

## 6. Diskussion

Es soll mit Hilfe von zwei verschiedenen 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.

### 6.1. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die 5'NCR Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534 und PVK (A)<sub>20</sub> 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)<sub>25</sub> Dynabeads

Durch die Inkubierung der Dynabeads mit unterschiedlichen Mengen an nicht markierten und einer für alle gleiche Menge an radioaktiv markierten Primer können Aussagen zu der Bindungskapazität getroffen werden. Da die Konzentration der radioaktiv markierten Primer für alle Ansätze gleich bleibt, kann gewährleistet werden, daß in allen Ansätzen sich auch die gleiche Zahl an cpm befindet, so daß ein Vergleich untereinander möglich ist. Es kann gezeigt werden, daß ab einer Gesamtkonzentration von 5 pmol Primer im Ansatz mit 90% das höchst mögliche Bindungsvermögen der Dynabeads gemessen wird. Werden 11 pmol eingesetzt, so liegt die Kurve immerhin noch bei 80%. Obwohl für die weiteren Versuche 5 pmol an Primer als höchst mögliche Konzentration veranschlagt werden, so liegt die eigentliche Grenze wohl doch eher zwischen 8-10 pmol, so daß die Gefahr eines störenden und fehlerhaften Primerüberschusses nicht gegeben ist und vernachlässigt werden kann.

Bei einer Hybridisierung der 5'NCR Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534 und PVK (A)<sub>20</sub> 510-534 an Streptavidin und Oligo (dT)<sub>25</sub> Dynabeads kann für beide Systeme bereits nach 5 Minuten eine Bindung von über 80% beobachtet werden, daher ist auch die Aktivität der untersuchten Überstände im LSC sehr gering ist. Es stellt sich daher die Frage, wieso knapp 20% nicht mittels Dynabeads aus dem System entfernt werden können, obwohl die Kapazität der Dynabeads noch lange nicht erreicht ist. Durch eine Markierung mit ddATP kann eine mehrfach Phosphorylierung und damit

auftretende Strangbrüche bei den Primern nahezu, laut Hersteller, ausgeschlossen werden. Es hat sich gezeigt, daß es vor allem bei den mit Biotin gekoppelten Primern zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Je nach Herstellerfirma kann die Bindung zwischen 50 und 85% betragen, so daß die Vermutung nahe liegt, daß es sich bei den nicht bindungsfähigen Primern um solche handelt, deren Bindungsgruppe (Biotin aber auch poly dT) nicht vorhanden ist. Somit können sie auch nicht aus dem System mittels Dynabeads gefangen werden.

Bei der Überprüfung des Kopplungsvermögens der Primer in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an LiCl zeigt sich, daß bei Ansätzen ohne bzw. mit einer geringeren Salzkonzentration auch das Bindungsvermögen der Dynabeads deutlich geringer ist als bei solchen Proben, die eine hohe Salzkonzentration haben. Während ab einer 1000 mM Konzentration an LiCl mit 88% das höchst mögliche Bindungsvermögen gemessen wird, binden bei einer Konzentration von 0% LiCl lediglich 60% an die Dynabeads. Wie wichtig LiCl für die Reaktion ist, zeigt sich in der Stabilität der RNA während der Hybridisierungsbedingungen von drei Stunden bei 65°C (data not shown). Anhand von unterschiedlich konzentrierten Versuchsansätzen mit LiCl, KCl und NaCl zeigt sich in den Autoradiographien, daß bei diesen für die RNA harschen Bedingungen es im Falle von 1000 mM LiCl als Puffer zu keiner sichtbaren Degradationserscheinungen der RNA während der gesamten Reaktion kommt [50].

Dank dieser Erkenntnisse werden die 5'NCR Primer unter den oben genannten Hybridisierungsbedingungen mit RNA-Transkripten an die jeweiligen Dynabeads mittels indirektem und direktem Einfang gekoppelt. Dabei lassen sich für beide Verfahren eindeutige Aussagen treffen. Wie auch schon bei einer alleinigen Bindung von Primern an die Dynabeads, ist auch beim indirekten Einfang bereits nach 5 min die Kopplung zwischen den Primer-RNA-Hybriden mit den Dynabeads nahezu vollständig abgeschlossen. Anders hingegen beim direkten Einfang, bei dem dieser Punkt erst zwischen 60 und 120 min der Reaktionszeit annähernd erreicht wird. Werden durch den direkten Einfang bei beiden Dynabeads Sorten lediglich zwischen 11-13% erfolgreich gekoppelt und somit aus dem Überstand entfernt, liegt diese Zahl beim indirekten Einfang zwischen 50 (Dynabeads dT) und 75% (Streptavidin Dynabeads). Diese Aussage kann mittels Autoradiographie der Reaktionsüberstände vor und nach einer Hybridisierung mit den Dynabeads bestätigt werden [50]. Da, wie beschrieben, Fehlerquellen durch mehrfache Phosphorylierungen ausgeschlossen

werden können, zeigt die Möglichkeit einer Inkubierung dieser Überstände mit frischen Dynabeads keine nennenswerten Veränderung der Ergebnisse. Eine Überschreitung der Kapazität der Dynabeads durch die räumliche Ausrichtung der Primer-RNA-Hybride ist daher nicht gegeben. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß bei einem gewissen Teil durch sterische Hinderungen bezüglich der Lage der „catcher-Gruppen“ (Biotin oder dA) eine Kopplung mit den Dynabeads unterbunden ist [50]. Auch scheint daher die Bindung zwischen den Primern und der RNA separat im indirekten Einfang deutlich begünstigter zu sein, während der direkte Einfang deutlich durch die Konfigurationen innerhalb der RNA erschwert wird. Ferner kann gezeigt werden, daß mit der Zunahme des Reaktionsvolumens die Effizienz des indirekten Einfangs deutlich abnimmt. Dies war letztlich zu erwarten, da die Wahrscheinlichkeit, daß es zu einer Hybridisierung zwischen RNA und Primer kommt, in einem geringem Volumen höher ist als in einem größerem Volumen. Es sollte daher darauf geachtet werden, daß das Volumen der zukünftigen Ansätze möglichst nicht größer ist als 500 µl.

Bei der Lysierung von Poliovirus Sabin 1 unter den oben beschriebenen Bedingungen kann gezeigt werden, daß auf die Zugabe von Proteinkinase K Lösung, die meistens für eine Extraktion von Nukleinsäuren in Umweltproben eingesetzt wird, verzichtet werden kann. Dies ist von Vorteil, weil ansonsten die Gefahr nicht ausgeschlossen werden kann, daß ohne die Entfernung es zu einer Schädigung des Streptavidins kommt. Die festgelegten Standardbedingungen (Salzkonzentration, Temperatur und Zeit) sind somit ausreichend für eine Lysierung von Virionen und können demnach für weitere Versuche eingesetzt werden.

## **6.2. Festlegung der allgemeinen Bedingungen für die drei Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534, PVK Biotin (A)<sub>31</sub> 510-534 und PVK Biotin (A)<sub>45</sub> 510-534 an Streptavidin Dynabeads, um durch einen längeren Spacer die Effizienz des direkten Einfangs zu verbessern**

Bei einer Hybridisierung der 5'NCR Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534, PVK Biotin (A)<sub>31</sub> 510-534 und PVK Biotin (A)<sub>45</sub> 510-534 an Streptavidin Dynabeads kann nach 5 Minuten eine Bindung zwischen 80% (PVK Biotin (A)<sub>45</sub> 510-534 ) und 95% (PVK

Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534) beobachtet werden. Das Bindungsvermögen bei dem Primer PVK Biotin (A)<sub>31</sub> 510-534 liegt bei 90%. Dieses hohe Bindungsvermögen resultiert aus der Differenz zwischen der gemessenen Gesamtzahl der cpm, die eingesetzt werden und der Messung der cpm, welche noch in den Überständen nach einer Inkubierung mit den Dynabeads vorliegen. Führt man mit diesen Primern den indirekten Einfang durch, so werden PVK Biotin (A)<sub>45</sub> 510-534-RNA-Hybride zu 45% an die Dynabeads gebunden. Für die beiden anderen Hybridpaare liegt dieser Wert bei etwas weniger als 60%. Beim direkten Einfang, dessen Effizienz für PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534 bei etwa 11% liegt, steigt das Bindungsvermögen langsam und kann zwischen 12-13% für den Primer mit dem 45 und zwischen 15-16% für den Primer mit dem 31 Nukleotid langen Spacer angelegt werden. Es kann somit gezeigt werden, daß die Erhöhung der Spacerzahl zwischen der Zielsequenz des Primers und der Kopplungsgruppe für den indirekten Einfang keine, vielleicht bei einer zu großen Zahl sogar eine eher negative Wirkungen auf das Ergebnis zeigen, als mit dem Originalprimer aus 6.1. Beim direkten Einfang erhöht sich zwar die Effizienz der Bindung etwas, liegt aber durchaus noch im Fehlerbereich und muß daher vernachlässigt werden. Eine Minimierung der sterischen Hinderungen, die Ursache für die schlechte Bindungsbilanz des direkten Einfangs sind, können für die 5'NCR nicht erreicht werden.

### **6.3. Überprüfung und gegebenenfalls auch Festlegung der allgemeinen Bedingungen für andere Genomabschnitte auf dem Polio-Transkript anhand der Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534, PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 3431-3450, PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 4431-4450 und PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 7380-7400 an Streptavidin Dynabeads**

Es muß nun geprüft werden, ob die experimentell gewonnenen Ergebnisse für den Primerabschnitt in der 5'NCR auch in anderen Polio-Genomabschnitten ihre Gültigkeit besitzen. Um festzustellen, ob Kopplungen durch das Fehlen des catcher-Moleküls Biotin verhindert werden, werden die Biotin enthaltenen Primer zunächst mit Dynabeads inkubiert (Abb. 23, Abb. 27). Alle vier Primer aus den verschiedenen Regionen werden zu 95% gebunden, so daß dieser Aspekt für eine spätere Betrachtung unbedeutend ist. Führt man mit allen vier Primern den indirekten Einfang (Abb. 24, Abb. 28) bei 65°C für 3 Stunden durch, so werden nur zwischen 15-20%

der Primer-RNA-Hybride isoliert, während es beim Ansatz mit dem 5'NCR Primer ca. 65% im Durchschnitt sind. Dies zeigt, daß für jede Region des Poliovirus Genoms neue Hybridisierungsbedingungen postuliert und untersucht werden müssen, da sie nicht universell gültig sind [50]. Zu diesem Zweck werden unterschiedliche Temperaturen, chemische Zusätze und Reaktionszeiten ausgetestet. Läßt man den indirekten Einfang über Nacht bei 45°C (Abb. 25, Abb. 29) ablaufen, so isoliert man für die Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 7380-7400 und PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 3431-3450 in etwa zwischen 25-28% der ursprünglich eingesetzten Menge an RNA. Für den Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 4431-4450 hingegen sind es 60%. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Effizienz des indirekten Einfangs des 5'NCR Primers unter den Standardbedingungen bei 65°C für 3 Stunden. Gibt man zu einem Ansatz mit PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 7380-7400 noch 20% Formamid und inkubiert über Nacht bei 35°C im Heizblock, so verbessert sich das Isolierungsvermögen der Primer-RNA-Hybride auf 40% (Abb. 30). Formamid ist eine Substanz, welche die Reaktionstemperatur deutlich herab setzt. Eingesetzt wird sie u.a. bei der Hybridisierung der gebundenen Nukleinsäure auf der Membran mit einem radioaktiven Primer während des Southern Blots. Ob es darüber hinaus zu Stabilisierungserscheinungen der RNA kommt, kann hier in diesem Zusammenhang nicht wirklich beantwortet werden, darf aber vermutet werden.

Im Fall des direkten Einfangs zeigt sich jedoch, daß die Wahl eines anderen Genomabschnitts nicht immer zwangsläufig eine Verschlechterung der Isolierungsergebnisse zur Folge hat. Bei einer Hybridisierung von an Dynabeads gekoppelten Primer mit freier RNA über Nacht bei 45°C (Abb. 26) werden für den Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 4431-4450 50% der RNA an die Dynabeads gebunden, für PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 3431-3450 liegt dieser Wert bei nur 20%, ist aber somit jedoch höher als für den 5'NCR Primer PVK Biotin (A)<sub>20</sub> 510-534 (11%). Untersuchungen des direkten Einfangs mit dem Primer vom 3'Ende wurden nicht durchgeführt.

Im letzten Abschnitt erfolgt die Lyse von Poliovirus Sabin 1 Virionen unter Standardbedingungen mit dem 3' Primer PVK 7400-7424. An die Dynabeads vorher gekoppelt wird das Oligonukleotid Biotin (dG)<sub>10</sub> (dT)<sub>20</sub>, so daß der direkte Einfang zwischen dem Poly A-Schwanz der viralen RNA und dem dT dieses Oligonukleotids stattfindet. Messungen des Überstands im LSC aber auch die Autoradiographie ergibt, daß 60% der eingesetzten Virionen lysiert und aus dem Reaktionsansatz isoliert werden können. Bei den verbleibenden 40% handelt es sich um Hybride, die

aufgrund sterischer Hinderungen innerhalb der RNA nicht an die Dynabeads gebunden werden können [50]. Dies zeigt sich dadurch, daß auch eine Inkubierung mit frischen Dynabeads zu keiner nennenswerten Abnahme der gemessenen cpm im Reaktionsansatz mehr führt.

#### **6.4. Abkopplung der RNA-Transkripte von den Dynabeads**

Es kann gezeigt werden, daß je nach Inkubationszeit und Elutionsflüssigkeit an die Dynabeads gebundenen Primer-RNA-Hybride zwischen 3-60% wieder abgekoppelt werden können. Dabei werden für die Ansätze mit 10 mM Tris-HCl die schlechtesten, für die Ansätze mit 1x PCR Puffer die besten Werte erzielt. Untersucht man die Autoradiographie bezüglich Degradationserscheinungen der RNA so muß man im Vergleich mit der bei RT gelagerten RNA feststellen, daß bei einer Temperatur von 90°C alle Proben mit DEPC-Wasser und 1x PCR Puffer solche aufweisen. Eine Reduzierung der Temperatur ist jedoch nicht weiter möglich, da dann auch das prozentuale Abkoppeln der Hybride von den Dynabeads nur schlecht oder gar nicht mehr möglich ist (data not shown). Es wird daher eine Inkubierung mit 1x PCR-Puffer für 5 min bei 90°C für eine Abkopplung der Primer-RNA-Hybride von den Dynabeads als die möglichst RNA schonendste und ausreichende Bedingung betrachtet und auch eingesetzt.

#### **6.5. Überprüfung der Bedingungen mit einer im Anschluß durchgeführten PCR unter Laborbedingungen und an Umweltproben**

RNA positive Kontrollen, die sich frei in Lösung befinden werden besser mittels PCR amplifiziert als solche, die vorher an Dynabeads gebunden waren. Dies gilt vor allem für die Ansätze mit den niedrigen Konzentrationen, wobei eine PCR Amplifikation des Ansatzes mit  $10^0$  pmol unterhalb der Nachweisgrenze lag. Nimmt man die Aussagen aus dem Elutionsversuch dazu, so kann man dies mit der Tatsache begründen, daß lediglich 60% der eingesetzten Menge wieder abgelöst werden. Somit ist ein Ausfall der PCR durch das Erreichen der Nachweisgrenze nicht verwunderlich. Bei den Ansätzen mit den noch an die Dynabeads gebundenen Hybriden zeigt sich, daß ein gutes PCR Ergebnis durch die Zugabe einer zusätzlichen Menge an Primer erzielt wird. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß bei jedem Denaturierungsschritt nicht nur

die Bindung zwischen Primer und RNA, sondern auch zwischen Dynabeads und Primer gelöst werden. Beim Abkühlen der Temperatur für die weiteren beiden PCR Schritte wird die Bindung zwischen Dynabeads und Primer anscheinend bevorzugt, so daß sie für diesen Zyklus nur noch begrenzt frei zur Verfügung im Reaktionsansatz stehen. Da, wie bereits gezeigt, jedoch der direkte Einfang nur in sehr geringen Maße funktioniert, ist das PCR Ergebnis solcher Proben deutlich schlechter als bei einer Anwesenheit eines zusätzlichen, nicht koppelbaren Primers. Dieser kann folglich auch nicht mehr an die Dynabeads gebunden werden und unterliegt folglich auch nicht mehr dem sterischen Einfluß des direkten Einfangs.

Im zweiten Abschnitt wird geprüft, ob es unter den beschriebenen Bedingungen möglich ist, RNA aus Umweltwasser zu isolieren ohne, daß es zu einer Störung der PCR aufgrund anwesender Inhibitoren kommt. Vorherige Versuche haben gezeigt, daß dies zunächst nicht der Fall ist (data not shown), sondern Partikel im Reaktionsansatz verbleiben, die zu Inhibitionen führen. Um zu verhindern, daß die RNA im Abwasser durch dort befindliche RNasen abgebaut werden, wird RNase-Inhibitor dem Reaktionsmix beigefügt. Es hat sich gezeigt, daß dies nicht allein die Ursache für negative PCR Ergebnisse ist. Erst mit einer zusätzlichen Behandlung der Reaktionsansätze für 3 min mit Ultraschall findet eine störungsfreie Isolierung und Amplifizierung statt. Sowohl die beiden positiven Kontrollen in bidest. Wasser als auch der Reaktionsansatz mit Abwasser können nun detektiert werden und die Intensität der Signale ist bei allen gleich. Die Behandlung mit Ultraschall hat demnach auf die Struktur der viralen Nukleinsäure keinen Einfluß, so daß diese nicht beschädigt wird. Es kann also vermutet werden, daß ein Einfluß möglicherweise auf Schmutzpartikel und ihre inhibitorische Wirkung beschränkt ist. Dabei könnte es zu einem mechanischen Zerreiben dieser Stoffe kommen, so daß keine Gefahr mehr für die Dynabeads besteht, von diesen Rückständen so wirkungsvoll umschlossen zu werden, daß bereits der Isolierungsmechanismus gestört wird bzw. diese Substanzen trotz der verschiedenen Waschschriffe in das empfindliche RT-PCR-System gelangen.

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

Enteroviren werden aus fünf Umweltproben mit Streptavidin Dynabeads (Indirect capture) und mit dem QIAGEN Kit isoliert. Es kann gezeigt werden, daß mittels des QIAamp Viral RNA Mini Kits alle fünf Proben bei einem Templatevolumen von 5 µl für die RT-PCR positiv im Agarosegel (321 bp) nachgewiesen werden. Setzt man hingegen eine Isolierung mit Dynabeads ein, so sind bei gleichem Volumen nur vier der fünf amplifizierten Proben EntV positiv. Erst mit einem vervierfachen des eingesetzten RNA-Volumens sind alle fünf Ansätze eindeutig positiv. Es zeigt sich nun, daß mit Hilfe der QIAGEN-Methode, verglichen mit der Isolierung durch Dynabeads, weniger Substanz und Genome benötigt werden, um einen PCR Nachweis erfolgreich durchzuführen. Eine anschließende Sequenzierung aller Isolate weist in jedem Versuchsansatz zweimal auf Humane Echoviren und dreimal auf Vertreter der Gruppe Coxsackievirus A hin. Diesbezüglich können keine Unterschiede festgestellt werden.

Bei einer entsprechenden Konzentration der viralen RNA können Enteroviren durch Dynabeads erfolgreich isoliert werden. Allerdings wie im Abschnitt 6.3. bereits diskutiert, verändern sich die dafür benötigten Reaktionsbedingungen je nach der Genomregion des Enterovirus, der untersucht wird. Demnach müßten diese Bedingungen im einzelnen für jeden der anderen fünf enteralen Viren untersucht und festgelegt werden. Anders als bei der QIAGEN-Methode, wo am Ende der Isolierung die gesamte virale RNA aller im Abwasser enthaltenen Viren im Ansatz vorliegen, muß im schlimmsten Fall die Isolierung bei den Dynabeads in separaten Ansätzen stattfinden. Dies ist jedoch deutlich zeitaufwendiger (drei Stunden bis maximal über Nacht) als mit QIAGEN (30-60 min) und verbraucht auch mehr Ausgangssubstanz als letztere. Auch haben Versuche belegt, daß in der real-time PCR durch die Biotin-Moleküle der Primer oder einzelnen Polystyrolkugeln zu Störungen aufgrund von Verstärker- bzw. Quencheffekten kommen kann ( data not shown). Um dies zu vermeiden sollten die biotinhaltigen Primer möglichst aus dem System entfernt werden. Dies geschieht zwar durch eine Inkubierung mit frischen Beads zu 95%, es verbleibt jedoch ein, wenn auch kleiner, Prozentsatz im System. Aufgrund dieser Gesichtspunkte werden alle nachfolgenden 327 Wasserproben mit dem QIAGEN-Kit

auf das Vorkommen von enterale Viren mittels RT-PCR, AdV nur mittels PCR, untersucht.

### **6.7. Nachweis von Adenoviren, Astroviren, Enteroviren, Hepatitis A Viren, Noroviren und Rotaviren A mittels RT-PCR**

Über einen Zeitraum von zwei Jahren und vier Monaten werden wöchentlich Proben aus aufbereiteten Abwasser und zweimal monatlich aus Rohabwasser genommen und auf enterale Viren (AdV, AstV, EntV, HAV, NoV, RoV) mittels sensitiver und spezifischer PCR Methoden untersucht. Untersucht 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). Es kann festgestellt werden, daß die Zahl der positiv nachgewiesenen Proben im Seewasser (C) deutlich geringer ist als an der Entnahmestelle nach dem Klärwerk (A) (Tab. 1). Dies ist nicht verwunderlich, da allein der See wie beschrieben täglich mit 17000 m<sup>3</sup> Wasser aus der Neuen Luppe pro Tag geflutet wird. Dieses neu hinzugefügte Wasser trifft auf ca. 45 Mio m<sup>3</sup>, die sich im See befinden, so daß es zu einer deutlichen Verdünnung kommt. Ebenfalls nicht vernachlässigt werden darf die Tatsache, daß es durch die Prozesse der Anreicherung zu zusätzlichen Eliminierungs- und Inaktivierungsreaktionen kommt. Es kann außerdem gezeigt werden, daß am weiter entfernten Ort C entnommene Proben für Astro-, Noro- und Rotaviren häufiger in der nested PCR positiv sind als Proben am Ende der Pipeline (B). Eine Möglichkeit für dieses Phänomen ist die Anwesenheit von Stoffen oder Partikeln im Wasser, die zu den Inhibitoren gehören und zu einer Hemmung auf der Ebene der Reversen Transkription und/oder auf der PCR Ebene führen [51]. Je weiter daher die beprobte Stelle vom Klärwerk entfernt ist, desto kleiner ist die Konzentration an Inhibitoren und desto geringer muß daher auch die Hemmung sein. Kopecka [26] bestätigt ebenfalls, daß Anreicherungsprozesse von Viren nicht nur zu einer Konzentrierung der Virusgenome, sondern auch der Inhibitoren führen.

Für Noroviren beobachtet man eine Häufung des Nachweises in den Herbst- und Wintermonaten (Abb. 41, 42). Diese Beobachtung ist konform mit anderen Studien zum Norovirusnachweis in der humanen Population [43; 35]. Auch für Rotaviren kann ein solch verstärktes Auftreten während der Herbst- und Wintermonate beobachtet werden [11; 27]. Im zweiten Quartal, vor allem jedoch in den Sommermonaten, sank

die Zahl der positiven PCR Nachweise für NoV und RoV deutlich und belegt somit die üblichen Theorien über das Auftreten dieser beiden enteralen Viren. Überraschender Weise findet man weniger Rotaviren im Klärwerkszulauf (X) als am Ablauf (A) (Tab.1). Diese Tatsache ist schwer erklärbar. Es muß jedoch vermutet werden, daß das geringe Probenvolumen (50 ml im Gegenzug zu 5l bzw. 10l) wohl eine dieser Ursachen ist, die das Ergebnis nachhaltig beeinflussen. Ebenfalls möglich wäre eine besondere Anfälligkeit der benutzten RoV RT-PCR gegenüber Inhibitoren. Dies mag auch erklären, daß Untersuchungen in der VP7 Region nur sehr eingeschränkt möglich waren.

Enteroviren können im gesamten Verlauf des Jahres detektiert werden. Man beobachtet allerdings eine Häufung der PCR positiven Proben im vierten, zum Teil auch im dritten Quartal (Abb. 43). Im zweiten Quartal werden kaum oder gar keine Enteroviren gefunden. Dies scheint zunächst von der allgemeinen Literatur über Enteroviren abzuweichen, werden nämlich dort die Krankheitshäufungen den Sommermonaten zugeordnet. Eine Verschiebung dieser Saisonalität wurde jedoch schon beschrieben. Verstergaard [55] weist darauf hin, daß es in Dänemark bereits im Februar 2000 zu einem großen aseptischen Meningitis Outbreak, verursacht durch Enteroviren (Echovirus 30), kam. Da eine Infektion mit Enteroviren, wie im theoretischen Teil beschrieben, jedoch meist asymptomatisch verläuft, ist es sehr gut möglich, daß es zu Erkrankungen das ganze Jahr über kommt, diese jedoch meistens vom Arzt oder Patienten für grippale Infekte gehalten werden und daher nicht diagnostiziert werden.

Asteroviren können mittels PCR im gesamten Jahresverlauf und an allen Untersuchungsstellen nachgewiesen werden (Abb. 44). Aussagen über ein saisonales Auftreten können nicht gemacht werden, da AstV im Gegensatz zu RoV, NoV und HAV nicht meldepflichtig ist. Gofiti-Laroche [20] und sein Team jedoch postulieren eine Zunahme der Infektionen im Winter bzw. im Frühjahr. Dies würde auch mit dieser Studie übereinstimmen, da die meisten gemessenen Einzelwerte der PCR vor allem zwischen November und März detektiert werden. Während Nadan [44] in seinen Untersuchungen AstV nicht mehr stromabwärts detektieren konnte und diesen Effekt dem Einfluß der Kläranlage zuschreibt, die zu einer vollständigen Reduzierung führt, kann dies hier nicht bestätigt werden, da auch an den von der Anlage entfernten Punkten positive Nachweise mittels RT-PCR und real-time PCR gefunden werden. Überraschend ist die große Anzahl an AstV, die detektiert wird, da

sie höher ist als erwartet [46]. Es ist demnach anzunehmen, daß Infektionen mit AstV anscheinend oftmals unschwellig verlaufen und daher nicht klinisch erfaßt werden. Adenoviren werden ebenfalls meistens in den Herbst- und Wintermonaten nachgewiesen (Abb. 40). Auch hier sind keine Aussagen über ein saisonales Auftreten in Deutschland aufgrund der fehlenden Meldepflicht möglich und auch laut Chapron [10] nicht bekannt. Auffällig ist es, daß bis auf eine Ausnahme alle positiven PCR Ergebnisse an den Standorten X und A gefunden werden. Messungen der Genomäquivalenten von einigen AdV Proben mittels real-time PCR haben gezeigt, daß die Viruslast in fast allen Fällen an der unteren Nachweisgrenze des TaqMan liegen (data not shown). Es liegt daher die Vermutung nahe, daß durch die Verdünnungseffekte beim Transport von der Kläranlage weg die Zahl der nachweisbaren Viruspartikel soweit reduziert wird, daß eine Detektion von AdV selbst mittels sensibler nested PCR an den Standorten B und C nicht mehr möglich ist.

Hepatitis A kann an allen vier Standorten und unabhängig vom Untersuchungsquartal (Abb. 45) nachgewiesen werden. Auffällig ist eine Abwesenheit des Virus zwischen dem vierten Quartal 2003 und dem zweiten Quartal 2004. Mit zwischen 17-2% kommt HAV nur sehr selten vor, hauptsächlich an den Standorten X und A.

### **6.8. Quantitative Bestimmung von EntV, AstV und NoV Genomen**

Ergebnisse nach dem Ja-oder-Nein Prinzip, wie sie durch die Ergebnisse der qualitative PCR zu finden sind, geben jedoch keine Auskunft auf die Viruslast, sondern nur auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Nukleinsäuren in den Proben. Zu diesem Zweck werden 90% der bereits in der PCR positiven Proben von AstV, NoV und EntV für eine repräsentative Aussage mittels real-time PCR analysiert. AstV, NoV und EntV werden als relativ stabil bezüglich ihres Existenzvermögens in der Umwelt eingeschätzt.

Für NoV zeigt sich, daß die durchschnittlich gemessene Viruslast zwischen  $2,71 \times 10^6$  (X) und  $1,38 \times 10^4$  Genomäquivalente pro Liter (C) liegt. Die Anzahl der untersuchten Proben beträgt 66 (7 GGI), davon sind 17 (2) in der real-time PCR negativ. Untersuchungen zeigen, daß die Zahl der Virusgenome in NoV positive Stuhlproben von Patienten auch nach 64 Tagen konstant bleibt [49]. Dieser Beweis für eine hohe Stabilität mag auch die Ursache dafür sein, daß die Zahl der

Virusgenome nur langsam an den unterschiedlichen Untersuchungsstellen abnimmt. Vergleicht man die gemessenen Virusgenome aus den Wintermonaten mit solchen, die außerhalb der Saisonalität liegen, so stellt man fest, daß sie deutlich höher sind als in Monaten mit geringem Norovirus-Ausbrüchen.

Die Zahl der AstV Genome nimmt über drei Zehnerpotenzen von X nach A deutlich ab. Dies entspricht auch der Aussage von Le Cann [28], der bereits eine Eliminierung von astroviralen Genomen durch die Reinigungsprozesse der Kläranlagen beschreibt. Es werden zwischen  $6,67 \times 10^7$  (X) und  $4,27 \times 10^2$  Genomäquivalente pro Liter (C) gemessen. Für die Ermittlungen der Viruslast gehen auch die insgesamt 23 in der real-time PCR negativen Proben mit ein. Es kann als sicher angenommen werden, daß es zu den negativen Ergebnissen aufgrund der geringen Virus Ausgangskonzentration in den Proben kommt. Da die real-time PCR im Gegensatz zur nested PCR nicht über zwei PCR Schritte verfügt, ist somit ihre Nachweisgrenze deutlich geringer als es für die nested PCR im allgemeinen gilt.

Auch für EntV kann aufgrund der hohen Anzahl an untersuchten Proben (126 Stück) eine Aussage getroffen werden, selbst, wenn 87 davon in der real-time PCR unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Die durchschnittliche Viruslast liegt zwischen  $1,06 \times 10^5$  (X) und  $6,11 \times 10^2$  Genomäquivalente pro Liter (B) und ist somit am Standort X deutlich niedriger als für NoV oder AstV. Es muß vermutet werden, daß eine größere Anzahl an positiven Proben an den Untersuchungsorten B und C zu eindeutigeren Ergebnissen geführt hätten, so orientieren sich die Berechnungen an einer positiven von insgesamt 18 (B), und drei positiven von insgesamt 16 Proben (C).

Abschließend muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß nur ein kleiner Teil an Virusgenomen nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck werden 10 l einer Wasserprobe mit einer definierten Menge an Poliovirus 1 ( $4,4 \times 10^4$  Genome pro Liter) versetzt und nach den üblichen Verfahren aufgearbeitet. Eine quantitative Untersuchung mittels real-time PCR ergibt, daß ca.  $4,43 \times 10^3$  Genome pro Liter wieder detektiert werden. Dies entspricht lediglich 10% der eingesetzten Menge. Es liegt daher der Verdacht nahe, daß die in der Studie gemessenen Proben in Wahrheit um einen Faktor 10 höher liegen als berechnet. Quantifizierungen mittels real-time PCR sind zwar sehr kostenintensiv und auch aufwendig, jedoch sollte ihr zukünftig eine größere Bedeutung geschenkt werden, vor allem, wenn es um die

Untersuchung von Oberflächengewässern geht, die stromabwärts einer Kläranlage liegen und für die öffentlichen Nutzung freigegeben sind.

## 6.9. Sequenzanalyse

Für jeden enteralen Virus wird eine Auswahl an PCR Produkten ansequenziert. Andere Studien haben gezeigt, daß eine Vielzahl an zum Teil untypischen Sequenzen im Abwasser vorhanden ist [44], jedoch kann der größte Teil der Sequenzen dominanten Vertretern zugeordnet werden.

Da die Sequenzierung bei Enteroviren in der 5'NCR stattfinden, einer Region, die zum größten Teil bis auf kleine Unterschiede identisch für alle EntV ist, kann eine genaue Zuordnung der Sequenzen mit einzelnen Vertretern nicht zu 100% erfolgen. In einem Abgleich mit der Datenbank können 32 Sequenzen angelehnt an Coxsackievirus A, 18 Sequenzen angelehnt an Echoviren (wobei drei eine Übereinstimmung mit dem Porcine Echovirus 9 besitzen) und einmal Poliovirus Typ 1 Sabin detektiert werden. Bei sechs Sequenzen handelt es sich um EntV Sequenzen, ein Abgleich mit der Datenbank führte jedoch nicht zu einem eindeutigen Ergebnis.

Sequenzanalysen bei Noroviren können zeigen, daß es während des Untersuchungszeitraumes zu einem Wechsel der Genogruppen bzw. Genotypen kommt. Während man im Herbst 2002 und in den Wintermonaten 2003 eine neue, GGII.4 Grimsby-Variante (Grimsby new) verstärkt nachweisen konnte, die über eine höhere Virulenz und Umweltstabilität als die herkömmlichen Grimsby Vertreter (Grimsby old) verfügte [36], findet im Herbst 2003 ein Shift zur Genogruppe I statt. Häufig nachgewiesen werden nun GGI Southampton like (GGI.2) Sequenzen. Im Winter 2003/2004 wird eine große Zahl an Proben als GGI Norwalk-like (GGI.1) klassifiziert. Seit dem September 2004 werden ausschließlich wieder nur Vertreter der Genogruppe II (GGII.4) gefunden. Es kann signifikant das Auftreten einer weiteren, neuen Variante innerhalb von GGII.4 beobachtet werden (bezeichnet als GGII.4/JAM), die zur Zeit für die Mehrzahl aller Outbreaks in Deutschland (RKI/unpublished) und Europa verantwortlich ist.

Alle im Wasser befindlichen Adenoviren, die mittels Sequenzanalyse in einem kleinen Bereich des Hexon Gens untersucht werden, können dem Subgenus F zugeordnet werden, wobei enterale AdV mit den Serotypen 40 und 41 als besonders stabil in Umweltproben gelten [16].

Von den als HAV Genogruppe IB nachgewiesenen Proben entspricht eine Sequenz aus dem Abwasser in der VP1/2A Region Sequenzen von deutschen Urlaubern, die sich im Sommer 2004 in einem Badeort in Ägypten infiziert haben. Des weiteren kann gezeigt werden, daß es auch in deutschen Abwässern zu einer Zirkulation von Sub-Genotypen IA und IB kommt, wie sie weltweit beobachtet wird [12; 13]. Somit können diese Proben, in einem Stammbaum eingetragen, einzelnen Outbreaks in Deutschland zweifelsfrei zugeordnet werden (RKI, nicht publiziert).

Für Rotaviren können neben G1 und G2 auch noch G9-Viren nachgewiesen werden. G9-RoV gilt weltweit als der fünft häufigste Serotyp und hat demnach auch bei Untersuchungen einen sehr hohen Stellenwert [39]. Dies entspricht auch den Ergebnissen einer spanischen Studie [56], in der ebenfalls Abwasserproben auf das Vorhandensein dieser Vertreter untersucht wurden.

Für die Astroviren, die in einem Bereich der ORF 2 sequenziert werden, werden unterschiedliche Serotypen über den Untersuchungszeitraum hinweg nachgewiesen. Dabei handelt es sich um solche Vertreter, die auch in klinischen Stuhlproben von Kindern in Deutschland gefunden wurden [47].

#### **6.10. Virusanzucht auf Zellkulturen**

Da ein positives Ergebnis in der PCR keine Rückschlüsse auf die Infektiosität des Erregers zuläßt [26; 52], wird eine Anzucht von Enteroviren in Einzelfällen vorgenommen. Das Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren (NRZ) am Robert Koch Institut führt diesbezüglich die virologische Serotypisierung über den Neutralisationstest durch. Die von den Umweltproben auf Zellen kultivierten Enterovirusisolate können erfolgreich serotypisiert werden. Wie erwartet ist die Anzahl der Proben, die erfolgreich anzüchtbar ist, geringer als die Zahl der positiven Nachweise mittels RT-PCR. Eine erfolgreiche Anzucht ist von mehreren Faktoren abhängig, nämlich vom Serotyp, den verwendeten Zelltypen, aber auch von der An- bzw. Abwesenheit toxischer und/oder inhibierender Stoffe. Während der Konzentrationsschritte kann es demnach zu einer ungewollten Inaktivierung der Viren aber auch zu Eliminierungsprozessen kommen [52], die ein falsch negatives Ergebnis zur Folge haben. Für den Genus Enterovirus kann hier aber doch in Einzelfällen gezeigt werden, daß die in der PCR positiven Befunde durchaus mit

infektiösen Partikeln einher gehen können. Für Noro-, Astro-, Rota-, Hepatits A und Adenovirus können hierzu keine Aussagen getroffen werden, da diese entweder gar nicht (NoV) oder nur sehr schwer anzüchtbar sind.