

Prof. Dr. med. Gert Frösner
Arbeitsgruppe Klinische Virologie
im Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Pettenkoferstr. 9a
80336 München, FRG
Tel. (089) 5160-5260
Labor: -5228
Fax (089) 51605292

28. Januar 2000

Gutachten zur Elimination von
Poliovirus
aus dem Wasser durch
Trinkwasserfilter PROaqua 4200
der Firma PROVITEC, D-94036 Passau

**I. Fragestellung bei der hier durchgeführten Prüfung eines
Trinkwasserfiltrationssystems bezüglich der Reduktion von im Wasser
vorhandenen Viren**

Geeignete Trinkwasserfiltrationssysteme können durch Filtration, Adsorptionsvorgänge und Ionenaustausch Schwebstoffe, Schwermetalle (Blei, Cadmium, Nickel), Halogenkohlenwasserstoffe, Chlor, Anionen (Nitrat, Nitrit, Sulfat) und Bakterien weitgehend aus dem Wasser entfernen.

Neben Bakterien stellen umweltresistente Viren wichtige Krankheitserreger dar, die auch im Wasser vorkommen können. Zu den in fäkal kontaminiertem Wasser vorkommenden Viren gehören insbesondere die Picornaviren (Polio-, Echo-, Coxsackieviren) und die Rotaviren. Picornaviren können eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen auslösen (z.B. Poliomyelitis, Meningitis, Myocarditis, Hepatitis, Erkältungskrankheiten bis hin zur Pneumonie), und Rotaviren sind weltweit die wichtigste Ursache einer durch Viren ausgelösten Durchfallerkrankung. Es ist deshalb wichtig zu wissen, ob ein Wasseraufbereitungssystem auch in der Lage ist, eine virale Kontamination zu reduzieren.

Da Viren etwa 100- bis 1000-fach kleiner sind als Bakterien, und ihr Durchmesser mit 15-300 Nanometer deutlich kleiner ist als die Porengröße der in Filtrationssystemen verwendeten Filter, kann eine Reduktion der Viruskonzentration nicht durch Filtration erfolgen. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß die Viruskonzentration durch Adsorption der Viren im Filtrationssystem absinkt. Dieses Prinzip der Adsorption von Viren wird auch erfolgreich in den in sterilen Werkbänken verwendeten Luftfiltrationssystemen eingesetzt.

Ziel der hier vorgenommenen Prüfung des PROVITEC PROaqua Trinkwasserfilters 4200 war es, die Reduktion von Poliovirus zu prüfen, das in hoher Konzentration dem Wasser beigegeben worden war. Poliovirus wurde aus folgenden Gründen als Testvirus gewählt:

1. Es gehört mit einem Durchmesser von etwa 27 Nanometern zu den kleinsten Viren überhaupt. Eine Reduktion der Viruskonzentration durch Filtration, die bei großen Viren vielleicht in geringem Grad möglich ist, scheidet sicher aus.

2. Poliovirus ist außerordentlich resistent. Eine nennenswerte spontane Inaktivierung des Virus während der Prüfung, die nichts mit dem Filtrationsvorgang zu tun hat, braucht nicht berücksichtigt zu werden.

3. Poliovirus kann als repräsentativ für die große Familie der Picornaviren angesehen werden, zu der viele im Wasser vorkommende humanpathogene Viren gehören.

4. Poliovirus kann für Prüfungszwecke leicht in großen Mengen in Gewebekultur hergestellt werden, und es ist in Form des Plaque-Tests ein Verfahren vorhanden, mit dem infektiöse Viruspartikel leicht quantifiziert werden können.

Aufgrund der letzten beiden Punkte wird auch bei der Wirksamkeitsprüfung von Instrumentendesinfektionsmitteln Poliovirus als repräsentatives Testvirus verwendet. Wegen den hohen methodischen Schwierigkeiten und des hohen Arbeitsaufwandes erfolgt die virologische Prüfung von Desinfektionsmitteln derzeit praktisch nur im Suspensionsversuch. Diejenige Konzentration eines Desinfektionsmittels gilt als wirksam, die bei der jeweiligen Einwirkdauer den Titer an infektiösem Virus um mindestens vier Zehnerpotenzen (vier log 10-Stufen oder um das Zehntausendfache) herabsetzt. Das Vorgehen bei einer virologischen Prüfung von Desinfektionsmitteln und die Bewertung der Testergebnisse ist in einer Richtlinie festgelegt (Richtlinie des Bundesgesundheitsamts und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsbl. 25: 397-398, 1982; Kuwert und Spicher. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamts und Bundesgesundheitsbl. 26: 413-415, 1983).

Hier soll geprüft werden, ob eine ähnliche Reduktion der Viruskonzentration, wie sie bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln gefordert wird, auch durch das Wasserfiltrationssystem der Firma PROVITEC erzielt werden kann.

II. Geprüftes Trinkwasserfiltrationssystem

Das Trinkwasserfiltrationssystem PROaqua 4200 wird von der Firma PROVITEC, Max-Emanuel-Str. 2, D-94036 Passau, vertrieben. Es handelt sich um ein Untertischgerät (Gesamthöhe 45,6 cm, Durchmesser 22,7 cm), das bei Anschluß an die öffentliche Wasserversorgung bis zu 2 Liter gefiltertes Wasser pro Minute zur Verfügung stellt. Das Filtergehäuse enthält verschiedene Schichten (Kiesbett-Filter, Aktivkohle, Nitrat-Harz, Dolomit-Gestein, Redoxol-Wolle, Bakterienfilter) die durch Filtervliese getrennt sind. Ein frisch bestücktes Filtrationssystem wurde unserem Labor Anfang Dezember 1999 vom Geschäftsführer der Firma, Herr Roland Bilz, übergeben.

III. Methodik der Prüfung

Testvirus: Zur Prüfung der Wirksamkeit wurde Polio Typ 1-Virus (Stamm Mahoney) verwendet.

Gewebekulturzellen: Die Herstellung von Poliovirus-Suspension erfolgte in Hela-Zellen. Als Wachstumsmedium für die Zellen diente Minimum Essential Medium (MEM; Flow, Meckenheim) mit 10 % fetalem Kälberserum.

Herstellung der Virussuspension: Die für die Prüfung benötigte Virussuspension wurde in einem Wannenstapel (Nunc, Heidelberg) hergestellt. Als Wachstumsmedium für die Zellen diente MEM mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, dem 10 % fetales Kälberserum zugesetzt worden war. Das sonst gleich zusammengesetzte Erhaltungsmedium, das nach der Virusinfektion des dichten Zellrasens eingesetzt wurde, enthielt 2,5 % fetales Kälberserum.

Sobald etwa 80 % der Zellen einen zytopathischen Effekt aufwiesen, wurden die Kulturen mit 1/10 des ursprünglichen Volumens des Mediums ohne fetales Kälberserum beschickt und dreimal gefroren und getaut. Nach Abzentrifugieren von Zellresten (3000 g, 10 Minuten) wurde der virushaltige Überstand portioniert und bei -70 °C bis zur Prüfung aufbewahrt.

Vorgehen bei der Prüfung der Reduktion der Viruskonzentration durch das Wasserfiltrationssystem:

Apparative Anordnung: Aus einem 1,5 Meter über dem Boden Filtrationssystems befindlichen Glaskolben wurde mit Hilfe eines dem System beiliegenden Schlauchs das zu filtrierende Wasser zum Wasserzulauf des Systems geleitet. Nach der Passage durch das Filtrationssystem wurde das Wasser vom Wasserauslauf mit einem Schlauch in einem weiteren Glaskolben aufgefangen, dessen Boden sich 0,5 Meter unter dem Boden des Filtrationssystems befand. Der für den Durchlauf verwendete hydrostatische Druck entsprach deshalb einer Wassersäule von 2 Meter. Dies führte zu einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 Liter pro Minute. Zur Unterbrechung des Wasserflusses wurde der Zufluß- und der Abflußschlauch mit chirurgischen Klemmen abgeklemmt.

Für alle Versuche wurde steriles, entmineralisiertes Wasser (Ampuwa, Fresenius) verwendet.

Viruszugabe zum Wasser und Probennahme vor und nach der Filtration: Vor Zugabe von Poliovirus-haltigem Wasser wurde das Filtrationssystem mit 6 Liter Wasser gespült und dann am Auslauf eine **Wasserprobe zur Toxizitätskontrolle** entnommen.

Dann erfolgte der Durchlauf von 2 Litern Wasser, das etwa 10^8 infektiöse Polioviren pro Milliliter enthielt (6 ml einer Poliovirus-suspension, die in einer früher durchgeführten Titration etwa 10^{11} infektiöse Einheiten pro Milliliter enthalten hatte, wurden zu 2 Liter Wasser zugegeben). Aus diesem Wasser wurde eine **Probe für die Bestimmung der Ausgangskonzentration des Poliovirus** entnommen. Dann wurde das Poliovirus-haltige Wasser durch das Filtrationssystem geleitet. Die darauffolgende Spülung des Filtrationssystems erfolgte wieder mit Wasser, das kein Poliovirus enthielt.

Da das Totvolumen des Filtrationssystems nach Angabe des Herstellers etwa 2 Liter beträgt, wurden die ersten 2 Liter des Auslaufs verworfen. Zur Untersuchung auf eventuell durchlaufendes Poliovirus wurde eine **Probe nach 3 Liter Durchlauf** entnommen. Zudem wurde eine **Probe aus einem Pool des 3. und 4. Liters des Durchlaufs** gezogen.

Um eine Verzögerung des Virusdurchflusses erkennen zu können, wurde eine weitere **Probe nach 6 Liter Durchlauf** durch die Filtrationsanlage genommen.

Um eine eventuelle spätere Ablösung von adsorbiertem Virus erkennen zu können, wurde das Filtrationssystem **nach 24 Stunden, 48 Stunden und 7 Tagen** erneut mit jeweils 2 Liter Wasser durchspült. Aus diesen 2-Literpools wurde jeweils eine Probe für die Untersuchung auf Poliovirus entnommen.

Infektiositätstiter im Plaque-Test: Alle Wasserproben wurden 1:10 mit MEM, das 10 % fetales Kälberserum enthielt, verdünnt.

Mit jeweils einem Milliliter dieser Verdünnung (10^{-1} Verdünnung der Proben) und weiteren Zehnerverdünnungen wurden jeweils 2 Schälchen von Falcon 3046 Multiwellplatten mit 6 Vertiefungen und flachem Boden (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park / New Jersey), die einen dichten Zellrasen von Hela-Zellen enthielten, inokuliert. Nach 1 Stunde Adsorptionszeit des Virus bei Raumtemperatur wurde die überstehende Flüssigkeit abgezogen. Dann wurde der Zellrasen der Schälchen mit 2 ml 2%iger, durch Kochen verflüssigter Agarose (Serva Feinbiochemica / Heidelberg, high EEO, reinst, Katal. Nr. 11397) die mit doppelt konzentriertem MEM mit 3%igem fetalem Kälberserum im Verhältnis 1:1 gemischt und im Wasserbad auf 40 °C abgekühlt worden war, überschichtet. Nach Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 37 °C für 2 Tage im CO₂-Brutschrank inkubiert.

In dieser Zeit entwickelte sich unter der Agarschicht an jeder Stelle des Zellrasens, an der ein infektiöses Viruspartikel adsorbiert worden war, ein Gebiet abgetöteter Zellen (ein Plaque). Die Zahl der Plaques zeigt also die Zahl der in einer bestimmten Verdünnung des Versuchsansatzes vorhandenen infektiösen Viruspartikel an. Die Plaques wurden durch ein Färbeverfahren sichtbar gemacht. Zu jeder Vertiefung wurde 1,0 ml 0,1%iges Brilliant Blue R (Sigma Chemie, Deisenhofen, Katal.-Nr. B0149) in 20 % Methanol und 5 % Essigsäure für 30 Minuten zugegeben. Im blau gefärbten Zellrasen wurden ungefärbte Plaques deutlich sichtbar. Aus jeweils zwei Ansätzen einer Verdünnung wurde ein Mittelwert der Plaquezahl errechnet.

IV. Ergebnis der Prüfung

1. Ergebnis der Kontrolleexperimente

Zellkulturkontrolle: Zum Ausschluß einer unspezifischen Zerstörung des Zellrasens und zum Nachweis eines normalen Wachstums der Zellkultur wurden 2 Vertiefungen einer Multiwell-Platte nicht mit Wasserproben beimpft. Es zeigte sich ein normaler, dichter, gut anfärbbarer Zellrasen.

Toxizitätskontrolle: Zum Ausschluß einer Toxizität des filtrierten Wassers für die Gewebekultur wurde die oben beschriebene Toxizitätskontrolle in der Verdünnung 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} zu jeweils 2 Vertiefungen zugegeben. Auch hier zeigte sich ein normaler, dichter, gut anfärbbarer Zellrasen. Somit war schon in der Verdünnung 10^{-1} keine Toxizität der Wasserproben vorhanden.

2. Messung der Virusreduktion durch die Wasseraufbereitung

Zugegebene Poliovirusmenge: Die Titration einer Probe aus dem zugegebenen Poliovirus-haltigen Wassers zeigte bis zur Verdünnung 10^{-6} eine völlige Zerstörung des Zellrasens. In der Verdünnung 10^{-7} wurden 85 bzw. 73 Plaques gezählt. Die **Ausgangskonzentration des Poliovirus im Wasser betrug damit $7,9 \times 10^8$ für die Gewebekultur infektiöse Polioviruspartikel pro Milliliter.** Mit 2 Litern Wasser wurden somit dem Filtrationssystem insgesamt $1,58 \times 10^{12}$ Polioviren zugeführt.

Messung der Polioviruskonzentration nach Wasseraufbereitung: Nach dem Durchlauf durch die Aufbereitungsanlage konnte lediglich in der Probe, die nach 3 Liter Durchlauf gewonnen worden war in der Verdünnung 10^{-1} in einem der beiden Schälchen 3 Virusplaques registriert werden. In der Verdünnung 10^{-2} und weiteren Verdünnungen waren keine Plaques nachweisbar. Dies entspricht einer Viruskonzentration von $1,5 \times 10^1$ Viruspartikeln pro Milliliter. Da das Totvolumen des Aufbereitungsanlage etwa 2 Liter beträgt, stammt die nach 3 Litern Durchlauf entnommene Wasserprobe aus der Mitte der zur Aufbereitung zugeführten 2 Liter Poliovirus suspension, die $7,9 \times 10^8$ Viruspartikel pro Milliliter enthielt. Die Polioviruskonzentration wurde damit bei der Aufbereitung um mehr als das 10^7 -fache reduziert.

Eine Wasserprobe, die aus dem gepoolten 3. und 4. Liter des Auslaufs nach der Zugabe von Poliovirus entnommen worden war, zeigte bereits in der Verdünnung 10^{-1} keine Plaques. Die Viruskonzentration liegt damit in diesem Pool unter 10 Viruspartikeln pro Milliliter.

Auch die Wasserproben, die nach weiterem Durchlauf von jeweils 2 Liter Wasser nach 24 Stunden, 48 Stunden und 7 Tagen gewonnen waren, zeigten bei der Prüfung einer 10^{-1} -Verdünnung keine Virusplaques.

V. Beurteilung

Die hier durchgeführte Prüfung des Trinkwasserfilters PROaqua 4200 der Firma PROVITEC zeigte, daß im Zulaufwasser vorhandenes Poliovirus in der Wasseraufbereitungsanlage um mehr als den Faktor 10^7 in seiner Konzentration reduziert wird. Dabei wurden bei dieser Prüfung 2 Liter Wasser mit einer extrem hohen Viruskonzentration von $7,9 \times 10^8$ infektiösen Viruspartikeln pro Milliliter zugeführt. Viruskonzentrationen die im Rohwasser vor einer Filtration vorhanden sein können, liegen jedoch fast immer an der Nachweisgrenze des Virus. Oft gelingt der Virusnachweis erst nach Konzentration des Virus aus großen Wassermengen. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß das hier geprüfte Filtrationssystem in fast jeder Situation eventuell im Wasser vorhandene Viren zuverlässig entfernt.

Die hier gemessene Reduzierung der Viruskonzentration um mehr als 7 log 10-Stufen (auf weniger als ein zehnmillionstel der Ausgangsmenge) ist ein hervorragender Wert. Bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren fordert die Prüfrichtlinie zum Wirksamkeitsnachweis lediglich eine mindestens 10 000-fache Reduzierung (um 4 log 10-Stufen) der Viruskonzentration. Der Trinkwasserfilter PROaqua 4200 von PROVITEC kann deshalb als hervorragend geeignet angesehen werden, um krankheitserregende Viren aus dem Trinkwasser zu entfernen.



Prof. Dr. G. Frösner