations. *Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development;* 2015 [Stand: 2022 Dez 6]. Verfügbar unter: <https://sdgs.un.org/publications/transforming-our-world-2030-agenda-sustainable-development-17981>.

Urdea M, Penny LA, Olmsted SS, Giovanni MY, Kaspar P, Shepherd A et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature.* 2006;444 Suppl 1:73–9. doi: 10.1038/nature05448.

Valeix N, Costa D, Basmacıyan L, Valot S, Vincent A, Razakandrainibe R et al. Multicenter Comparative Study of Six *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction Protocols Including Mechanical Pretreatment from Stool Samples. *Microorganisms.* 2020;8(9). doi: 10.3390/microorganisms8091450.

Valledor S, Valledor I, Gil-Rodríguez MC, Seral C, Castillo J. Comparison of several Real-Time PCR Kits versus a Culture-dependent Algorithm to Identify Enteropathogens in Stool Samples. *Sci Rep.* 2020;10(1):4301. doi: 10.1038/s41598-020-61202-z.

van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2235–7. doi: 10.3201/eid1012.040387.

Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC Sci Publ.* 2011;(163):23–42.

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit; 2002. Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=celex%3A32002R0178>

Verordnung (EG) Nr. 183/2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene; 2005. Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX%3A32005R0183>

Verordnung (EU) 2020/741 über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung; 2020b. Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX:32020R0741&from=DE>

Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung): AbwV; 2004. Verfügbar unter: <https://www.gesetze-im-internet.de/abwv/AbwV.pdf>

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch 1, (Trinkwasserverordnung): TrinkwV; 2001. Verfügbar unter: [https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv\\_2001/BJNR095910001.html](https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2001/BJNR095910001.html)

Walden C, Carbonero F, Zhang W. Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *J Microbiol Methods.* 2017;141:10–6. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.007.

WHO. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control; 2004. Emerging Issues in Water & Infectious Disease Series [Stand: 2022 Dez 9]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9241562730>.

WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non human use; 2018.

Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3741–51. doi: 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997.

Wink M, Hrsg. An introduction to molecular biotechnology: Fundamentals, methods and applications. Third, completely revised edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2021. Verfügbar unter: [https://hauptfach-wiley-kimhohenheim.ciando.com/shop/book/short/index.cfm?fuseaction=short&bok\\_id=2947733](https://hauptfach-wiley-kimhohenheim.ciando.com/shop/book/short/index.cfm?fuseaction=short&bok_id=2947733).

Xpedite Diagnostics Inc. Xpedite Diagnostics GmbH, SwiftX™ DNA Handbook, Munich, Germany; 2021. Verfügbar unter: [https://www.xpedite-dx.com/fileadmin/benutzerdaten/xpedite-dx-com/pdf/SXD/SwiftX\\_DNA\\_-\\_Handbook\\_-\\_V1.3.pdf](https://www.xpedite-dx.com/fileadmin/benutzerdaten/xpedite-dx-com/pdf/SXD/SwiftX_DNA_-_Handbook_-_V1.3.pdf).

Zahedi A, Ryan U, Rawlings V, Greay T, Hancock S, Bruce M et al. Cryptosporidium and Giardia in dam water on sheep farms - An important source of transmission? *Vet Parasitol.* 2020;288:109281. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109281.

Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(2):459–66. doi: 10.1128/AEM.02873-15.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus von grampositiven Bakterien nach GIESBRECHT et al. (1998) und MADIGAN et al. (2015).	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus von gramnegativen Bakterien nach MATUŁA et al. 2019 und MADIGAN et al. (2015).	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Oozystenwand von <i>C. parvum</i> nach LENDNER und DAUGSCHIES (2014) und HARRIS und PETRY (1999).	13
Abbildung 4:	Darstellung eines DNA-Amplifikationszyklus der real-time PCR nach ABLEITNER (2014), HOLZAPFEL und WICKERT (2007).	20
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des grundsätzlichen Aufbaus einer Nukleinsäuren-Extraktion nach ANON. (2023).	22
Abbildung 6:	Bild eines exemplarischen Aufbaus des transportablen Kofferlabors basierend auf MONDAL et al. (2016).	50

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der am häufigsten vorkommenden wasserassoziierten Zoonoseerreger in Anlehnung an WHO (2004).	4
Tabelle 2:	Übersicht der häufigsten vorkommenden Pathovaren von <i>E. coli</i> bei verschiedenen Tierarten nach MCVEY et al. (2022).	10
Tabelle 3:	Exemplarische Darstellung variierender Charaktereigenschaften von etablierten, kommerziellen Extraktions-Kits nach KNUDSEN et al. (2016) und basierend auf den entsprechenden Handbüchern von ANALYTIK JENA GMBH (2021), QIAGEN INC. (2020a), QIAGEN INC. (2020b), INVITROGEN, INC. (2012), MP BIOMEDICALS INC. (2021) und MO BIO LABORATORIES, INC. (2014).	44

# 10. Anhang

**Anhang 1:** Liste der zu untersuchenden Parameter für das Einleiten von Abwasser in öffentliche Gewässer nach der Abwasserverordnung (DEUTSCHES BUNDESMINISTERIUM 2004)

<b>Anionen/ Elemente</b>	<b>Kationen/Elemente</b>	<b>Einzelstoffe, Summen-, Gruppenparameter</b>	<b>biologische Testverfahren</b>
Chlorid	Aluminium*	Abfiltrierbare Stoffe*	Giftigkeit gegenüber Fischeiern*
Cyanid, leicht freisetzbar	Ammoniumstickstoff	Adsorbierbare organische gebundene Halogene*, als Chlorid angegeben	Giftigkeit gegenüber Daphnien*
Cyanid, gesamt	Antimon*	Chemischer Sauerstoffbedarf*	Giftigkeit gegenüber Algen*
Fluorid, gesamt	Arsen*	Organisch gebundener Kohlenstoff, gesamt*	Giftigkeit gegenüber Leuchtbakterien*
Nitratstickstoff	Barium*	Gesamter gebundener Stickstoff*	Leichte aerobe biologische Abbaubarkeit von Stoffen
Nitritstickstoff	Blei*	Kohlenwasserstoffe, gesamt*	Aerobe biologische Abbaubarkeit von Stoffen
Phosphor, gesamt	Cadmium*	Phenolindex nach Destillation und Farbstoffextraktion*	Aerobe biologische Abbaubarkeit der filtrierten Probe in biologischen Behandlungsanlagen
Sulfat	Chrom, gesamt*	Chlor, frei	Aerobe biologische Abbaubarkeit der filtrierten Probe in biologischen Behandlungsanlagen in 7 Tagen
Sulfid	Chrom VI	Hexachlorbenzol*	biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen*
Sulfit	Cobalt*	Trichlorethen*	Erbgutveränderndes Potenzial
Fluorid, gelöst	Eisen*	Tetrachlormethan*	Giftigkeit gegenüber Wasserlinsen*
Thiocyanat	Kupfer*	Dichlormethan*	

Chlorat	Nickel*	Hydrazin
	Quecksilber*	Anilin*
	Silber*	Hexacyclohexan als Summe aller Isomere
	Thallium*	Hexachlorbutadien*
	Vanadium*	Aldrin, Dieldrin, Endrin, Isodrin*
	Zink*	1,2-Dichlorethan*
	Zinn*	Trichlorbenzol*
	Titan*	Endosulfan*
	Selen*	Benzol und Derivate*
	Indium*	Organische Komplexbildner*
	Bor	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe*
	Cer	Chlordioxid und Oxidantien*
	Germanium	Färbung
	Gold	polychlorierte Dibenzodioxine und polychlorierte Dibenzofurane
	Hafnium	Per- und polyfluorierte Verbindungen*
	Molybdän	pH-Wert
	Palladium	Redoxpotenzial
	Praseodym	
	Ruthenium	
	Wolfram	
	Zirkonium	
Platin		

\* In der Originalprobe

## **Anhang 2: Standardprotokolle für die DNA-Extraktionen aus der Publikation (S. 25-39), bestehend aus separaten Vorbehandlungsoptionen und der *Reverse Purification*.**

### **S1 Standard operation protocols for separated pre-treatment options.**

#### **I SwiftX + no pre-treatment:**

1. Resuspend pellet in 170  $\mu$ L DL buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany).
2. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30 $\mu$ L of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
3. Incubate lysis mixture at 95°C for 15 minutes in a HLC Heating-ThermoMixer (DITABIS, Pforzheim, Germany).
4. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
5. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for one minute to let the magnetic particles separate.
6. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

#### **II SwiftX + proteinase K:**

1. Resuspend pellet in 160  $\mu$ L DL buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany).
2. Add 10  $\mu$ L proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) and incubate cell suspension at 60°C for 10 minutes in a HLC Heating-ThermoMixer (DITABIS, Pforzheim, Germany).
3. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30 $\mu$ L of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
4. Incubate lysis mixture at 95°C for 15 minutes in a HLC Heating-ThermoMixer (DITABIS, Pforzheim, Germany).
5. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
6. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for one minute to let the magnetic particles separate.
7. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

#### **III SwiftX + alkaline treatment at RT:**

1. Resuspend pellet in 90  $\mu$ L DL buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) and 90  $\mu$ L of 200 mM sodium hydroxide.
2. Incubate lysis mixture at RT for 15 minutes.
3. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30 $\mu$ L of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
4. Add 90  $\mu$ L of 200 mM hydrochloric acid to the suspension and incubate suspension at RT for three minutes.
5. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
6. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for one minute to let the magnetic particles separate.
7. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

#### **IV SwiftX + alkaline treatment at 95 °C:**

1. Resuspend pellet in 90 µL DL buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) and 90 µL of 200 mM sodium hydroxide.
2. Incubate lysis mixture at 95 °C for 15 minutes in a HLC Heating-ThermoMixer (DITABIS, Pforzheim, Germany).
3. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30µL of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
4. Add 90 µL of 200 mM hydrochloric acid to the suspension and incubate suspension at RT for three minutes.
5. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
6. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for one minute to let the magnetic particles separate.
7. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

#### **V SwiftX + bead beating:**

1. Resuspend pellet in 400 µL PBS.
2. Transfer mixture into a Soil Grinding SK38 Precellys Lysing Tube (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) and mix at 6500 rpm for one minute in the Precellys 24 Tissue Homogenizer (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France).
3. Transfer 200 µL of the suspension in a new microcentrifuge tube and add 160 µL of DL buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany).
4. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30µL of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
5. Incubate lysis mixture at 95°C for 15 minutes in a HLC Heating-ThermoMixer (DITABIS, Pforzheim, Germany).
6. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
7. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for 1 minute to let the magnetic particles separate.
8. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

## **Anhang 3: Protokolle der erfolgversprechendsten DNA-Extraktionen aus der Publikation (S. 25-39).**

### **S2 Best performing extraction protocols.**

#### **SwiftX + proteinase K:**

1. Add 160  $\mu\text{L}$  DLNbuffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) to 200  $\mu\text{l}$  wastewater.
2. Add 10  $\mu\text{L}$  proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) and incubate cell suspension at 60°C for 10 minutes.
3. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30 $\mu\text{L}$  of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
4. Incubate lysis mixture at 95°C for 15 minutes.
5. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
6. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for 1 minute to let the magnetic particles separate.
7. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

#### **SwiftX + bead beating:**

1. Add 200  $\mu\text{L}$  DLN buffer (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) to 200  $\mu\text{L}$  wastewater.
2. Transfer lysis mixture into a 2.0 mL microcentrifuge tube with 250 mg glass beads.
3. Bead beating in the Vortexer for 3 minutes at 2000 rpm.
4. Transfer 200  $\mu\text{L}$  of the lysis mixture into a new 1.5 ml microcentrifuge tube.
5. Add 10  $\mu\text{L}$  proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) and incubate cell suspension at 60°C for 10 minutes.
6. Shake or vortex Beads A (Xpedite Diagnostics GmbH, Germany) for 30 seconds to ensure homogeneous suspension. Add 30 $\mu\text{L}$  of Beads A to the sample mixture. Mix well by vortexing the tube.
7. Incubate lysis mixture at 95°C for 15 minutes.
8. Remove condensate from the lid before opening by shaking down.
9. Place sample tube into a magnetic stand at room temperature for 1 minute to let the magnetic particles separate.
10. Open the lid while the tube remains in the magnetic stand and transfer the supernatant into a new tube for storage or use in downstream applications.

**Anhang 4:** Ergebnisse der real-time PCR im Vergleich zu den Nukleinsäurekonzentrationen, gemessen durch Nanodrop und Qubit aus der Publikation (S. 25-39).

**S3 Comparison of cycle threshold and nucleic acid concentration measured by Nanodrop and Qubit for cell suspension of *S. aureus*, *E. coli* and *C. parvum* after extraction.** DNA concentration by Nanodrop and Qubit was not an indication of good performance in real-time PCR.

Extraction protocol	<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>				<i>C. parvum</i>						
	Nucleic acid concentration (ng/μl)		Quantification cycle	Nucleic acid concentration (ng/μl)	Nucleic acid concentration (ng/μl)		Quantification cycle	Nucleic acid concentration (ng/μl)	Nucleic acid concentration (ng/μl)		Quantification cycle	Nucleic acid concentration (ng/μl)			
	Qubit	Nanodrop			260/280	260/230			Qubit	Nanodrop			260/280	260/230	Qubit
<b>No pre-treatment</b>	15.55 (± 1.20)	59.10 (± 83.58)	0.61 (± 0.06)	0.18 (± 0.04)	20.92 (± 1.07)	3.68 (± 0.57)	72.80 (± 35.07)	0.62 (± 0.01)	0.20 (± 0.01)	15.52 (± 0.58)	13.40 (± 0.50)	0.00 (± 0.92)	0.02 (± 0.13)	- 0.03 (± 0.09)	27.23 (± 0.30)
<b>Proteinase K</b>	35.50 (± 0.71)	323.00 (± 216.09)	0.75 (± 0.04)	0.18 (± 0.01)	21.07 (± 0.53)	3.15 (± 0.77)	53.10 (± 27.29)	0.70 (± 1.17)	0.27 (± 0.09)	15.27 (± 0.11)	13.80 (± 0.10)	0.00 (± 6.15)	0.03 (± 0.34)	- 1.11 (± 1.86)	26.30 (± 0.42)
<b>Alkaline treatment RT</b>	20.65 (± 2.76)	25.10 (± 8.49)	0.61 (± 0.03)	0.12 (± 0.01)	22.79 (± 2.09)	0.76 (± 1.07)	31.15 (± 6.01)	0.58 (± 0.01)	0.14 (± 0.01)	18.70 (± 1.34)	12.80 (± 0.40)	0.00	0.42 (± 0.16)	0.45 (± 0.33)	27.35 (± 0.33)
<b>Alkaline treatment 95°C</b>	24.45 (± 0.21)	41.60 (± 36.63)	1.21 (± 0.58)	0.50 (± 0.46)	20.07 (± 0.32)	1.81 (± 0.57)	24.05 (± 0.78)	0.63 (± 0.02)	0.16 (± 0.01)	15.69 (± 0.35)	13.30 (± 0.80)	0.00	0.41 (± 0.01)	0.31 (± 0.10)	26.54 (± 0.59)
<b>Bead beating</b>	15.55 (± 0.35)	23.75 (± 4.74)	0.84 (± 0.27)	0.18 (± 0.06)	17.13 (± 0.66)	1.33 (± 0.33)	18.25 (± 13.36)	0.84 (± 0.46)	0.12 (± 0.01)	17.59 (± 0.31)	14.70 (± 0.40)	0.00	0.39 (± 0.02)	- 0.53 (± 1.98)	30.89 (± 0.21)
<b>No extraction</b>	13.80 (± 0.28)	7.10 (± 1.27)	2.69 (± 0.82)	- 0.76 (± 0.32)	23.88 (± 0.42)	15.60 (± 4.95)	56.15 (± 79.41)	0.57 (± 0.02)	0.18 (± 0.11)	17.18 (± 0.43)	13.00 (± 0.20)	0.00	0.85 (± 0.11)	0.36 (± 0.03)	31.83 (± 0.79)
<b>Only bead beating</b>	14.50 (± 1.98)	16.40 (± 14.14)	2.14 (± 0.11)	1.75 (± 0.63)	16.81 (± 0.01)	1.74 (± 0.05)	23.95 (± 33.87)	1.72 (± 0.04)	- 2.71 (± 3.42)	17.11 (± 0.23)	13.00 (± 0.80)	4.60 (± 1.27)	1.21 (± 0.07)	0.49 (± 0.02)	30.20 (± 0.76)
<b>Spin column + bead beating</b>	16.80 (± 2.40)	0.00	0.18 (± 0.04)	0.63 (± 0.03)	19.34 (± 0.47)	5.38 (± 1.17)	1.70 (± 1.98)	0.73 (± 1.54)	- 0.05 (± 0.06)	17.45 (± 0.47)	13.50 (± 0.10)	0.00	0.54 (± 0.08)	0.38 (± 0.58)	28.41 (± 0.92)
<b>Pairwise correlation of nucleic acid concentration with corresponding C<sub>q</sub></b>	0.228	0.087	(± 4.10)	(± 8.51)	(± 0.54)	0.00	0.00	1.02	0.09	23.34	13.20	0.00	0.70	0.42	30.16
<b>concentration with corresponding C<sub>q</sub></b>						0.00	0.00	(± 0.21)	(± 0.01)	(± 0.11)	(± 0.60)	0.00	(± 0.11)	(± 0.11)	(± 0.74)
<b>concentration with corresponding C<sub>q</sub></b>						- 0.548	- 0.468								0.493

<sup>1</sup>in term of correlation coefficient r

RT = room temperature

C<sub>q</sub> = quantification cycle

# 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Uwe Truyen, welcher es ermöglichte, dieses Projekt durchzuführen und mich in dieser Zeit zuverlässig betreute. Ich bedanke mich zudem bei Dr. Ahmed Abd El Wahed für die außerordentliche Betreuung, seine motivierenden Worte und die Unterstützung bei jeglichen aufkommenden Fragestellungen. Mein Dank gilt außerdem Dr. Andy Wende und der Firma Xpedite Diagnostics GmbH. Er ermöglichte die finanzielle Umsetzung des Projektes und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Einen weiteren Dank richte ich an Dr. Rea Kobialka, welche mir dabei half, den Überblick zu behalten und meine unzähligen Ideen in schlüssige Texte, Tabellen und Grafiken umzuwandeln.

Ich danke auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig für die herzliche Unterstützung, für ihr Verständnis und für die aufbauenden Worte. Insbesondere danke ich an dieser Stelle Dana Rüster und Evelin Brumme für ihre Hilfe bei jeder Art von Herausforderungen im Labor. Ich bedanke mich auch bei Md Anik Ashfaq Khan für die hilfreiche Einführung in die Welt der Statistik.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Katharina Schaufler, Elias Eger und Phillip Lübcke für die Bereitstellung der Abwasserproben und ihre konstruktiven Kommentare bei der Erstellung des Manuskriptes. Ich bedanke mich auch bei dem Institut für Parasitologie der Universität Leipzig für die Zurverfügungstellung der Oozysten und Korrektur des Manuskriptes.

Selbstverständlich danke ich auch herzlich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner, die mich emotional unterstützten und mir dabei halfen, nicht den Fokus zu verlieren. Ich freue mich darüber, diese wundervollen Menschen an meiner Seite zu wissen.