

## 7. Zusammenfassung

Im Zuge der Promotionsarbeit wird das Verfahren zur Isolierung von viralen Nukleinsäuren in Abwasser mit Hilfe der paramagnetischen Polystyrolkugeln der Sorte Dynabeads untersucht und optimiert. Betrachtet werden die untersuchten Standardbedingungen am Beispiel des Enterovirus Poliovirus Sabin 1 in Bezug auf die Effizienz des direkten bzw. indirekten Einfangs, des Lysevermögens der intakten Viren, sowie den Bedingungen für das Abkoppeln der isolierten Nukleinsäure von der Trägersubstanz für die 5' nicht codierende Region (5'NCR). Ferner wird geprüft, ob diese Standardbedingungen auch für andere Genomabschnitte ihre Gültigkeit besitzen und wie gegebenenfalls Variationen von Reaktionszeit, Temperatur u.ä. innerhalb der Versuchsvorschriften zu den gewünschten Ergebnissen führen. Anschließend erfolgt eine Prüfung der PCR Bedingungen, um mögliche Störfaktoren wie sie z.B. durch Inhibitoren auftreten können, auszuschließen. Durch eine Untersuchung von fünf Abwasserproben auf Enteroviren mit Hilfe Dynabeads bzw. mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit wird die Nachweisgenauigkeit zweier unterschiedlicher Isolierungssysteme verglichen und das Erfolg versprechende zur Isolierung von enteralen Viren aus Umweltwasser aus dem Raum Leipzig herangezogen. Während des Untersuchungszeitraumes vom Oktober 2002 bis Dezember 2004 werden 327 Proben (100 an der Stelle A, 96 an der Stelle B, 92 an der Stelle C und 39 an der Stelle X) auf das Vorkommen von gastroenteralen Viren (Adenoviren AdV, Astroviren AstV, Enteroviren EntV, Hepatitis A HAV, Noroviren NoV und Rotaviren A RoV) mittels PCR untersucht. Ein repräsentativer Teil der in der PCR positiven Proben wird mittels Sequenzierung untersucht, bei ca. 90% der NoV, EntV und AstV positiven Proben zusätzlich durch real-time PCR die Viruslast der Proben bestimmt. Die mögliche Infektiosität der nachgewiesenen Viren erfolgt durch eine Anzucht von Enteroviren auf Zellen.

Bei einer Hybridisierungsbedingung mit 1000 mM LiCl bei 65°C für drei Stunden können Virionen erfolgreich lysiert und an einen Primer aus der 5'NCR gekoppelt werden [50]. Es kann außerdem gezeigt werden, daß dabei der indirekte Einfang gegenüber dem direkten Einfang deutlich bevorzugt wird (i.d.R. 65% zu 11%). Werden andere Genomabschnitte für eine Detektion herangezogen, so kann es Variationen der Reaktionszeit und/oder der Reaktionstemperatur zur Folge haben.

Eine erfolgreiche Abkopplung der RNA von den Dynabeads erfolgt in 1x PCR Puffer bei 90°C für 5 min. Die dabei beobachteten Degradationserscheinungen der RNA haben jedoch keinen Einfluß auf das Ergebnis einer späteren Vervielfältigung mittels PCR. Es kann gezeigt werden, daß RNA, die noch an die Dynabeads gekoppelt ist, schlechter amplifiziert wird als solche, die vorher abgekoppelt wird. Durch die Zugabe von RNase-Inhibitor und durch die Behandlung mit Ultraschall wird die virale RNA im Abwasser stabilisiert und somit ein störungsfreier Nachweis mittels PCR erst ermöglicht. Jedoch ist die Effizienz dieser Methode bezüglich der Möglichkeit, in einem Reaktionsschritte alle im Abwasser befindlichen Viren zu isolieren, deutlich ungeeigneter als mit der QIAGEN-Methode. Ferner wird Ab- und Oberflächenwasser mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden auf das Vorkommen von enterale Viren (AdV, AstV, EntV, HAV, NoV und RoV) untersucht. Je weiter dabei die Untersuchungsstelle vom Klärwerk entfernt ist, desto niedriger ist die Zahl der Viren, die detektiert werden. Eine Analyse der PCR Produkte zeigt, daß die gefundenen Genotypen mit den nachgewiesenen Genotypen in der Patientendiagnostik übereinstimmen und demnach in einem saisonalen Zusammenhang zueinander stehen. EntV kann in drei von 26 Proben erfolgreich angezüchtet werden und läßt somit Aussagen über eine mögliche Infektiosität der Erreger zu [49].

Zusammenfassend kann der Beweis erbracht werden, daß Ab- und Oberflächenwasser ein mögliches Reservoir für Infektionen mit enterale Viren ist [18], auch wenn eine Analyse des Gewässers durch die bakteriologischen Indikatorgruppenvon einer mikrobiologischen Unbedenklichkeit ausgeht.

## Conclusion

In this study, a method to isolate virale nucleic acids in waste water samples with paramagnetical polystyrene beads (Dynabeads) was examined and optimized. Standard conditions for the efficiency of the indirect and direct capture, the lysis conditions for poliovirus sabin 1 but also the detachment of bound RNA from Dynabeads were considered. It was also necessary to consider, if these standard conditions for the 5'NCR were identical with those of other genome sections. If possible, changes for temperatures, reaction time and other agents should be assimilated. At the next step, PCR conditions were examined to reduce the presence of compounds that inhibited RT or PCR. Five waste water samples were detected for EntV with Dynabeads and QIAamp Viral RNA MiniKit. The system which included the highest efficiency to detect enteroviruses, were used to analyse enteric viruses in waste and surface water samples from the river Neue Luppe and Lake Werbelin. From September 2002 to December 2004 327 water samples (100 at site A, 96 at B, 92 at C and 39 at site X) were drawn at weekly intervals and were also examined for enteric viruses such as adenovirus, astrovirus, enterovirus, hepatitis A virus, norovirus and rotavirus A by specific nested PCR systems. A selection of nested PCR products of each virus type were sequenced. 90% of all samples containing NoV, EntV and AstV underwent quantitative PCR analysis to determine the genome load as calculated per liter water before the concentration step. For further evaluation of infectivity selected PCR positive water specimens were examined for EntV by cell culture.

Hybridization conditions, including 1000 mM LiCl buffer and temperatures of 65°C for three hours, warranted the lysis of enterovirus and a high efficiency of capturing 5'NCR primers to the virale nucleic acid [50]. However, indirect capture was much more efficient than direct capture (mostly 65% to 11%). To catch other genome domains of Human Poliovirus Sabin 1, changes of reaction temperatures and time were necessary. Detachment of bound RNA from Dynabeads was tested at different conditions. Best results were obtained when the samples were treated with 1x PCR buffer at 90°C for 5 min. The radioblot showed that at 90°C visible RNA breakdown had occurred but it had no influence on the amplification rate of the PCR. RNA, which was not detached at Dynabeads, was amplified with a higher rate than bound RNA. With special methods and compounds like RNase-inhibition, inhibitions of

RT or PCR were dramatically reduced. Unfortunately, this isolation method was not as efficient as the QIAGEN kit, which allowed the isolation of all virale nucleic acids in a sample using a one-step-reaction. Waste water and surface water samples were examined for AdV, AstV, EntV, HAV, NoV and RoV using by different and specific molecularbiological methods. As demonstrated, in most cases detection rates were significantly lower at the lakeshore (site C) than at the sewage plant (site X and A). The genotype distribution and the seasonal patterns observed reflected the clinical epidemiologies of the agents. EntV were successfully cultivated from three of 26 samples and it demonstrated so the infectivity of enteric viruses although inactivation and elimination mechanisms during the sewage plant and the following concentration steps [49].

In summary, the data of this study corroborate recent evidence that surface waters are a potential reservoir for enteric viral infections [18]. This may be the case even if the classic bacteriological parameters indicated an acceptable waterquality.