

5. Ergebnis

Es soll mit Hilfe zweier verschiedener Dynabeads Sorten ein Verfahren entwickelt werden, mit dessen Hilfe eine Isolierung von Enteroviren aus Ab- und Oberflächenwasser möglich ist. Überprüft werden soll die Effizienz der beiden verschiedenen Kopplungsmechanismen, wobei verschiedene Modifikationen wie Zeit, Reaktionstemperaturen, Salzkonzentrationen und Veränderungen an den Primern zum Einsatz kommen. Des Weiteren wird geprüft, inwieweit die experimentell gewonnenen Daten auch mit anderen Polio-Genomabschnitten Gültigkeit haben. Nach Probe PCRs wird diese Methode mit einer anderen Isolierungsmethode für Nukleinsäuren verglichen.

Während des Untersuchungszeitraumes vom Oktober 2002 bis Dezember 2004 wurden 100 Proben an der Stelle A (vor dem Klärwerk), 96 an der Stelle B (nach der Pipeline), 92 an der Stelle C (Westufer Werbeliner See) und 39 an der Stelle X (vor dem Klärwerk) auf das Vorkommen von gastroenteralen Viren (AdV, AstV, EntV, A HAV, NoV und RoV) untersucht. Eine repräsentative Auswahl dieser sechs Viren wird ansequenziert und mit der Datenbank abgeglichen. Von AstV, EntV und NoV werden fast alle Proben mittels real-time PCR (TaqMan) quantifiziert. Zur Untersuchung und Abschätzung der Infektiosität werden 26 EntV PCR positive Wasserproben in einer Zellkultur untersucht.

5.1. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die 5'NCR Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Kapazität der Dynabeads am Beispiel der Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Es werden zehn Gemische mit einer abnehmenden absoluten Konzentration (43 pmol/20µl; 21 pmol/20µl; 11 pmol/20µl; 5 pmol/20µl; 2,7 pmol/20µl; 1,34 pmol/20µl; 0,68 pmol/20µl; 0,34 pmol/20µl; 0,18 pmol/20µl und 0,09 pmol/20µl) von PVK (A)₂₀ 510-534 zusammengestellt, die jedoch alle die gleiche Menge an radioaktiv markierten Primer und daher auch die gleiche Zahl an cpm enthalten.

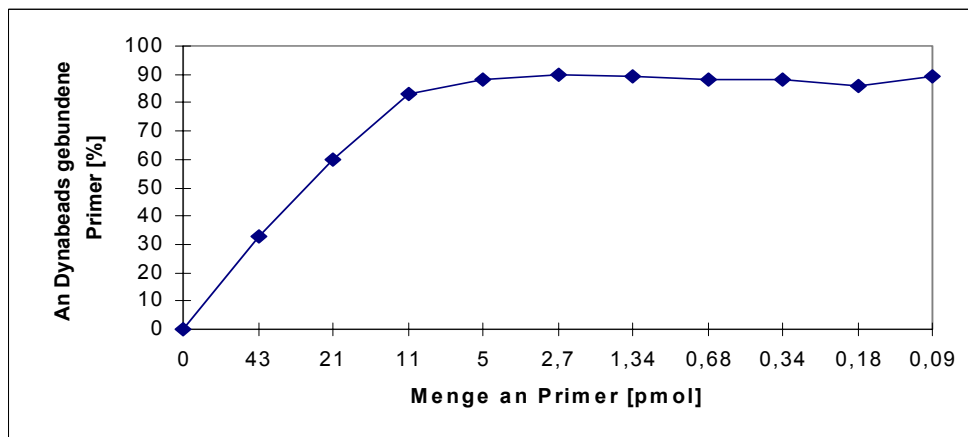


Abb. 12: Bindungskapazität der Dynabeads . P-32 markierte Primer PVK (A)₂₀ 510-534 werden in unterschiedlichen Konzentrationen an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads gekoppelt.

Bei Konzentrationen von 43 pmol werden 33%, bei 21 pmol 60% des Primers aus dem Überstand entfernt und an die Dynabeads gebunden. Mit einer Konzentration von 5 pmol im Ansatz wird ein Plateau von ca. 90% erreicht. Dies bedeutet, daß bei einer Messung des Überstands nach einer Inkubation des Reaktionsmixes mit den Dynabeads und dem Absetzen der Dynabeads mittels Anlegung eines magnetischen Feldes nur noch 10% der ursprünglich eingesetzten Aktivität im LSC detektiert werden kann. Auch mit sinkender Anzahl an Primer Molekülen bleibt dieser Wert nahezu konstant.

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Ein 150 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,6 pmol/Ansatz Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 und 1x LiCl-Puffer wird hergestellt, die Reaktionsansätze werden 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den jeweiligen Dynabeads inkubiert.

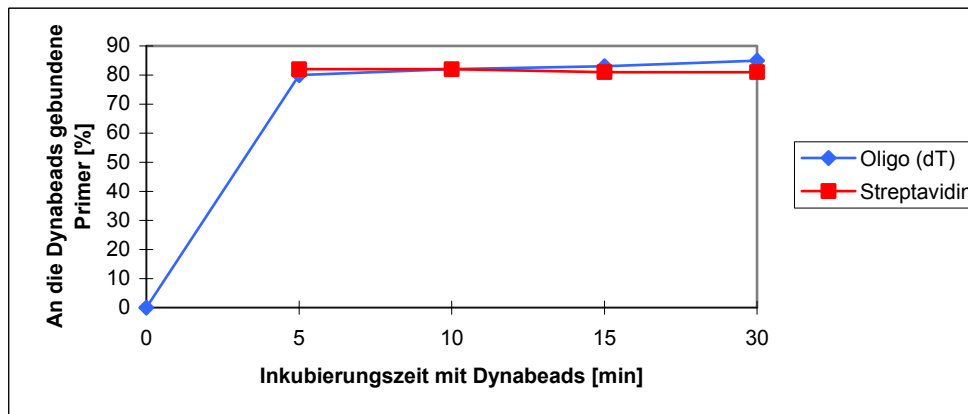


Abb. 13: Bindungsvermögen der Dynabeads. P-32 markierte Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 werden für 5 min, 10 min, 15 min und 30 min an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads gekoppelt.

Nach fünf minütlicher Inkubationszeit mit den jeweiligen Dynabeads sind 80% der radioaktiv markierten Primer aus dem Überstand entfernt. Meßbar im LSC sind noch etwa 20% der ursprünglich eingesetzten counts per minute (cpm). Am Ende der Reaktionszeit nach 30 Minuten ist die Aktivität des Reaktionsansatz mit PVK (A)₂₀ 510-534 ca. 3% niedriger als beim Ansatz mit dem Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, so daß 27% der ursprünglich eingesetzten cpm noch im LSC meßbar sind.

Festlegung der Salzkonzentration für die Bindung des Primers PVK (A)₂₀ 510-534 an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Eine radioaktiv markierter Primers wird mit unterschiedlichen LiCl Konzentrationen an Dynabeads inkubiert. Als Konzentrationen werden 0 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM, 1500 mM und 1800 mM LiCl eingesetzt. Bei RT werden die Reaktionsansätze für 60 min, 120 min und 240 min im Rollgerät mit Dynabeads versetzt.

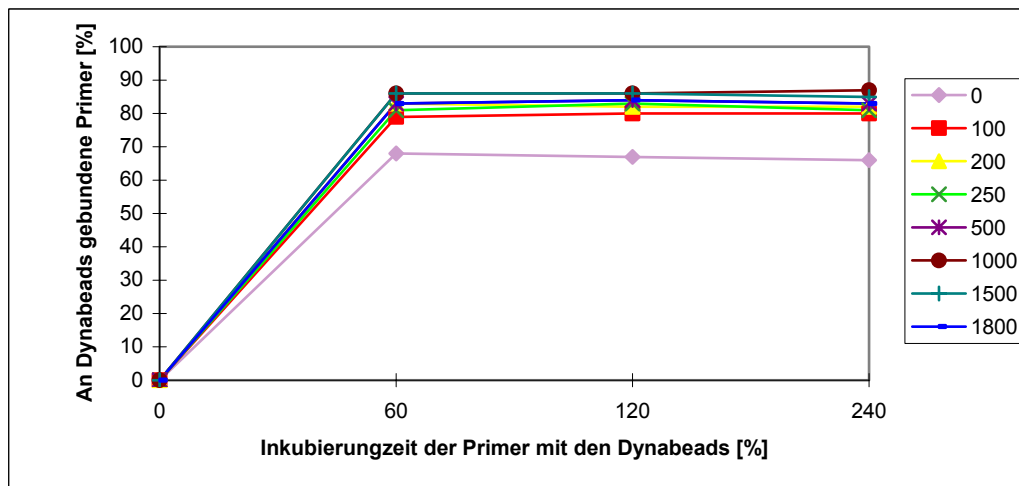


Abb. 14: Benötigte Salzkonzentration. 0,5 pmol eines radioaktiv markiertem Primers und 0,5 pmol des „kalten“ Primers werden in Ansätzen mit 0 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM, 1500 mM und 1800 mM LiCl für 60 min, 120 min und 240 min mit den Dynabeads inkubiert.

Bei einem Reaktionsansatz mit 0% LiCl Puffer werden knapp 30% der eingesetzten Radioaktivität im LSC detektiert, 70% befinden sich nicht mehr im Reaktionsansatz. Bei allen Ansätze, die LiCl enthalten, nimmt die Detektionsrate nach 60 minütlicher Inkubation mit den Dynabeads bereits um 10% zu. Bei der Konzentration mit 1000 mM LiCl handelt es sich um nachweislich den Reaktionsansatz, bei dem nach einer Inkubation mit den Dynabeads die niedrigste Restradioaktivität mit 22% gemessen wird, d.h. 88% der eingesetzten cpm stehen dem Nachweis des klaren Überstands nicht mehr zur Verfügung.

Untersuchung des Lysevermögens von Polioviren bei drei Stunden 65°C am Beispiel PVK (A)₂₀ 510-534 an Oligo (dT)₂₅ Dynabeads

Es werden zwei Ansätze (einer mit Proteinkinase K Lösung) mit einer Virussuspension mit 5×10^{-3} Genome / μ l (0,44 pmol/100 μ l) hergestellt und bei 45°C für 30 min, 60 min und 90 min inkubiert. Nach Ende der Reaktionszeit werden sie mit LiCl-Hybridisierungsmix versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert.

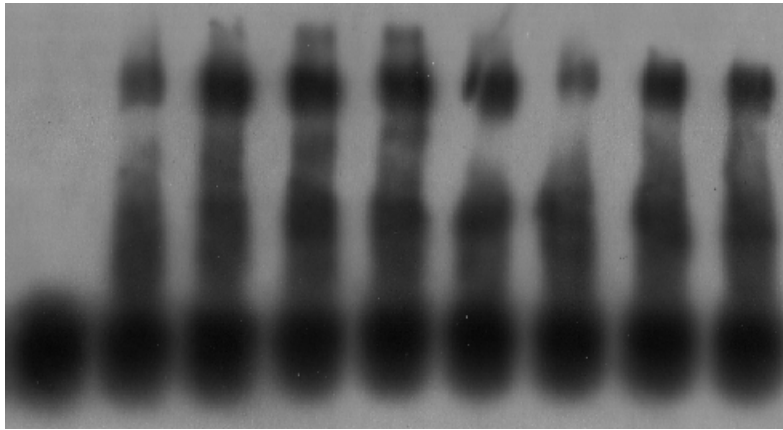


Abb. 15: Lysevermögen von Polioviren nach einer Inkubation mit (Spalten 6-9) und ohne (Spalten 3-5) Proteinkinase K Lösung. Spalte 1 enthält nur radioaktiv markierten Primer PVK (A)₂₀ 510-534.

Zerschneidet man die Membran, deren Abbild die obige Autoradiographie ist und auf der sich die eingesetzten radioaktiv markierten Primer befinden, pro Spalte in einen unteren und in einen oberen Teil und mißt die Aktivität der einzelnen Abschnitte im LSC, so findet man für das erste Signal 99% der eingesetzten Aktivität im unteren Bereich, auf den oberen entfallen 1%. Zum Zeitpunkt 0 min bei 45°C (Spuren 2 und 6) findet man im oberen Bereich der Membran von 40% der Gesamtaktivität bei beiden Ansätzen. Im Laufe der Reaktionszeit bei 45°C verändert sich dieser Wert kaum noch bewegt sich zwischen 37% und 46%.

Bestimmung des Zeitverlaufs bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird in einem Ansatz mit dem jeweiligen Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert und anschließend mit den Dynabeads für 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

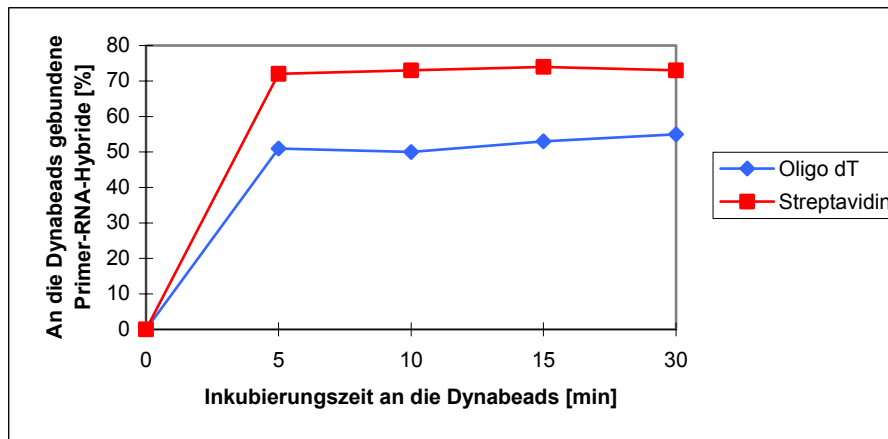


Abb. 16: Effizienz des indirekten Einfangs für beide Primersorten und äquivalenten Dynabeads bei einer Inkubierung bei 65°C für drei Stunden.

Belädt man beide Sorten von RNA-Primer-Hybriden an die dazugehörigen Dynabeads so stellt man fest, daß nach einer Zeit von 5 min bei Raumtemperatur man für beide Versuchsansätze ein nahezu konstantes Ergebnis erhält. Nach 5 min können für den Ansatz mit Oligo (dT)₂₅ Dynabeads 50% der eingesetzten Aktivität im Überstand detektiert werden, 50% können nicht mehr mittels LSC nachgewiesen werden. Zur gleichen Zeit liegt die Menge der noch nachweisbaren Restaktivität bei 25% für Streptavidin Dynabeads. Die Verlaufskurve für die an die Dynabeads gebundenen Primer-RNA-Hybride ist leicht ansteigend bis zu einem Wert von 75% (Streptavidin) und 50% (Oligo dT).

Bestimmung des Zeitverlaufs bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 und PVK (A)₂₀ 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)₂₅ Dynabeads (Direct capture)

Dynabeads werden mit einem Überschuß des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Im Anschluß wird RNA-Transkript in 1x LiCl Puffer bei 65°C für verschiedene Zeiten im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert.

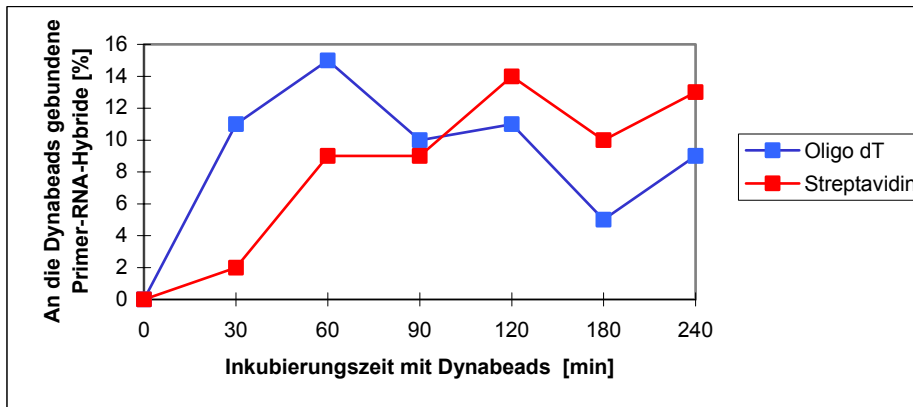


Abb. 17: Effizienz des direkten Einfangs für beide Primersorten und äquivalenten Dynabeads bei einer Inkubierung bei 65°C für 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min und 240 min.

Für den Ansatz mit PVK (A)₂₀ 510-534 verbleiben nach einer Inkubation bei 65°C 89% der eingesetzten Aktivität im Überstand, 11% an den Dynabeads. Im Laufe der Untersuchungszeit ist der Kurvenverlauf sehr unruhig mit einer hohen Spitze bei 60 min und einem Kurvenminimum bei 180 min. Berechnet man aus den Einzelwerten die durchschnittliche Aktivität, die an die Dynabeads gebunden wird, so erhält man einen Wert von 10%. Für den Ansatz mit PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 kann man nach 30 min 98% der eingesetzten Aktivität der RNA im Überstand messen, 2% verbleiben an den Dynabeads. Nach jedem weiteren Zeitabschnitt der Inkubierung mit den Dynabeads sinkt die Aktivität der gemessenen Überstände und liegt zum Ende der Reaktion nach 240 min bei 87%. Durchschnittlich berechnet sich somit einen Wert von 9,5% an Dynabeads gebundene Primer-RNA-Hybride.

Überprüfung der Effizienz des indirekten Einfangs bei Ansätzen mit verschiedenen Volumen am Beispiel von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534-RNA-Hybriden

In Volumen von 250 µl, 500 µl und 1000 µl werden RNA-Transkript, Primer und 1x LiCl-Puffer für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze bei Raumtemperatur mit den Dynabeads zusammengebracht.

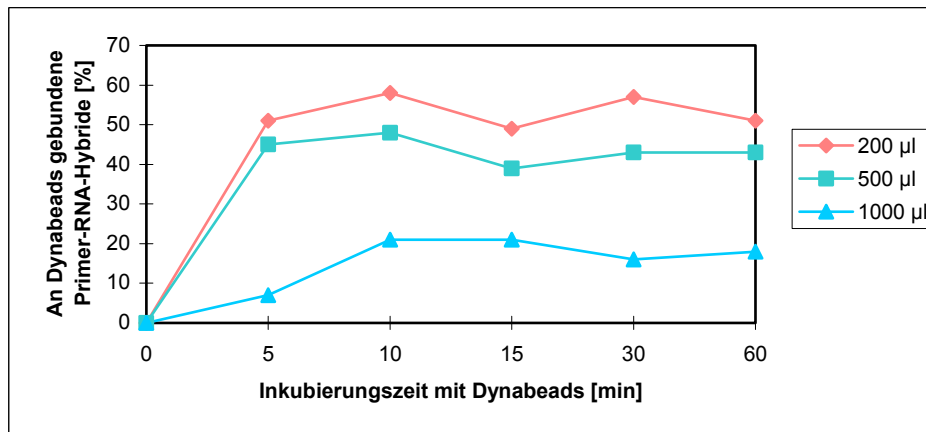


Abb. 18: Überblick über das Bindungsvermögen von Primer-RNA-Hybriden nach einer Inkubierung bei 65°C für drei Stunden. Die Inkubationszeiten mit den Dynabeads bei RT betragen 5 min, 10 min, 15 min, 30 min und 60 min.

Bei einem Gesamtansatz von 200 µl sind 53% der eingesetzten counts per minute nach einer Inkubierung mit den Dynabeads an diese gekoppelt worden. Im Vergleich dazu können 45% im 500 µl Ansatz nicht mehr detektiert werden, bei dem höchsten Volumen sind es durchschnittlich 13%. Die Überstände für 200 µl und 500 µl enthalten bei einer Messung im LSC durchschnittlich 47% und 55% der eingesetzten Aktivität. Für 1000 µl sind es hingegen 83%.

5.2. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die drei Primer PVK Biotin (A)_{20, 31} und ₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads, um durch einen längeren Spacer die Effizienz des direkten Einfangs möglichst zu verbessern

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)_{20, 31} und ₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads

Dynabeads werden mit radioaktiv markierten Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und 5 min, 10 min, 15 min und 20 min bei Raumtemperatur im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert.

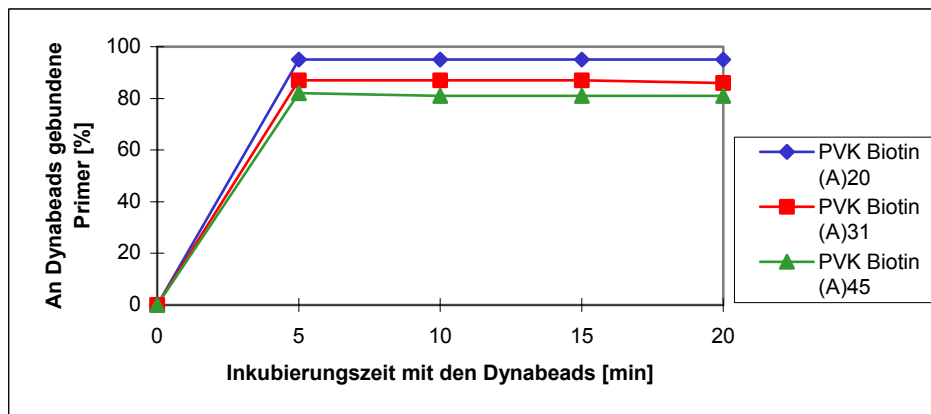


Abb. 19: Bindungsvermögen der Dynabeads. P-32 markierte Primer PVK Biotin (A)_{20, 31 und 45} 510-534 werden für 5 min, 10 min, 15 min und 20 min an Streptavidin Dynabeads gekoppelt.

Bei allen drei Primern wird das Maximum des Bindungsvermögens der Dynabeads bereits nach 5 min erreicht. Im Laufe der Reaktionszeit kommt es zu keiner sichtbaren, weiteren Veränderung der Werte. Somit kann 5% der ursprünglich zum Zeitpunkt Null gemessenen Aktivität für den Primer mit 20 und 13% für den Primer mit 31 Adenosinbasen als Spacer detektiert werden. Für PVK Biotin (A)₄₅ liegt dieser Wert bei 19%. Berechnet man daraus die Menge der an die Dynabeads gebundenen Primer so ergibt sich aus der Differenz aus der Gesamtzahl an cpm und den LSC Messungen Werte von 95% für den Primer mit 20, 87% für den Primer mit 31 und 81% für den Primer mit 31 Adenosinbasen als Spacer.

Bestimmung des Zeitverlaufs bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)_{20, 31 und 45} 510-534 an Streptavidin Dynabeads (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird in einem Ansatz mit dem jeweiligen Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubierung mit den Dynabeads bei Raumtemperatur.

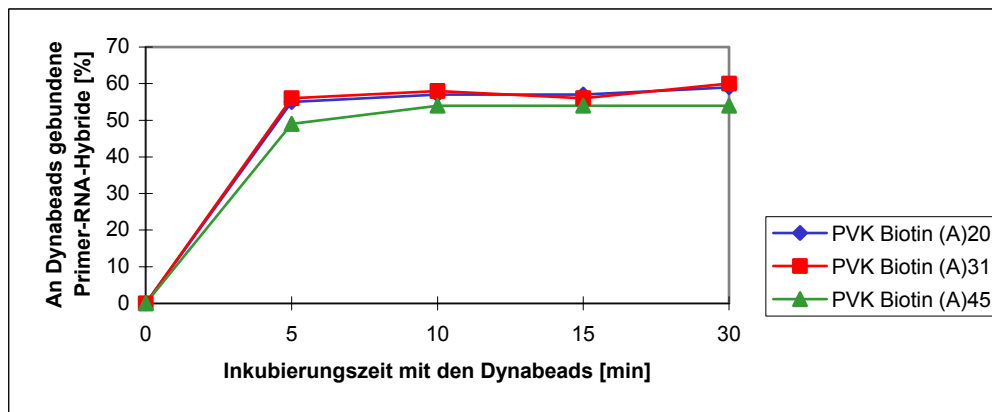


Abb. 20: Effizienz des indirekten Einfangs für alle drei Primer mit unterschiedlichen Spacern an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung bei 65°C für drei Stunden.

Belädt man die jeweiligen RNA-Primer-Hybriden an die Dynabeads so ist deutlich, daß nach einer Zeit von 5 min bei Raumtemperatur man für alle Versuchsansätze ein nahezu konstantes Ergebnis erhält. Nach 5 min können für den Ansatz mit zwanzig und einunddreißig Basen langen Spacern etwa 78% der eingesetzten Aktivität nicht mehr im Überstand detektiert werden. Zur gleichen Zeit findet man für den fünfundvierzig Basen langen Spacer eine nachweisbare Restaktivität von 49%, d.h. 51% sind an die Kugeln gebunden.

Bestimmung des Zeitverlaufs bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)_{20, 31} und ₄₅ 510-534 an Streptavidin Dynabeads (Direct capture)

Dynabeads werden mit einem Überschuß des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Im Anschluß wird RNA-Transkript und 1x LiCl Puffer dazugegeben und bei 65°C mit den Dynabeads inkubiert.

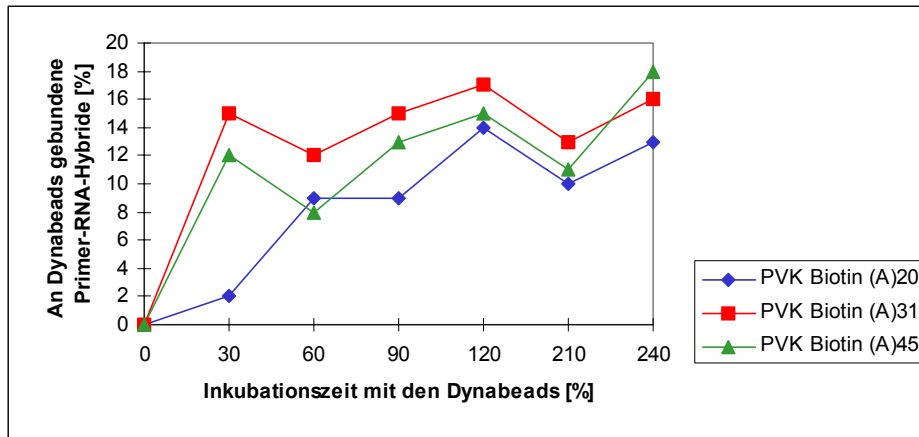


Abb. 21: Effizienz des direkten Einfangs für Primer mit unterschiedlichen Spacerlängen bei einer Inkubierung bei 65°C für 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 210 min und 240 min.

Für den Ansatz mit PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 kann man nach 30 min 96% der eingesetzten Aktivität der RNA im Überstand messen. Nach jedem weiteren Zeitabschnitt der Inkubierung mit den Dynabeads sinkt die Aktivität der gemessenen Überstände und liegt zum Ende der Reaktion nach 240 min bei 86%. Durchschnittlich errechnet sich daraus einen Wert von 10%, der aus der Differenz der Aktivität vor und nach der Inkubierung mit den Dynabeads resultiert. Mit Erhöhung der Anzahl an Spacermolekülen nimmt der prozentuale Anteil an Hybriden, die nicht an die Dynabeads gebunden werden konnten, ab. Im Durchschnitt sind das für PVK Biotin (A)₃₁ 510-534 15%, für PVK Biotin (A)₄₅ 510-534 11% an Primer-RNA-Hybriden, die an die Kugeln gebunden werden.

5.3. Überprüfung und gegebenenfalls auch Festlegung der allgemeinen Bedingungen für andere Genomabschnitte auf dem Polio-Transkript anhand der Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads

Die Dynabeads werden mit den jeweiligen radioaktiven Primern und 1x LiCl-Puffer bei Raumtemperatur im Rollgerät inkubiert.

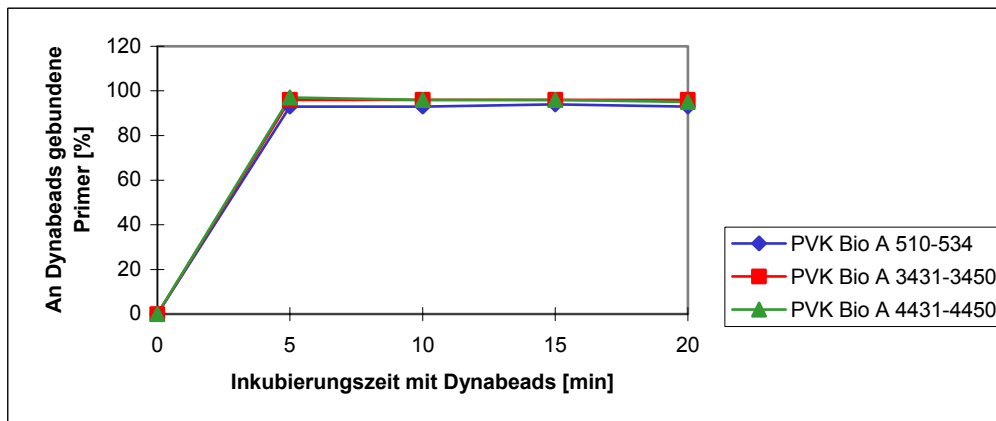


Abb. 22: Bindungsvermögen der Dynabeads. P-32 markierte Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 werden für 5 min, 10 min, 15 min und 20 min an Streptavidin Dynabeads gekoppelt.

Alle drei Primer erreichen nach 5 min bereits einen konstanten Wert von 4% der Restaktivität, die noch im Überstand nachweisbar ist. Dies entspricht einer Kopplungen mit den Kugeln von 96%. Dieser Wert verändert sich bis zum Ende der Reaktionszeit nicht mehr.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung für 3 Stunden bei 65°C (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird mit Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert und für drei Stunden bei 65°C inkubiert und anschließend mit den Dynabeads bei Raumtemperatur inkubiert.

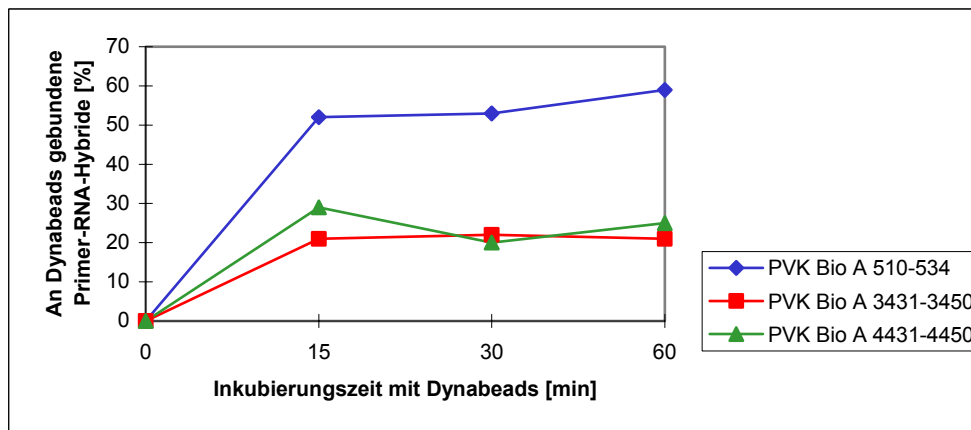


Abb. 23: Effizienz des indirekten Einfangs für alle drei Primer bei einer Inkubierung bei 65°C für drei Stunden. Anschließend werden die Ansätze für 15 min, 30 min und 60 min mit den Dynabeads bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Vergleich mit den Primern, die außerhalb der 5'NCR binden, sind 55% der eingesetzten Aktivität im Überstand nicht mittels Szintillator nachweisbar. Bei den anderen Primern liegt dieser Wert konstant bei 21% für PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und im Mittel bei 25% für PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei 45°C (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird mit dem jeweiligen Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei 45°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubierung der Überständen bei Raumtemperatur.

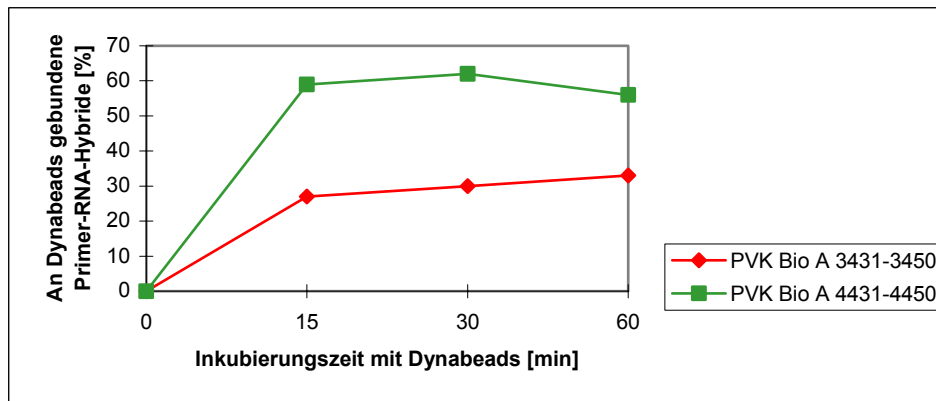


Abb. 24: Effizienz des indirekten Einfangs für alle beiden Primer bei einer Inkubierung bei 45°C über Nacht. Anschließend werden die Ansätze für 15 min, 30 min und 60 min mit den Dynabeads bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reaktionszeit beträgt ca. 20 Stunden bei 45°C im Thermoblock, im Anschluß daran werden für die Bestimmung der restlichen Aktivität in den Überständen Doppelproben entnommen. Die Messung ergibt, daß nach einer fünfzehn minütlichen Inkubierung mit den Dynabeads noch 41% von PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450-RNA-Hybriden im LSC detektiert werden. Für PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 sind es hingegen 70%. Berechnet man die Differenz zwischen den eingesetzten und später im Überstand gemessenen cpm, so erhält man 49% für gekoppelte PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450-RNA-Hybriden und 30% für PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 510-534, PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450 und PVK (A)₂₀ 4431-4450 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei 45°C (Direct capture)

Dynabeads werden einem Überschuß des jeweiligen Primers bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Im Anschluß wird RNA-Transkript und 1x LiCl Puffer dazugegeben und bei 45°C über Nacht im Rollgerät mit den Dynabeads inkubiert.

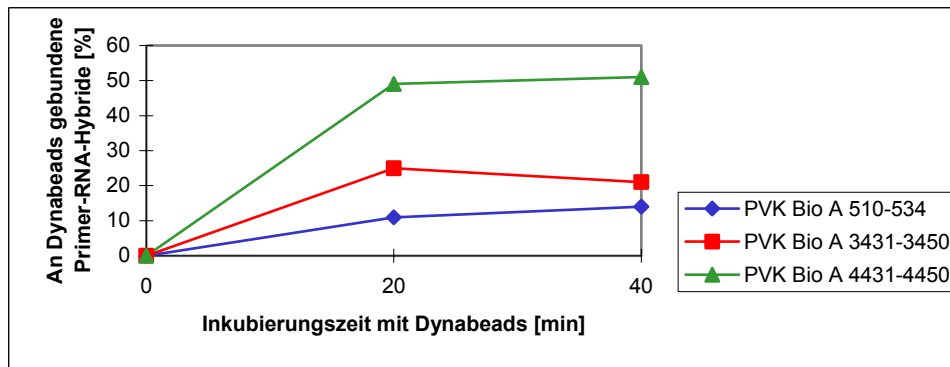


Abb. 25: Effizienz des direkten Einfangs für Primer auf verschiedenen Abschnitten des Genoms bei einer Inkubierung bei 45°C für 20 und 40 Stunden

Bei einer Reaktionstemperatur von 45°C liegt die Aktivität der Aliquots des Überstands nach einer Trennung im Magnetständer für die Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534-RNA-Hybride bei durchschnittlich 87%, etwa dem gleichen Niveau wie unter 5.1.6. beschrieben. Für die Primer auf einem anderen Genomabschnitt als der 5'NCR können 77% der ursprünglich eingesetzten Aktivität bei PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450-RNA-Hybriden und 50% bei PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450-RNA-Hybriden im Szintillator detektiert werden. Als Differenz zwischen den 100% der cpm und den gemessenen cpm der Überstände resultiert daraus 13% für die Primer PVK Biotin (A)₂₀ 510-534-RNA-Hybride, 33% für die PVK Biotin (A)₂₀ 3431-3450-RNA-Hybride und 50% bei PVK Biotin (A)₂₀ 4431-4450-RNA-Hybride.

Bindungsvermögen von PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads

Die Dynabeads werden in einem Reaktionsansatz bestehend aus Primer und 1x LiCl-Puffer bei Raumtemperatur im Rollgerät inkubiert.

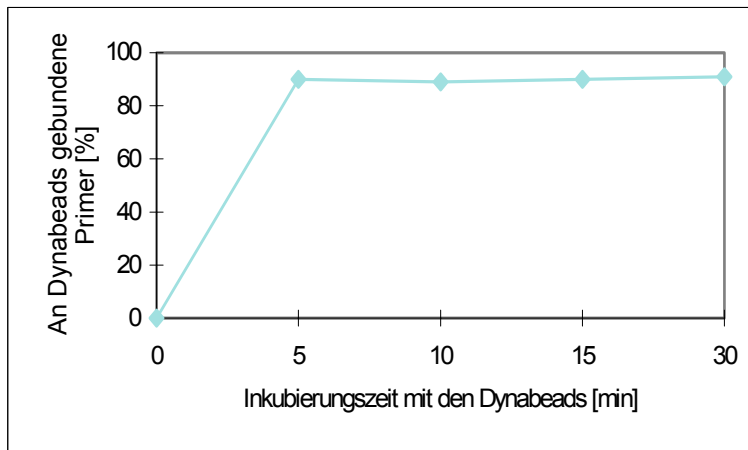


Abb. 26: Bindungsvermögen der Dynabeads. Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 wird für 5 min, 10 min, 15 min und 30 min an Streptavidin Dynabeads gekoppelt.

Nach fünf minütlicher Inkubierung der Dynabeads mit dem radioaktiv markierten Primer können im Szintillator noch 10% der ursprünglich eingesetzten cpm Zahl nachgewiesen werden. Dieser Wert bleibt während der restlichen Reaktionszeit konstant.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung für 3 Stunden bei 65°C (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird mit dem Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert, der Überstand wird bei Raumtemperatur mit den Streptavidin Dynabeads im Rollgerät gekoppelt.

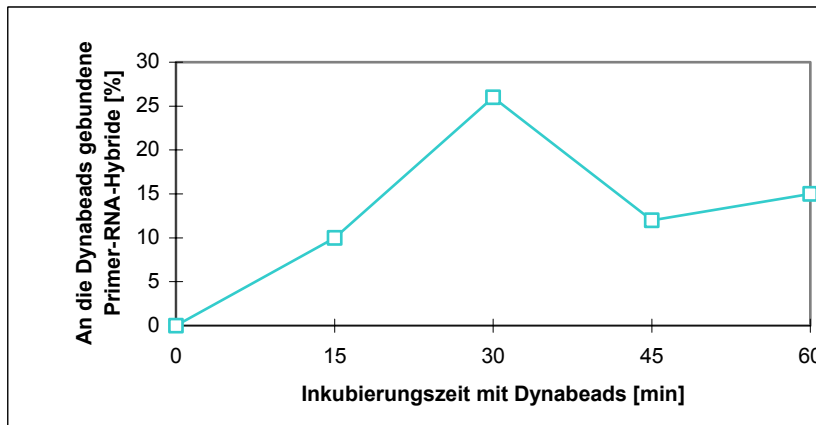


Abb. 27: Effizienz des indirekten Einfangs für den Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 bei einer Inkubierung bei 65°C für drei Stunden. Anschließend werden die Ansätze für 15 min, 30 min, 45 min und 60 min mit den Dynabeads bei Raumtemperatur inkubiert

Bei einer Reaktionstemperatur von 65°C für 3 Stunden liegt die Aktivität der Aliquots des Überstands nach einer Trennung im Magnetständer für die Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400-RNA-Hybride und einer Messung im Szintillator bei durchschnittlich 86%, wenn der Wert für eine Inkubierung von 30 min bei Raumtemperatur mit berücksichtigt wird. Wird dieser Wert jedoch nicht berücksichtigt, so weist man durchschnittlich 88% der ursprünglich eingesetzten cpm im Überstand mittels Szintillator nach. Die Restaktivität ist an die Dynabeads gekoppelt.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht bei variablen Temperaturen (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird mit dem Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei verschiedenen Temperaturen im Thermoblock inkubiert.

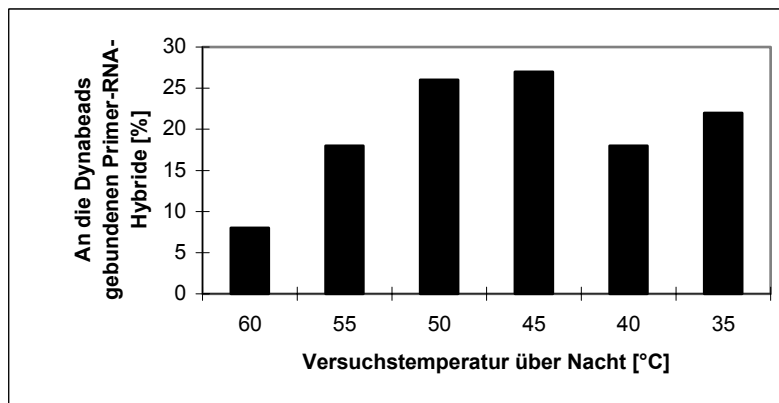


Abb. 28: Effizienz des indirekten Einfangs für den Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 bei einer Inkubierung über Nacht bei 60°C, 55°C, 50°C, 45°C, 40°C und 35°C. Anschließend werden die Ansätze mit den Dynabeads für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abbildung 28 zeigt eine Abnahme der Aktivität im Überstand nach einer Inkubierung mit den Dynabeads und eine Zunahme der an die Streptavidin gebundenen Primer-RNA-Hybride je mehr die Hybridisierungstemperatur gesenkt wird. Die niedrigste Aktivität des Überstands wird bei einer Temperatur von 50°C bzw. 45°C erzielt. Zwischen 25 und 28% der Primer-RNA-Hybride an die Dynabeads gekoppelt. Bei 55°C, 40°C und 35°C sind zwischen 80-82% der eingesetzten cpm im Reaktionsansatz verblieben, dies entspricht zwischen 20-18% der an die Kugeln gebundenen Hybride. Bei Temperaturen von 60°C können ca. 92% im LSC detektiert werden, demnach liegt die Bindungsquote bei 8%.

Bestimmung des Zeitverlaufes bei der Bindung von RNA an PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads bei einer Inkubierung über Nacht mit 20% Formamid bei Temperaturen von 40°C und 35°C (Indirect capture)

Das RNA-Transkript wird mit Primer, 20% Formamid und 1x LiCl-Puffer versetzt und über Nacht bei 40° und 35°C inkubiert. Die Dynabeads werden anschließend mit den Hybridisierungsmixen bei Raumtemperatur inkubiert.

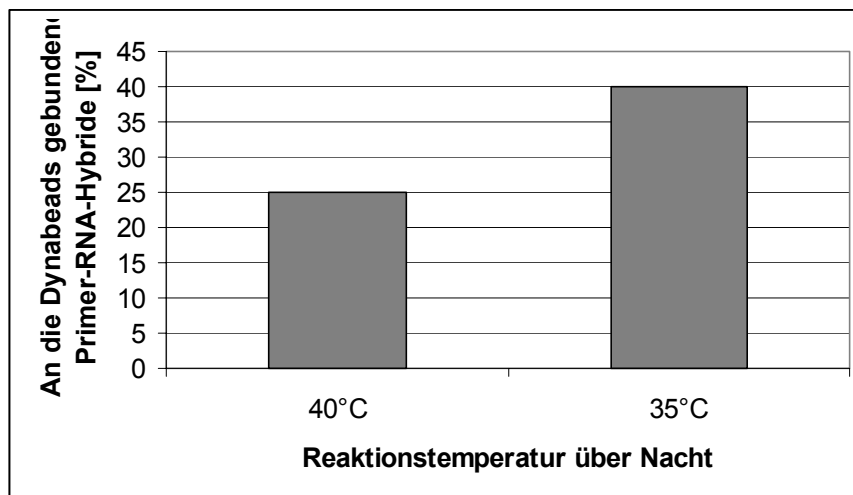


Abb. 29: Effizienz des indirekten Einfangs für den Primer PVK Biotin (A)₂₀ 7380-7400 bei einer Inkubierung über Nacht bei 40°C und 35°C mit 20% Formamid. Anschließend werden die Ansätze mit den Dynabeads bei Raumtemperatur inkubiert.

Abbildung 29 zeigt eine Abnahme der Aktivität im Überstand nach einer Inkubierung mit den Dynabeads, je mehr die Hybridisierungstemperatur gesenkt wird. Die niedrigste Aktivität des Überstands mißt man bei einer Temperatur von 35°C, die Restaktivitäten des Überstands liegen bei 40%. Bei 40°C verbleibt 75% der eingesetzten cpm im Reaktionsansatz und können noch im LSC detektiert werden, das entspricht einem Wert von 25% als Differenz zwischen der Gesamtzahl der eingesetzten cpm und den im LSC gemessenen cpm der Überstände.

Lyse von Polio Serotyp 1-Virionen durch die Wirkung von 1x LiCl Puffer bei drei Stunden bei 65°C sowie Bindung an den Primer PVK 7424-7400

Ein Ansatz mit Polio-1-Virionen und Primer PVK 7424-7400 wird mit 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Oligo (dT)₂₅ Dynabeads werden mit dem Oligonukleotid Biotin (dG)₁₀(dT)₂₀ gekoppelt. Nach der Zugabe des Hybridisierungsmixes wird bei Raumtemperatur die Probe inkubiert.

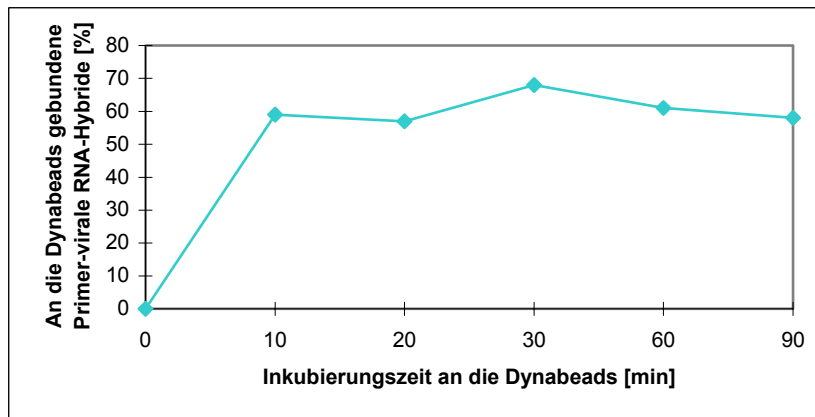


Abb. 30: Bindungsvermögen der Dynabeads. P-32 markierte Primer PVK 7424-7400 werden für 10 min, 200 min, 30 min 60 min und 90 min an mit Biotin (dG)₁₀(dT)₂₀ gekoppelten Oligo (dT)₂₅ Dynabeads gebunden.

Nach 10 min werden mittels Messung im Szintillator etwa 60% der eingesetzten Aktivität nicht mehr detektiert. Trägt man Aliquots in einem Agarosegel auf, transferiert die Nukleinsäuren auf eine Nitrocellulosemembran und inkubiert darauf einen Film, so erhält man folgende Autoradiographie:

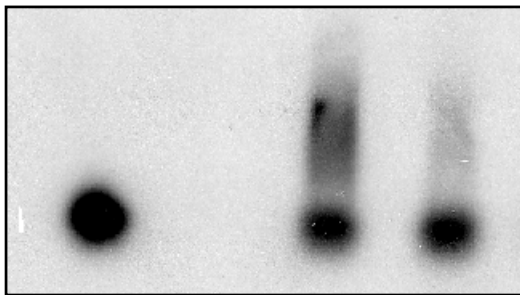


Abb. 31: Überblick über das Ergebnis der Autoradiographie. Spur 1 enthält den Reaktionsansatz mit Virionen und ³²P markiertem PVK 7424-7400 vor der Hybridisierung bei 3h 65°C; Spur 2 enthält den selben Ansatz, jedoch nach einer Hybridisierung für 3h bei 65°C. Spur 3 beinhaltet ein Aliquot des Überstands nach der Inkubation des Hybridisierungsmixes bei Raumtemperatur mit den Dynabeads.

Mit Hilfe von Fixpunkten wird die Membran an den geschwärzten bzw. an anderen interessanten Stellen zerschnitten und im Szintillator gemessen. Bei einer Messung von Spur 1 im unteren Bereich des Primers werden 98,6% der eingesetzten cpm im unteren Bereich des Primers detektiert. Nach der Hybridisierung (Spur 2) verbleiben dort noch 47,6%, im oberen Bereich des dazugehörigen Membranabschnitts wird

eine Aktivität von 52,4% gemessen, davon verbleiben 13% auch nach einer Inkubierung mit den Dynabeads bei Raumtemperatur im Ansatz (Spur 3).

5.4. Abkopplung der RNA-Transkripte von den Dynabeads

Das RNA-Transkript wird in neun Ansätzen mit Primer und 1x LiCl-Puffer versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Die Dynabeads werden zweimal mit Puffer gewaschen und mit dem Hybridisationsmix bei Raumtemperatur im Rollgerät für 60 min inkubiert. Die Dynabeads werden anschließend zweimal gewaschen, anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl Tris HCl (drei Ansätze), DEPC-Wasser (drei Ansätze) und 1xPCR-Puffer (drei Ansätze). Von jedem Elutionsmittel wird eine der drei Proben für 5 min, die zweite für 10 min und die dritte für 30 min bei 90°C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Reaktionszeiten werden die Überstände sofort entfernt.

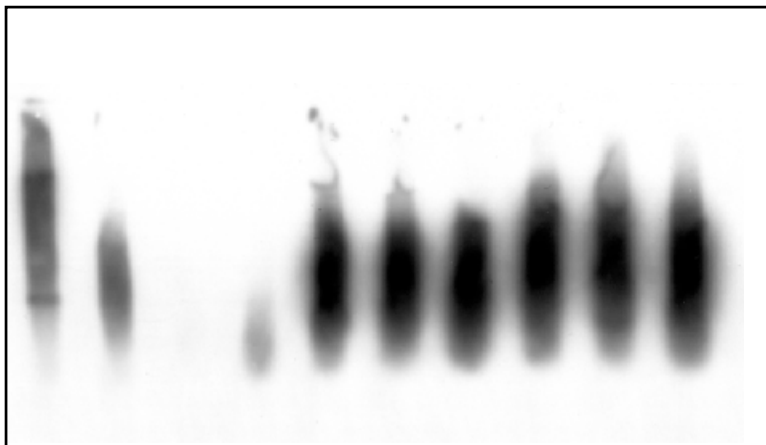


Abb.32: Autoradiographie der Nitrocellulosemembran, auf welche die neun Eluate nach erfolgter Gelelektrophorese transferiert werden. Laufspur 1 enthält RNA bei RT, Die Laufspuren 2-4 enthalten das bei 90°C für 5 min, 10 min und 30 min inkubierte RNA-Transkript; Laufspuren 5-7 dito für DEPC-Wasser und Laufspuren 8-10 dito für 1x PCR-Puffer.

Die Messung der Aktivität der Überstände, die aus den Eluaten gewonnen werden, zeigt, daß 60% der an die Dynabeads gebundenen Aktivitäten durch eine Inkubierung mit 1x PCR-Puffer (Laufspur 8-10) im LSC detektiert werden. Für die drei Proben, die mit 10 mM Tris-HCl inkubiert werden (Laufspuren 2-4), schwankt dieser Wert zwischen 3 und 5%. Bei einer Messungen der Aktivitäten der DEPC-Wasser

Eluate im Szintillator findet man etwa 47% der an die Dynabeads gebundenen Primer-RNA- Hybride (für 5 min bzw. 30 min bei 90°C) nach dem Erhitzen wieder. Bei einer Inkubierung von 10 min bei 90°C beträgt der Wert 60%.

5.5. Überprüfung der Bedingungen mit einer im Anschluß durchgeführten PCR unter Laborbedingungen und an Umweltproben

Überprüfung der Reversen Transkription sowie der angeschlossenen PCR mit Proben, die entweder noch an die Streptavidin Dynabeads gebunden oder durch Eluierung von den Dynabeads abgekoppelt sind

Es werden RNA-Transkripte (10^9 pmol; 10^4 pmol zweimal; 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol) mit 1x LiCl Puffer und PVK Biotin (A)₂₀ 510-534 versetzt und für drei Stunden bei 65°C inkubiert. Zu den gewaschenen Streptavidin Dynabeads werden anschließend die Hybridisierungsmixe dazugegeben und für eine Stunde unter langsamen Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads werden gewaschen. Für 5 min bei 90°C erfolgt die Abkopplung der Primer-RNA-Hybride (Konzentration von den Kugeln: 10^9 pmol; 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol). Die beiden Ansätze mit 10^4 pmol verbleiben mit Dynabeads.

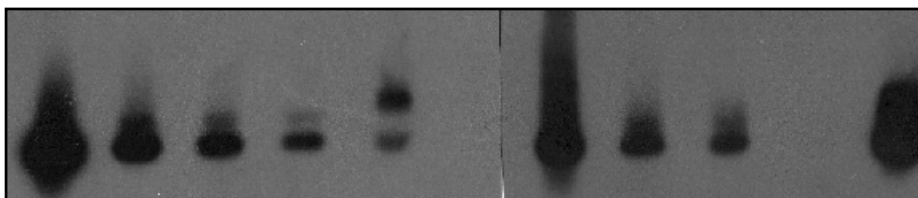


Abb. 33: Die vier positiven RNA-Kontrollen werden zusammen mit den Reaktionsansätzen (10^9 pmol; 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol, zweimal 10^4 pmol an die Kugeln gebunden sowie eine Probe mit Wasser als Negativkontrolle) mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert. Als Hybridisierungssonde wird PVK 490-509 eingesetzt.

Die Laufspuren 1-4 detektieren die positiven PCR Kontrollen mit Konzentrationen von 10^9 pmol (Spur 1); 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol (Spur 4). Mit steigender Konzentration nimmt auch die Filmschwärzung durch die radioaktive Sonde deutlich zu. Bei den drei niedrigeren Konzentrationen wird anscheinend noch ein Nebenprodukt gebildet, dessen Nukleotidzahl etwas höher liegt als das zu

erwartende Produkt. Laufspur 5 enthält eine Konzentration von 10^4 pmol RNA-Transkripte, die an die Dynabeads gebunden bleiben und im PCR Ansatz keinen zusätzlichen Primer PVK 510-534 erhalten. Die Schwärzung des Films durch die Autoradiographie entspricht in etwa der mit der Konzentration von 10^0 pmol (Spur 4). Auch hier tritt ein weiteres Produkt mit einer größeren Länge auf. Laufspur 5 enthält die negative PCR Probe, die statt Template Wasser enthält. Sie ist eindeutig negativ. Die von den Dynabeads entfernten Eluate mit Konzentrationen von 10^9 pmol (Spur 6); 10^3 pmol; 10^2 pmol und 10^0 pmol (Spur 9) sind in den Laufspuren 6-9 abgebildet. Bis auf die niedrigste Konzentration mit 10^0 pmol RNA-Transkripte sind alle Proben positiv. Laufspur 10 enthält die Probe, bei der die Reaktionsansätze mit den an die Dynabeads gebundene RNA-Transkripte (10^4 pmol) für die PCR Amplifizierung zusätzlich zu den an die Kugeln gebundenen Primer noch PVK 510-534 (Konzentration wie die vier Kontrollen) enthalten. Die Intensität der Filmschwärzung mittels Autoradiographie liegt zwischen der von Spur 1 und Spur 6 und ist somit deutlich stärker als im Ansatz ohne zusätzlichen Primer (Spur 5).

Überprüfung der RT-PCR unter Laborbedingungen und an Umweltproben

Es werden drei Ansätze untersucht, zwei als Kontrolle (RNA in bidest. Wasser, RNA mit bidest. Wasser und mit Ultraschall behandelt) und eine Abwasserprobe, der RNA zugesetzt und die mit Ultraschall für 3 min behandelt wurde. Der Hybridisierungsmix enthält RNA, RNase-Inhibitor, 1x LiCl Puffer und PVK Biotin (A)₂₀ 510-534. Die Reaktionszeit beträgt 3 Stunden bei 65°C. Die Hybridisierungsmixe werden zu den gewaschenen Streptavidin Dynabeads gegeben und für eine Stunde unter langsamen Rollen bei Raumtemperatur inkubiert. Es findet keine Abkopplung von den Dynabeads statt, jedoch wird zusätzlich PVK 510-534 dem RT-PCR System zugeführt.



Abb. 34: Autoradiographie des Versuchs, RNA-Transkripte unter Umweltwasserbedingungen erfolgreich mittels PCR nachzuweisen. RNasen sollen durch die Zugabe von RNase-Inhibitor in ihrer Aktivität unterdrückt werden und das System auf das Wirken von Inhibitoren untersucht werden.

Als positive PCR Kontrolle wird RNA in bidest. Wasser eingesetzt (Spur 1). Spur 3 enthält eine weitere positive PCR Kontrolle mit bidest. Wasser, jedoch wird die Probe wie auch das Abwasser (Spur 2) mit Ultraschall behandelt. Spur 4 enthält die negative PCR Kontrolle, die anstatt Template Wasser enthält.

Bis auf Spur 4 können pro Spur ein deutliches positives PCR-Signal detektiert werden. Alle drei Signale liegen auf der selben Höhe und haben auch die gleiche Intensität. Ebenfalls schwach erkennbar ist bei Spur 1-3 eine schwache Bande, die etwas über den anderen PCR Signalen liegt.

5.6. Anwendungsbeispiele mit Proben aus dem Werbelin See einmal mit Dynabeads, aber auch mittels der QIAGEN Methode

Die Enteroviren werden aus den Umweltproben mit Streptavidin Dynabeads (Indirect capture) und mit dem QIAGEN Kit isoliert. Es werden parallel fünf Proben (Standort C vom 23.9.02, Spur 4; B vom 7.10.02 und 14.10.02, Spur 5 und 6; Standort A vom 7.1.03 und 3.3.03, Spur 7 und 8) auf das Vorhandensein von Enteroviren untersucht. Die Hybridisierungsbedingungen für die Ansätze mit Dynabeads können der Versuchsvorschrift 4.6., für die QIAGEN Proben der Versuchsvorschrift 4.7. entnommen werden. Von den Eluierungsmixen werden 5 µl, für die mit Dynabeads aufgearbeiteten Proben zusätzlich 10 µl und 20 µl für die Reverse Transkription eingesetzt.

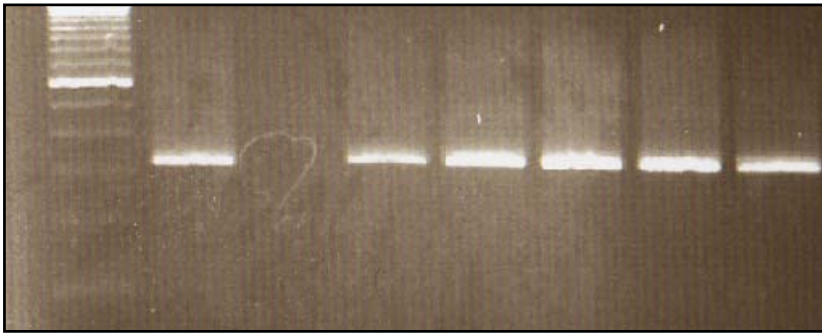


Abb. 35: Gelelektrophorese der nested PCR Produkte nach einer Nukleinsäureisolierung mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit. Spur 1 enthält den Längenmarker mit einer Größe von 100 Basenpaaren je Teilstrich. Spur 2 ist die positive PCR Kontrolle (Polio1), Spur 3 die negative PCR Kontrolle, die Wasser enthält. In den Laufspuren 4-8 sind die Umweltproben zu finden.

Unter UV-Licht erkennt man sowohl bei der positiven Kontrolle als auch bei den Proben eine Bande, die alle auf der Längenmarkerhöhe von 321 Nukleotide liegen. Die Intensität der sechs Signale ist in etwa gleich stark. Die negative Kontrolle ist negativ.

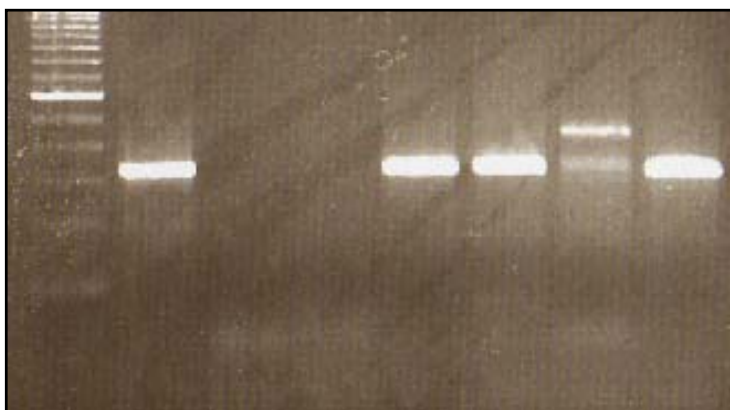


Abb. 36: Gelelektrophorese der nested PCR Produkte nach einer Nukleinsäureisolierung mit den Streptavidin Dynabeads mittels indirektem Einfang. Für die Reverse Transkriptase wurden 5 μ l des Eluates eingesetzt. Spur 1 enthält den Längenmarker mit einer Größe von 100 Basenpaaren je Teilstrich. Spur 2 ist die positive PCR Kontrolle (Polio1), Spur 3 die negative PCR Kontrolle, die Wasser enthält. In den Laufspuren 4-8 sind die Umweltproben zu finden.

Unter UV-Licht erkennt man sowohl bei der positiven Kontrolle als auch bei den Proben in den Laufspuren 5-8 eine Bande, die alle auf der Längenmarkerhöhe von 321 Nukleotide liegen. Zusätzlich enthält das Produkt aus Spur 7 (Standort A vom 7.1.03) noch eine weitere Bande, die bei etwa 420 Nukleotiden liegt. Die Intensität der Banden von Spur 5, 6 und 8 ist etwa gleich stark wie die Kontrolle mit Polioviren, die Doppelbande in Spur 7 ist jedoch deutlich geringer als die anderen. Die negative Kontrolle sowie die Probe in Spur 4 (Standort C vom 7.10.02) sind beide eindeutig negativ.

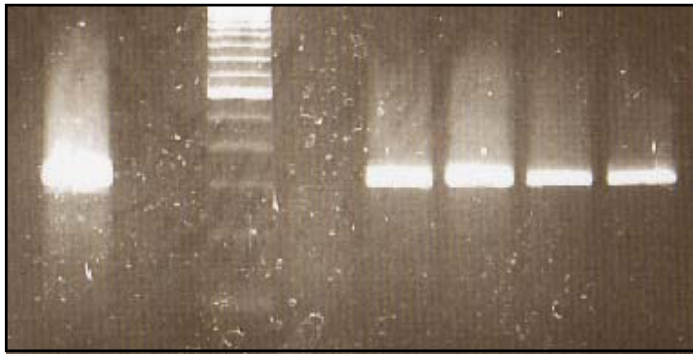


Abb. 37: Gelelektrophorese der nested PCR Produkte nach einer Nukleinsäureisolierung mit den Streptavidin Dynabeads mittels indirektem Einfang. Für die Reverse Transkriptase wurden 10 μ l des Eluates eingesetzt. Spur 1 enthält die positive PCR Kontrolle (Polio1), Spur 2 ist die negative PCR Kontrolle, die Wasser enthält, Spur 3 enthält den Längenmarker mit einer Größe von 100 Basenpaaren je Teilstrich. In den Laufspuren 4-8 sind die Umweltproben zu finden.

Unter UV-Licht erkennt man sowohl bei der positiven Kontrolle als auch bei den Proben in den Laufspuren 5-8 eine Bande, die alle auf der Längenmarkerhöhe von 321 Nukleotide liegen. Die Intensität der Banden der Laufspuren 7- 8 ist untereinander etwa gleich stark, jedoch nicht so intensiv wie die Kontrolle mit Polioviren. Die negative Kontrolle sowie die Probe in Spur 4 (Standort C vom 7.10.02) sind beide eindeutig negativ.

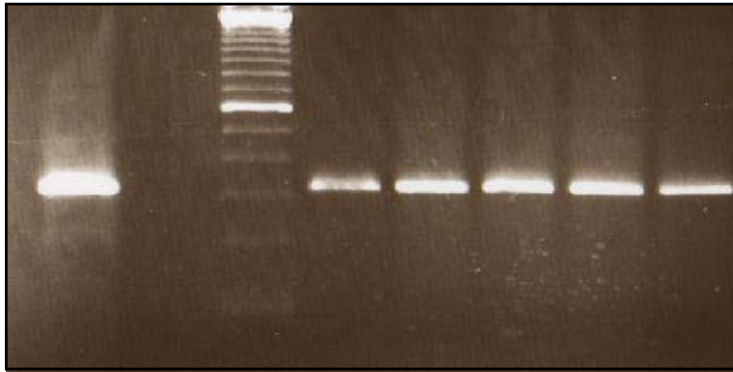


Abb. 38: Gelelektrophorese der nested PCR Produkte nach einer Nukleinsäureisolierung mit den Streptavidin Dynabeads mittels indirektem Einfang. Für die Reverse Transkriptase wurden 20 μ l des Eluates eingesetzt. Spur 1 ist die positive PCR Kontrolle (Polio1), Spur 2 die negative PCR Kontrolle, die Wasser enthält Spur 3. enthält den Längenmarker mit einer Größe von 100 Basenpaaren je Teilstrich. In den Laufspuren 4-8 sind die Umweltproben zu finden.

Man erhält sowohl bei der positiven Kontrolle als auch bei den Proben eine Bande, die alle auf der Höhe von 321 Nukleotide liegen. Die Intensität der Signale 4 und 8, sowie von 5-7 ist in etwa gleich stark. Es gibt keine Bande in Spur 2 (Wasser).

5.7. Nachweis von Adenoviren, Astroviren, Enteroviren, HAV, Noroviren und Rotaviren A mittels RT-PCR

Während des Untersuchungszeitraums von Ende September 2002 bis Mitte Dezember 2004 werden 100 Proben an der Stelle A (vor dem Klärwerk), 96 an der Stelle B (nach der Pipeline), 92 an der Stelle C (Westufer Werbeliner See) und 39 an der Stelle X (vor dem Klärwerk) auf das Vorkommen von gastroenteralen Viren (Adenoviren AdV, Astroviren AstV, Enteroviren EntV, Hepatitis A HAV, Noroviren NoV und Rotaviren A RoV) untersucht.

Tab 1. Übersicht über die Verteilung der PCR positiven Proben auf den gesamten Untersuchungszeitraum

	X	A	B	C
AdV	69	19	1	0
AstV	80	45	23	27
EntV	85	64	22	15
HAV	15	17	2	2
NV	64	53	11	16
RoV	10	24	1	5

69 % der Klärwerkszulaufproben und 19% der Klärwerksablaufproben können in der nested PCR als Adenovirus positive nachgewiesen werden, einmal auch am Ende der Pipeline (B). Die Gesamtverteilung liegt an dieser Untersuchungsstelle bei 1%. Im See selbst können keine AdV mittels nested PCR nachgewiesen werden (Tab. 1). Ein Überblick über die Verteilung pro Untersuchungsquartal, kann der Abbildung 39 entnommen werden.

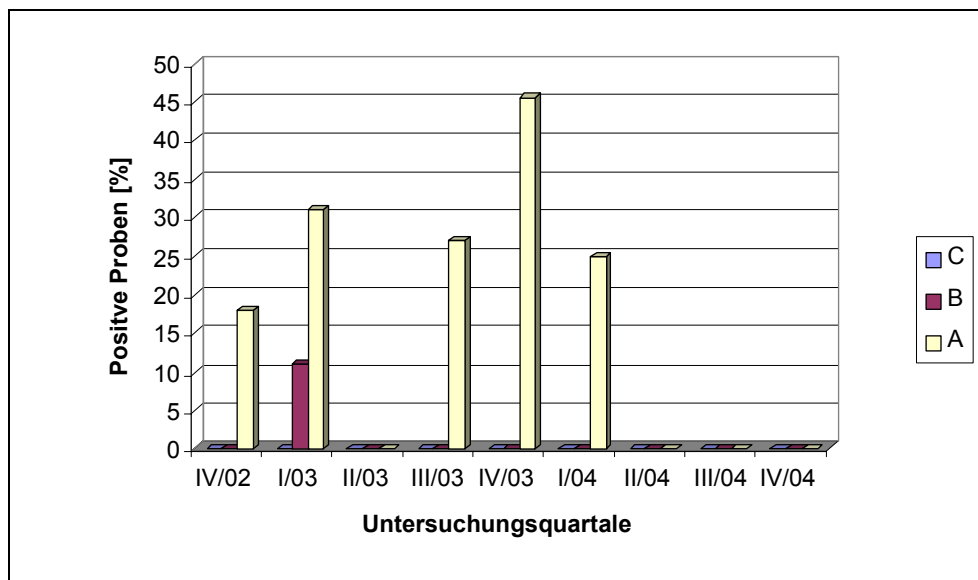


Abb. 39: Verteilung der PCR positiven AdV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 27 von 39 Proben in der nested PCR positiv.

Dabei unberücksichtigt bleiben die positiven Ergebnisse des Standorts X. Die hauptsächliche Verteilung der positiven Untersuchungsergebnisse umfassen das vierte und erste Quartal des jeweiligen Jahres.

Noroviren können zu 64% in den ungeklärten Abwasserproben gefunden werden. Nach der Kläranlage sind noch 53% der Proben in der nested PCR als Noroviren positiv. Im Laufe der Untersuchungsstrecke sinkt die Detektierbarkeit auf 11% am Standort B und 16% am östlichen Ufer des Sees (Tab. 1).

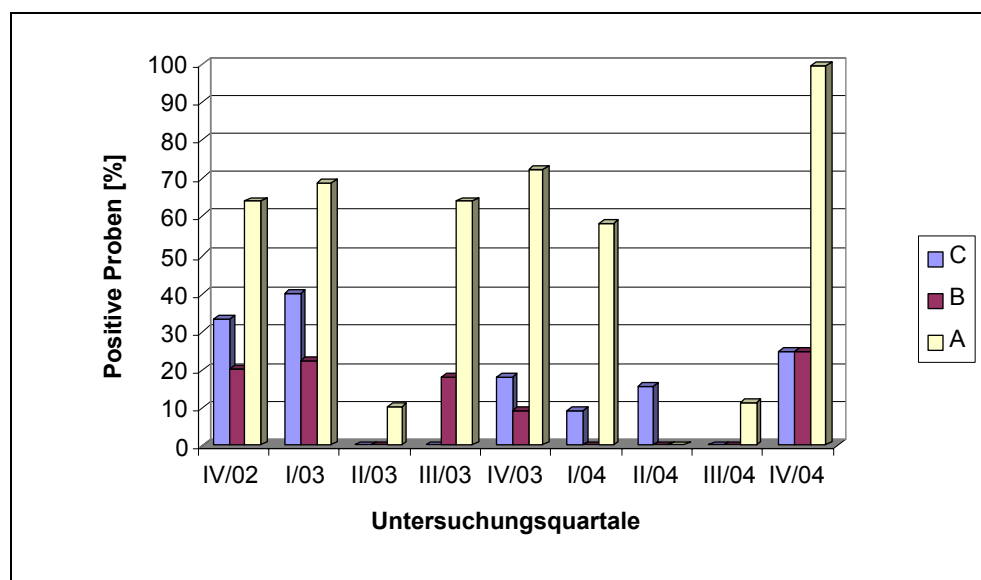


Abbildung 40: Verteilung der PCR positiven NV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 25 von 39 Proben in der nested PCR positiv.

Eine deutliche Verteilung der positiven Proben bezogen auf die Untersuchungsmonate zur Festlegung einer möglichen Saisonalität zeigt Abbildung 41.

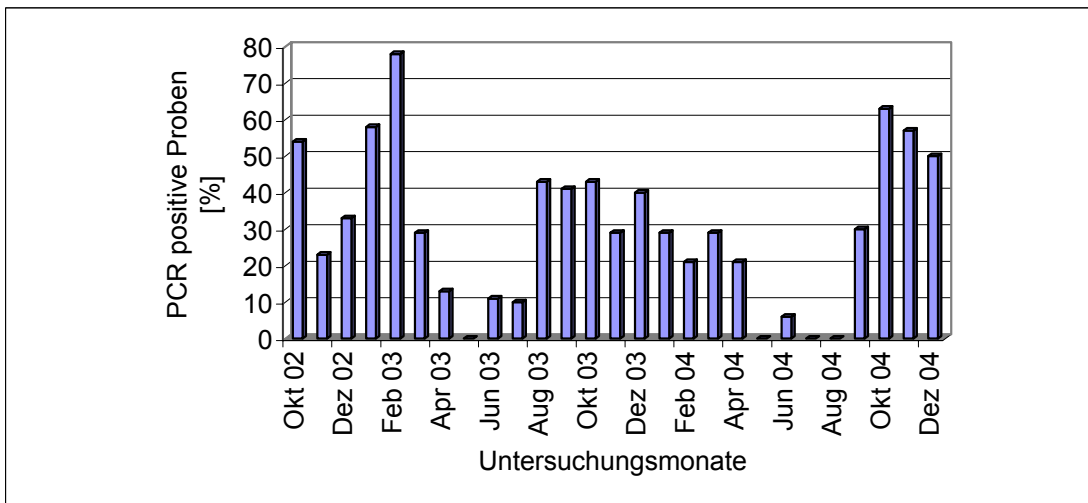


Abb. 41: Saisonales Auftreten von Noroviren im Laufe des Untersuchungszeitraums. Die gesamte Zahl der NoV positiven PCR Ergebnisse von allen vier Standorten wird für jeden Untersuchungsmonat betrachtet.

Man beobachtet einen deutlichen Anstieg der Norovirus positiven Ereignisse in den Herbst und Wintermonaten. Besonders im ersten Quartal 2003 als auch im vierten Quartal ist die Anzahl an positiven Proben besonders stark, in den zweiten Quartalen hingegen findet man sehr wenige Noroviren.

Enteroviren werden in 33 von 39 Proben im ungeklärtem Zulauf gefunden. Nach der Kläranlage können an den anderen Standorten zwischen 64% und bis zu 15% an EntV positiven PCR Proben gefunden werden (Tabelle 1). Die quartalsmäßige Verteilung der positiven Proben auf den Untersuchungszeitraum kann der Abbildung 42 entnommen werden.

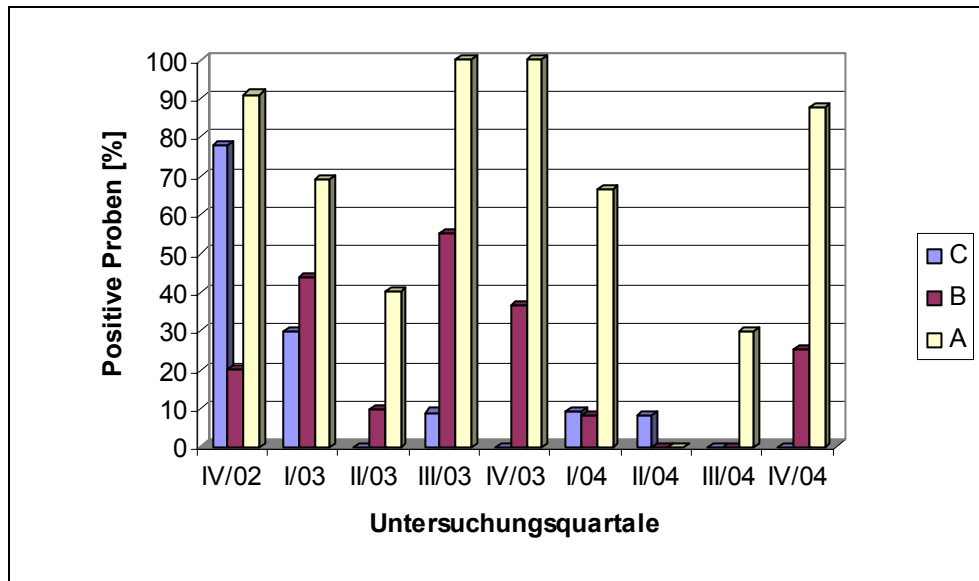


Abbildung 42: Verteilung der PCR positiven EntV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 33 von 39 Proben in der nested PCR positiv.

Über diesen Zeitraum hinweg können an allen Untersuchungsstandorten positive Proben nachgewiesen werden. Die größte Zahl dieser Proben ist in dieser Darstellung im Klärwerksablauf während der dritten und vierten Quartale, also in den Herbst- und Wintermonaten zu finden.

Astroviren können am Klärwerksablauf im Verlauf der Beprobung in 32 von 39 Fällen mittels nested PCR detektiert werden. Dies entspricht eine Nachweisbarkeit von 80%. Nach der Aufbereitung im Klärwerk lag die Zahl der nachzuweisenden AstV haltigen Proben zwischen 45-22% (Tabelle 1). Eine genaue Verteilung der positiven Proben über die Untersuchungsquartale und ihrem saisonalen Auftreten kann der Abbildung 43 entnommen werden.

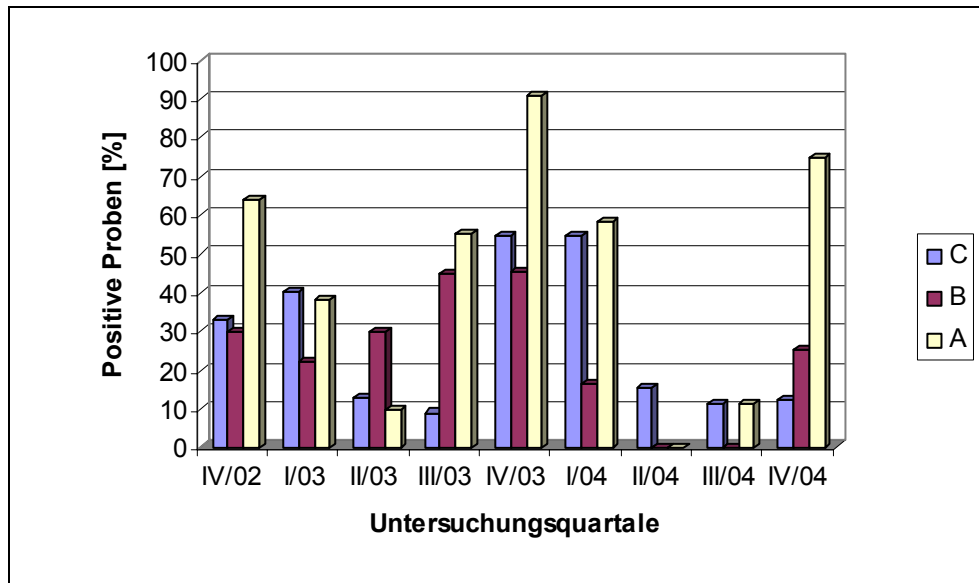


Abb. 43: Verteilung der PCR positiven AstV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 7 von 39 Proben in der nested PCR negativ

Es ist festzustellen, daß AstV in der Regel immer an mindestens zwei der drei Untersuchungsstellen A, B und C nachweisbar sind. Die höchste Nachweismöglichkeit findet man nach dem Klärwerk, wobei die meisten positiven Proben in den vierten Quartalen 2002, 2003 und 2004 auffindbar sind.

Hepatitis A konnte im ungeklärtem Abwasser zu 15% nachgewiesen werden. Im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraums waren an den verschiedenen Standorten zwischen 17-2% aller Proben positiv. Die genaue Aufstellung kann der Tabelle 1 entnommen werden. Es ist aber ersichtlich, daß die große Zahl der HAV positiven Proben im Klärwerksabfluß A detektiert werden.

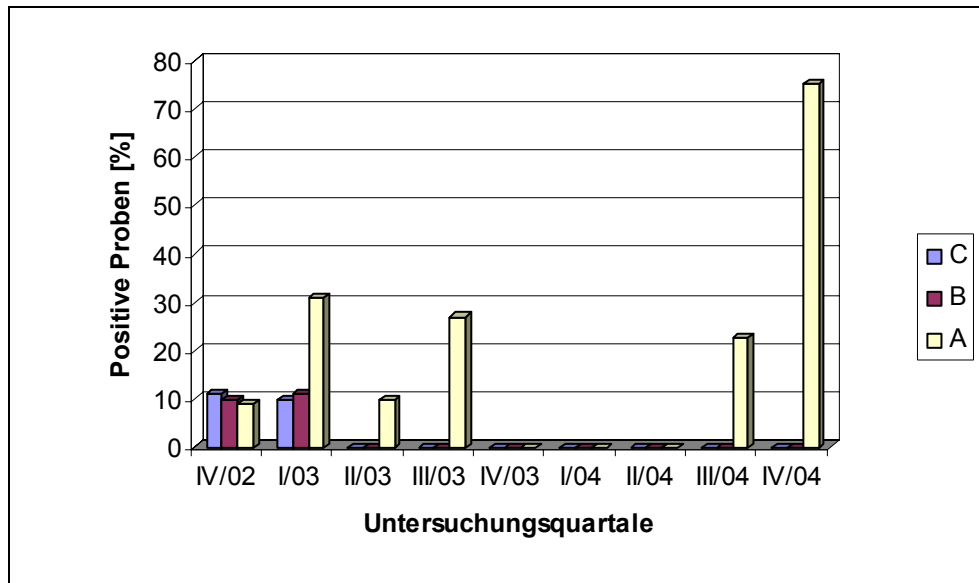


Abb. 44: Verteilung der PCR positiven HAV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 33 von 39 Proben in der nested PCR negativ

Vom vierten Quartal 2002 bis zum dritten Quartal 2003 können PCR positive Proben gefunden werden, wobei in den Herbstmonaten 2002 und in den Wintermonaten 2003 alle drei Untersuchungsstellen vertreten sind. Vom vierten Quartal des Jahres 2003 bis zum 2. Quartal 2004 waren alle untersuchten Proben negativ. Im 3. Quartal 2003 waren drei Proben in der nested PCR positiv, im vierten Quartal 2004 steigt die Zahl der HAV positiven Proben auf 7, sechs davon am Standort A, eine am Punkt X.

Rotaviren können nur in wenigen Proben detektiert werden. Insgesamt beträgt die Verteilung der nachgewiesenen Proben nach einer Aufreinigung im Klärwerk zwischen 24 am Klärwerksausgang und 1% bzw. 5% in Fließrichtung auf den See. Am Klärwerkszulauf sind 10% aller genommenen Proben positiv auf RoV getestet worden (Tabelle 1). Die saisonale Verteilung in den Untersuchungsquartalen kann Abbildung 45 entnommen werden.

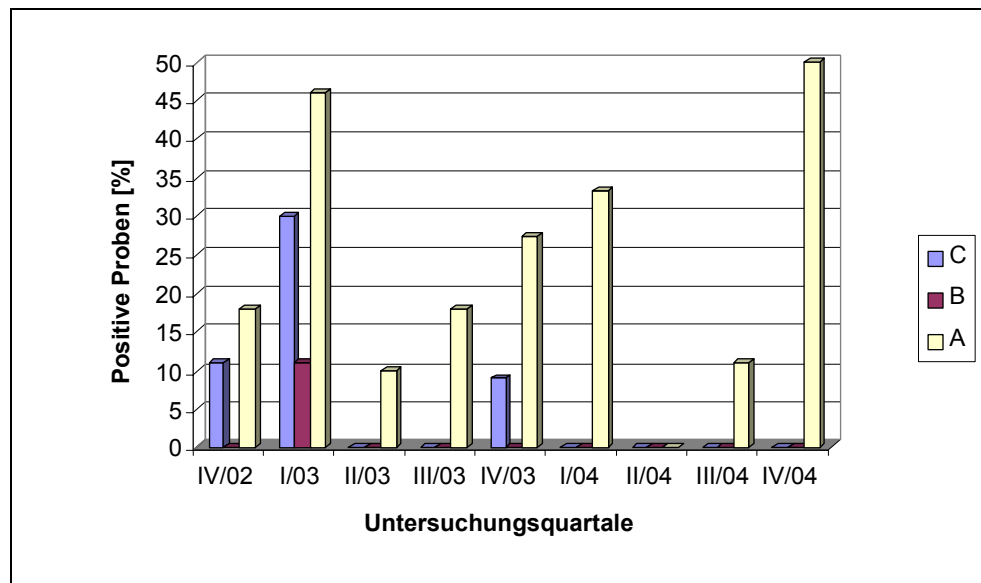


Abb. 45: Verteilung der PCR positiven RoV Proben über den Untersuchungszeitraum. Am Standort X waren 4 von 39 Proben in der nested PCR positiv.

Man findet eine saisonale Verteilung der RoV während der Spätherbst- und Wintermonate, vereinzelter im zweiten oder dritten Quartal. Wie Tabelle 1 zeigt, wird die größte Zahl an RoV an der Stelle A nachgewiesen, in drei verschiedenen Quartalen aber auch im See und nur einmal nach der Pipeline (B).

5.8. Quantitative Bestimmung von EntV, AstV und NoV Genomen

Eine Auswahl an Proben aus dem Zeitraum vom 23.9.02 bis zum 16.12.04 wird mittels der quantitativen real-time PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2-4 zusammengestellt worden und beinhalten neben der Anzahl der positiven und negativen Proben der TaqMan Ansätze auch die durchschnittliche Viruslast pro Liter von nicht konzentrierten Wasserproben an den jeweiligen Standorten.

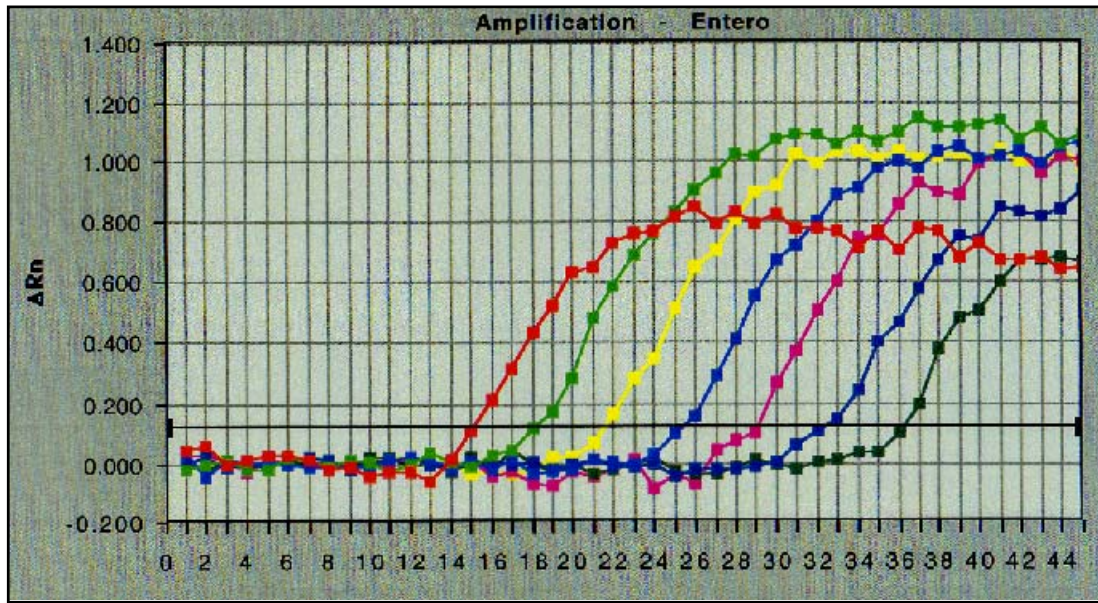


Abb. 46: Überblick über eine EntV-Standartkurve und den dazugehörigen Ct-Werten. Als Standart werden verschiedene Konzentrationen an Echo 7 eingesetzt.

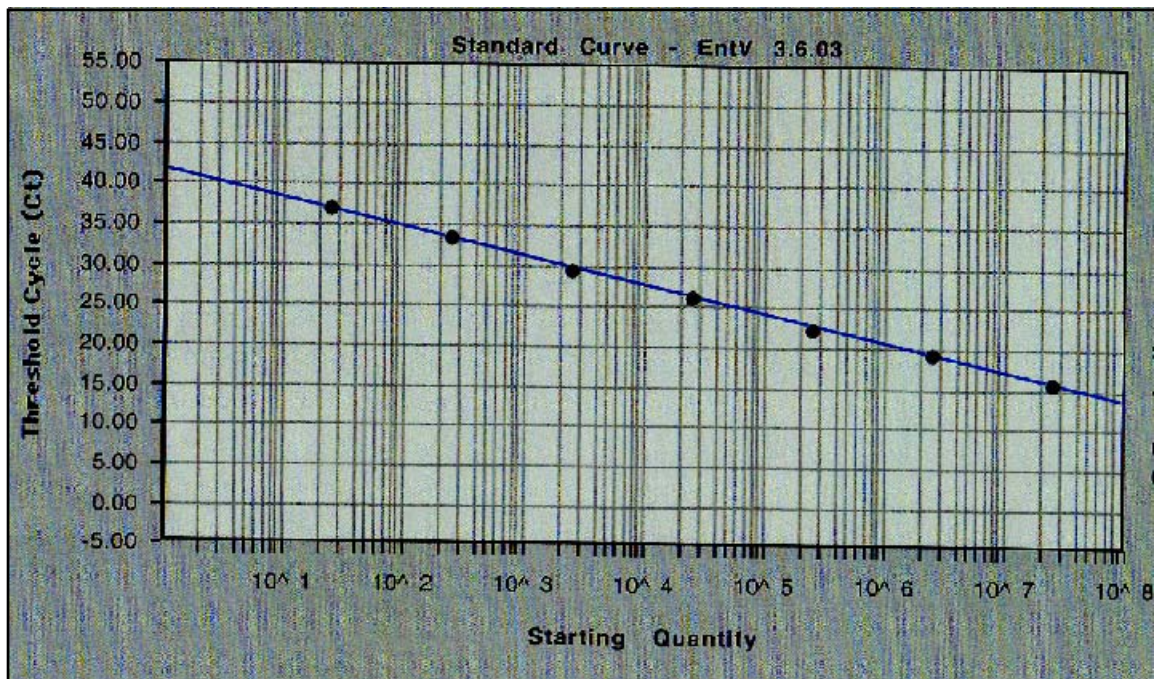


Abb. 47: Aus der EntV-Standartkurve resultierende Eichkurve mit Echo 7 Konzentrationen von $2,5 \times 10^7$; $2,5 \times 10^6$; $2,5 \times 10^5$; $2,5 \times 10^4$ und $2,5 \times 10^3$.

Für EntV kann eine durchschnittliche Viruslast zwischen $1,06 \times 10^5$ und $6,11 \times 10^2$ Genomäquivalente/l festgestellt werden (Tab. 2). Die Anzahl der untersuchten, in der nested PCR bereits positiven Proben, beträgt 126. Von diesen Proben sind 87 negativ.

Tab 2: Übersicht über die Ergebnisse des Enterovirus TaqMan

	Positive Proben	Negative Proben	Durchschnittliche Viruslast [gen.equ./l]
Klärwerkszulauf X	17	12	$1,06 \times E+5$
Klärwerksablauf A	22	45	$7,43 \times E+4$
Ende der Pipeline B	1	17	$6,11 \times E+2$
Seeufer C	3	13	$9,41 \times E+3$

Für AstV kann eine durchschnittliche Viruslast zwischen $6,67 \times 10^7$ und $4,27 \times 10^2$ Genomäquivalente pro Liter festgestellt werden (Tab. 3). Die Zahl der mittels TaqMan untersuchten Proben beträgt 65, wobei 23 Proben nach einer Amplifikation im TaqMan unterhalb der Nachweisgrenze liegen und daher mit 0 bewertet werden.

Tab 3: Übersicht über die Ergebnisse vom Astrovirus TaqMan

	Positive Proben	Negative Proben	Durchschnittliche Viruslast [gen.equ./l]
Klärwerkszulauf X	16	0	$6,67 \times E+7$
Klärwerksablauf A	19	4	$6,85 \times E+4$
Ende der Pipeline B	5	6	$2,85 \times E+3$
Seeufer C	2	13	$4,27 \times E+2$

Für NoV kann eine durchschnittliche Viruslast zwischen $2,71 \times 10^6$ und $1,38 \times 10^4$ Genomäquivalente pro Liter festgestellt werden (Tab. 4). Die Anzahl der untersuchten, in der nested PCR bereits positiven Proben, beträgt 66. Von diesen Proben sind 17 in der real-time PCR negativ.

Tab 4: Übersicht über die Ergebnisse vom Norovirus TaqMan

	Positive Proben	Negative Proben	Durchschnittliche Viruslast [gen.equ./l]
Klärwerkszulauf X	10	4	2,71 x E+6
Klärwerksablauf A	25	2	2,27 x E+5
Ende der Pipeline B	9	4	1,38 x E+4
Seeufer C	5	7	1,67 x E+4

5.9. Sequenzanalyse

Nested PCR Produkte von AdV, NoV, EntV, AstV, HAV und RoV werden mit dem inneren PCR-Primer und dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Mix von Perkin Elmer ansequenziert.

Für Adenoviren werden 37 Proben über ein Stück von ca. 250 Nukleotiden im Hexon sequenziert. Alle Isolate können als Subgenus F AdV klassifiziert werden, der Abgleich mit der Gendatenbank weist in allen Fällen auf AdV Serotyp 41 hin.

Es werden 69 Proben, die in der nested PCR als Noroviren positiv klassifiziert wurden, über ein Stück von ca. 280 Nukleotiden in der ORF1 sequenziert und mit der Genbank abgeglichen. Detektiert werden können sowohl Vertreter der Genogruppe I als auch II. Für die Genogruppe I werden folgende Genotypen nachgewiesen: Southampton-like (16 Isolate), Norwalk-like (10 Isolate), für die Genogruppe II Grimsby-like (36 Isolate). Bei elf dieser 36 Isolate handelt es sich um die Variante GGII.4/ Jamboree. Des weiteren findet man Melksham (ein Isolat), Leeds (drei Isolate) und Hilversum (drei Isolate) im Abwasser. Ein Stammbaum, in dem ein Teil der gefundenen Sequenzen zusammengefaßt ist, kann dem Anhang unter 10.4. entnommen werden.

In der 5' NCR werden im gesamten Untersuchungszeitraum eine Auswahl von 60 der erhaltenen Amplifikate über 280 Nukleotide sequenziert und eindeutig Enterovirus-Sequenzen zugeordnet (siehe auch Sequenzen im Anhang unter 10.4.). Dies schließt neben Coxsackieviren A, auch Echoviren 11 und andere ein.

Eine Auswahl von 57 Proben werden in der ORF2 über 360 Nukleotide sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen mit denen der Genbank ergibt für 38 Proben AstV Serotyp 1 (typische Sequenz siehe Anhang unter 10.4.), für 12 Proben Serotyp 4 oder 8, für 5 Proben Serotyp 2 und für 2 Proben Serotyp 6.

Für die Sequenzanalyse von HAV werden 13 Proben ausgewählt. Alle werden in der VP3/1 junction region über einen Bereich von 200 Nukleotide, eine zusätzlich in der VP1/2a junction region über einen Bereich von 326 Nukleotide sequenziert. Vier können dabei als Genotyp IA, neun als IB nachgewiesen werden, wobei u.a. für eine Wasserprobe (entnommen am Standort X am 6.9.04) eine Sequenzidentität zu Sequenzdaten analysiert wird, die im Kontext eines HAV Outbreak unter deutschen Urlaubern aus Ägypten im Sommer 2004 steht.

Eine Sequenzanalyse erfolgt für RoV bei neun Proben in der VP6 Region. Sequenziert werden Amplifikate von einer Länge von ca. 140 Nukleotide, klassifiziert als Humane Rotaviren Typ A. Drei dieser Proben werden zusätzlich noch einmal in der VP7-Region über einen Bereich von 356 Nukleotide sequenziert. Der Abgleich mit der Genbank ergibt je einmal eine Typisierung von G1-, G2- und G9-RoV.

5.10. Virusanzucht auf Zellkulturen

Im Verlauf des Untersuchungszeitraums wird versucht, bei 26 Proben, die in der nested PCR Enterovirus positiv sind, eine Virusanzucht auf Zellen durchzuführen. Dafür werden drei Proben vom Standort C, neun Proben vom Standort B und 14 Proben vom Klärwerksablauf (A) ausgesucht. Lediglich drei der 26 Proben lassen sich auf den Zellen anzüchten. Alle diese Proben stammen von der Untersuchungsstelle nach der Pipeline (Standort B). Die Serotypbestimmung ergibt Echovirus 11 zweimal und eine Mischprobe, die sowohl Echovirus 11 als auch Echovirus 6 enthält.