

Max-Buchner-Forschungstiftung
Postfach 1501044
D - 60061 Frankfurt

Datum: 23.07.2013 Ni/CP

Max-Buchner-Forschungstiftung, Kennziffer 2907: Hochleistungsanreicherung von Viren aus Wasser, Stipendiatin: Sonja Ott

Abstract

Für Wasserproben bis 100 L steht der MMC3 bereit, der automatisch Viren auf 1 ml einengt. Für Volumina bis 30 m³ wurde, vom MMC 3 abgeleitet, eine Crossflow-Ultrafiltrationsanlage aufgebaut, die 1 – 2 m³/h Wasser prozessiert. Die sekundäre Konzentrierung erfolgt mittels monolithischer Affinitätsfiltration mit 1 L/min. Dazu angepasst wurde die Multiplex-Mikroarray-Analyse auf Basis von DNA-Mikroarrays für Viren auf der Mikroarray-Analysenplattform MCR 3 etabliert.

Einleitung

Es treten von Zeit zu Zeit Krankheitsausbrüche auf, die von wasserbürtigen pathogenen Mikroorganismen oder Viren herrühren. Beispiele hierfür sind der *E.coli* O104:H4-Ausbruch 2011 in Deutschland oder die saisonbedingten Noro- oder Rotaviren-Ausbrüche. Die meisten wasserassoziierten Krankheitserreger sind fäkalen Ursprungs, die von Menschen oder Tieren nach einer Infektion in hoher Anzahl (10⁵ - 10¹¹ Viruspartikel pro Gramm Stuhl) ausgeschieden werden. Bei der Abwasserklärung wird ein Großteil der Viren inaktiviert (80% - 99,9%). Die Eliminationseffekte sind stark von den Betriebsbedingungen der Anlage abhängig. Zudem spielen Witterungsbedingungen, wie z.B. Starkregenfälle, eine Rolle, wenn das Abwasser direkt vom Vorfluter abgeführt werden muss. Entsprechend schwankt die Viruskonzentration im Oberflächenwasser in Abhängigkeit der Abwasserbelastung zeitlich und örtlich. Genauere Daten sind kaum verfügbar, weil bislang kaum effektive Aufkonzentrierungstechniken und quantitative Messverfahren für Umweltwasserproben zur Verfügung stehen. Wie der Einfluss auf die mikrobielle Trinkwasserqualität ist, konnte aus diesen Gründen bislang ebenfalls nur sehr wenig untersucht werden. In der TrinkwV 2011 ist aber festgelegt, dass Trinkwasser für den menschlichen Gebrauch frei von Krankheitserregern sein muss. Das Risiko einer Infektion durch die Aufnahme von Viren über Trinkwasser ist um ein Vielfaches (10 - 10.000-fach) höher als das von Bakterien. Wegen dem hohen Infektionsrisiko von Viren im Trinkwasser und gleichzeitig der langen Persistenz im Wasser und der moderaten Resistenz gegen Chlor- und UV-Inaktivierung, bedarf es, laut WHO (2004), der Beprobung viel größerer Wassermengen als für Bakterien (32 m³ (WHO, 2004) bzw. 90 m³ (WHO, 2011) an Stelle von 100 mL für Bakterien). Da dies für Routineanwendungen kaum realisierbar ist, soll das Rohwasser in Wasserleitungen zeit- und

ortsabhängig kontrolliert werden und die Effizienz der Desinfektion für eine Vielzahl potentieller pathogener Viren bekannt sein. Dazu müssen Viren in Wasserproben bis 100 L aufkonzentriert werden. Gleichzeitig muss die Effizienz der Virenreduktion gezeigt werden. Dafür sind kombinierte Aufkonzentrierungsverfahren notwendig, welche mindestens 30 m³ auf 1 mL einengen und gleichzeitig die Viren von der Matrix trennen können. Um Zeit und Kosten zu sparen macht es Sinn, möglichst viele pathogene Viren und Indikatororganismen parallel zu detektieren. Aus diesem Gründen zielte unsere Forschung darauf ab, Aufkonzentrierungsverfahren zu etablieren, die mit Multiplex-Analyseverfahren kombinierbar sind, um möglichst schnell und kostengünstig aus repräsentativen Wasserproben eine Vielzahl an Viren parallel zu erfassen.

Strategie

In der Analytischen Chemie wird die Problematik der Spurensuche von kleinsten Analytkonzentrationen durch Verbundverfahren gelöst, welche eine Probe aufkonzentrieren, von der Matrix abtrennen und instrumentell analysieren. Übertragen wir dies in die Wasseranalytik von Viren, wird, in Abhängigkeit von der Nachweisstärke des Analyseverfahrens und einzuhaltender Grenzwerte, eine repräsentative Rohwasserprobe mit einem Volumen von mindestens 10 L benötigt, welche schnellstmöglich auf weniger als 1 mL konzentriert wird. Für die Analyse von Viren im Trinkwasser muss gezeigt werden, dass Volumina von mindestens 30 m³ effektiv aufkonzentriert werden können. Für die Aufkonzentrierung repräsentativer Wasserproben mit einem Volumen von bis zu 100 L sind Dialysemembranen mit einer Trenngröße von ca. 150 kDa ein gangbarer Weg. Diese Ultrafiltrationsmodule bestehen aus einem Bündel von Hohlfasern. Auf der Innenseite der Membran werden neben den Kolloiden auch die zu analysierenden Bakterien und Viren zurückgehalten und können nach Elution weiter prozessiert werden. In einem zweiten Aufkonzentrierungsschritt werden neben einer weiteren Volumenreduktion, möglichst nur Viren zurückgehalten und die zuvor mit angereicherten Kolloide und anderen Störkomponenten entfernt. Hier hat die Adsorptions – Elutions – Methode mittels monolithischer Affinitätsfiltration (MAF) ein großes Potential, weil über ionische Wechselwirkungen sehr effektiv die Viren festgehalten werden können. Durch Erhöhung des pH-Wertes wird ein kleines Volumen eluiert, das direkt mit molekularbiologischen Methoden quantifiziert werden kann. Die Kombination aus Nukleinsäureamplifikation und analytischen DNA-Mikroarrays ermöglicht zukünftig eine Multiplex-Analyse von Viren im Wasser, so dass man innerhalb von Stunden umfassend die pathogenen Viren im Wasser bestimmen kann.

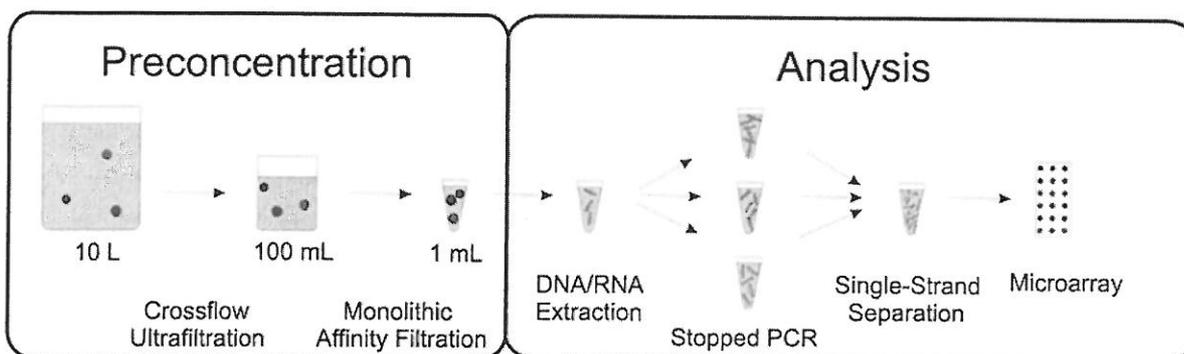


Abb. 1: Strategie zur Multiplex-Analytik von Viren im Wasser

Für die Aufkonzentrierung von größeren Wasservolumina (bis 30 m³) ist eine Aufskalierung der CUF möglich, indem Ultrafiltrationsmembrane eingesetzt werden, die in der Trinkwasseraufbereitung verwendet werden. Auch die MAF kann mit größeren Monolithen durchgeführt werden. Bei der Prozessierung von 30 m³ ist eine theoretische Aufkonzentrierung um den Faktor 3×10^7 möglich, wie hoch die effektive Wiederfindung mit den genannten molekularbiologischen Nachweisverfahren ist, muss gezeigt werden. Hier können aufkonzentrierte Inhibitoren für die Polymerase-Ketten-Reaktion wie z.B. Eisenkolloide, Huminstoffe, etc. antagonistisch wirken.

Instrumentelles, Durchführung und Ergebnisse für Aufkonzentrierung

An unserem Institut wurde eine Aufkonzentrierungsanlage (Munich Microorganism Concentrator, MMC 3 siehe Abb. 2) entwickelt, welche die Crossflow-Ultrafiltration (CUF) direkt mit der MAF-Methode koppelt. Für die CUF wurde das Dialyse-Modul FX80 (Fresenius GmbH) eingesetzt. Die MAF besteht aus einem makroporösen Monolithen, der in eine Glassäule einpolymerisiert wurde. Mit einer Porengröße von 20 µm wird das Konzentrat aus der CUF vollständig durch die Porenkanäle der MAF-Säule geleitet, was eine höhere Adsorptionseffizienz im Vergleich zur herkömmlich verwendeten Glaswollefiltration bedeutet. Zudem ermöglicht ein geringes Monolithvolumen (100 µl) ein kleines Konzentratendvolumen (ca. 1 mL). Limitierend sind größere Partikel als 20 µm und die geringe Bindekapazität.

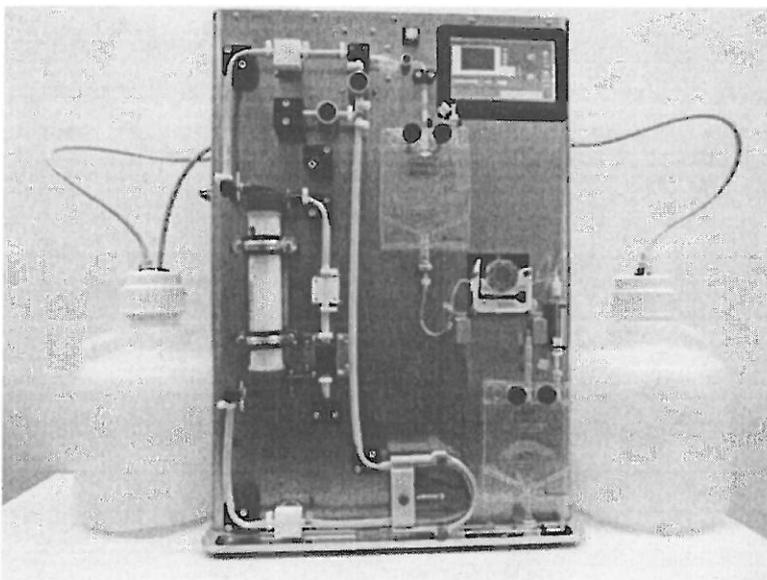


Abb. 2: Munich Microorganism Concentrator (MMC 3) für die kombinierte Aufkonzentrierung von Viren und Mikroorganismen in Wasserproben bis 100 L.

Der MMC 3 ist mit einer Schlauchpumpe ausgerüstet, wodurch die Dialyse-Membran im Kreislauf tangential angeströmt wird. Durch die Druckdifferenz im Modul wird die Wasserprobe bei einem maximalen Volumenstrom von 3,5 L/min mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 L/min filtriert. Nach der Aufkonzentrierung im Umlaufsystem erfolgte durch Umschaltung von Magnetventilen die Elution in einen Sterilbeutel mit einem definierten Volumen von 100 ml. Für die MAF wird das CUF-Eluat im Sterilbeutel mit HCl auf pH 3 eingestellt. Die angesäuerte Probe wird anschließend bei einer Flussrate von 10 mL/min über das makroporöse Epoxid-

Polymer geleitet, bei den nach einer Behandlung mit Schwefelsäure die hydrolysierten Epoxygruppen als OH-Gruppen an den Porenoberflächen vorliegen. Alle Viren mit einem isoelektrischen Punkt größer dem eingestellten pH-Wert der Probe sind durch die saure Umgebung positiv geladen und werden auf Grund elektrostatischer Kräfte an das negativ geladene Polymergerüst adsorbiert. Die anschließende Elution wird durch Verwendung von 1 mL eines basischen, proteinreichen Puffers (Glycin-Beefextrakt, pH 9.5) erreicht.

Der MMC 3 wurde mit dem Modellvirus Bakteriophage MS2 in Leitungswasserproben getestet. Die Phagen konnten nach Aufkonzentrierung mit dem MMC 3 in einem Bereich von 0.02 – 230 PFU/mL und einer Nachweisgrenze (NWG) von 0.002 PFU/mL mittels Plaque-Assay bestimmt werden. Die Wiederfindungen lagen in den eingesetzten Konzentrationen (10^2 - 10^6 PFU/10 L) zwischen 42% und 50%. Damit konnte prinzipiell gezeigt werden, dass Viren in niedrigen Konzentrationen im Leitungswasser nach Aufkonzentrierung quantifizierbar sind. Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass eine Bindekapazität von $5,6 \times 10^5$ PFU/g für ein Säulenvolumen von 100 μ L (0,017 g) für Umweltwasserproben ein limitierender Faktor sein kann, insbesondere wenn andere Mikroorganismen, Viren und andere ionische Bestandteile im Wasser enthalten sind. Dies wurde zunächst mit Grundwasser untersucht. Es zeigte sich, dass im Grundwasser die zu dosierten MS2-Phagen nach Aufkonzentrierung in einem Bereich von 30 bis 30.000 GU/mL und einer NWG von 20 GU/mL mit einer qPCR nachgewiesen werden können. Ohne Aufkonzentrierungsschritt lag die NWG der qRT-PCR bei 10^4 GU/mL.

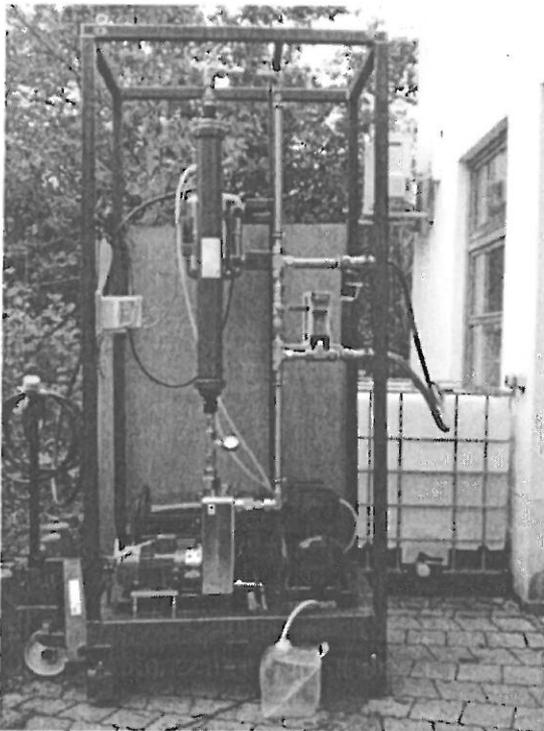


Abb. 3: BigCUF für die Aufkonzentrierung von Viren und Mikroorganismen in Wasserproben bis 30 m^3 .

Für prinzipielle Versuche mit Trinkwasser und Rohwasser bis 30 m^3 wurde in einem DFG-Projekt eine hochskalierte Ultrafiltrationsanlage aufgebaut, die sowohl im Dead-end- als auch im Crossflow-Modus arbeiten kann (BigCUF, siehe Abb. 3). Dazu wurde ein Trinkwasser-Aufbereitungsmodul der Fa. Inge AG (Greifenberg) verwendet, welche aus mehrkanaligen

Hohlfasern mit einer Gesamfiltratfläche von 6 m^2 besteht. Die Hohlfasern haben eine Porengröße von 20 nm und sind aus Polyethersulfon hergestellt. Es wurde gezeigt, dass dem Leitungswasser zudosierte MS2-Phagen mit einer Wiederfindung von über 30% (Plaque-Assay und qRT-PCR) in 20 L Eluat aufkonzentriert werden konnten. Dazu angepasst wurde eine MAF-Kartusche (BigMAF, siehe Abb. 4) entwickelt, die aus MAF-Discs mit einem Durchmesser von 3,8 cm bestanden. Mit einer Flussrate von 1 L/min wurde die Wasserprobe auf 20 mL eingengt. In einem letzten Schritt erreichte man über zentrifugal unterstützte Ultrafiltration (CeUF) ein Endvolumen von 1 mL. Die mit qRT-PCR bestimmte Wiederfindung lag bei 11%. Eine effektive Aufkonzentrierung von Viren um den Faktor $2,4 \times 10^5$ ist somit möglich.

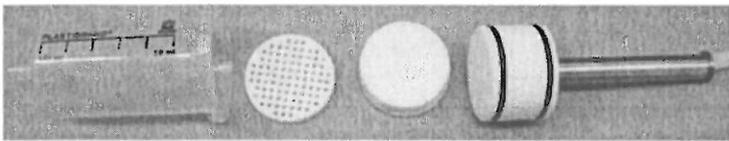


Abb. 4: BigMAF zur schnellen Aufkonzentrierung von Viren aus 20 L Eluat-Probe über ein Adsorptions - Elutionsverfahren

An einem offenen Gerinne wurde beim UBA in Berlin-Marienfelde die etablierte Methode mit 35 m^3 Grundwasser untersucht, das mit 0.01% Abwasser (für natürlich vorkommende humane Adenoviren und Bakteriophagen) sowie mit murine Noroviren versetzt war. Es wurden 10 m^3 Grundwasser aufkonzentriert bevor das Ultrafiltrationsmodul verstopft war. Die Eluate wurden mit 3 verschiedenen Methoden weiter aufkonzentriert. Neben der BigMAF – CeUF-Methode (Methode 1) wurde Glaswollefiltration mit nachfolgender organischer Flockung (Methode 2) und die Glaswollefiltration als Vorfilter für die BigMAF – CeUF-Methode (Methode 3) eingesetzt. Es zeigte sich, dass mit BigMAF zwar nur 2 L des Eluats prozessiert werden konnte, hier aber die Wiederfindungen und die effektiven Konzentrierungsfaktoren viel höher als mit der Glaswollefiltration waren (siehe Abb. 5).

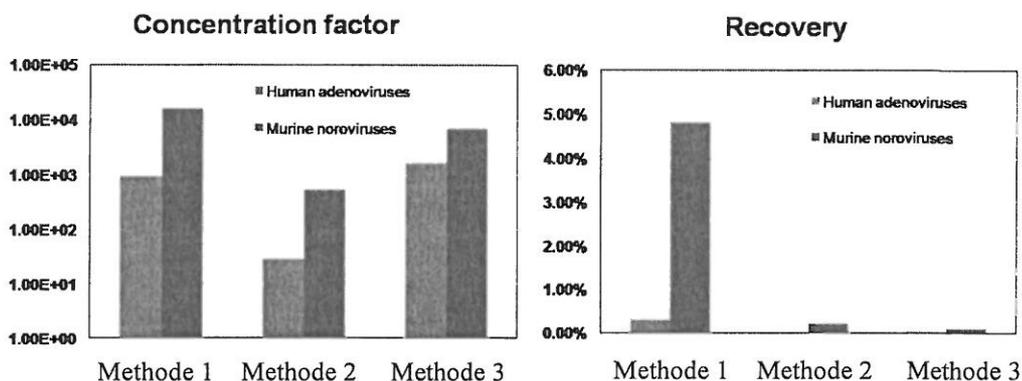


Abb. 5: Gesamtaufkonzentrierungsfaktor und -wiederfindung von humanen Adenoviren und murinen Noroviren aus 10 m^3 mit BigCUF aufkonzentriertem Grundwasser

Die Glaswolle konnte als Vorfilter eingesetzt werden, weil danach 30 L mit der BigMAF prozessiert werden konnten. Die Wiederfindung war jedoch niedrig. Somit konnte prinzipiell gezeigt werden, dass Viren in $10 - 30 \text{ m}^3$ Wasser nachgewiesen werden können, wenn eine kombinierte Aufkonzentrierung mittels BigCUF-BigMAF-CeUF durchgeführt wurde.

Instrumentelles, Durchführung und Ergebnisse für DNA-Mikroarrays

Für die schnelle Quantifizierung von mikrobiologischen Parametern im Wasser sind Multiplex-Analysenverfahren von großem Interesse, weil hinsichtlich der Vielzahl an möglichen Keimen die parallele Quantifizierung zu einer Zeit- und Kostenersparnis führt. Die Analysen-Plattform MCR 3 wurde im BMBF-Projekt PATH₂OGENSCAN für Chemilumineszenz-DNA-Mikroarrays einsetzbar gemacht. Es wurde eine Peltier-gesteuerte Heizfunktion in die Mikroarray-Flusszellenaufnahme eingebaut, so dass Hybridisierungsassays auch bei höheren Temperaturen durchgeführt werden können. Durch Erhöhung der Temperatur auf 40 °C werden stringenter Bedingungen erreicht, so dass die Selektivität auf dem DNA-Mikroarray erhöht und die entsprechend die Kreuzreaktionen von PCR-Produkten reduziert werden. Im PATH₂OGENSCAN-Projekt wurde für jeden Virus eine geeignete Stop-PCR etabliert, indem geeignete Primer untersucht, Temperaturzyklen der PCR angepasst und der optimale Stop-Zyklus bestimmt wurde. Aus einer Mischung an Viren wurde die RNA bzw. DNA extrahiert, mit der Stop-PCR einzeln amplifiziert und über magnetische Partikel eine Einzelstangtrennung der gepoolten Amplifikate durchgeführt. Auf dem MCR 3 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bakteriophagen MS2 und PhiX174, so wie der pathogene Adenovirus parallel über DNA-Mikroarrays mit einer Nachweisgrenze von 6.6×10^5 GU/mL für MS2, 5.3×10^3 GU/mL für PhiX174 und 1.5×10^2 GU/mL für Adenoviren in 30 min quantifiziert werden können.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Es stehen nun Instrumente zur schnellen Aufkonzentrierung und Analyse von Viren im Wasser bereit. Diese werden nun vollständig auf die Einsetzbarkeit im Leitungswasser, Grundwasser, Oberflächenwasser und geklärtes Abwasser getestet. Dazu werden Wasserproben mit Abwasser aufgestockt, aufkonzentriert und mittels DNA-Mikroarray-Analyse ausgewertet, um das maximal prozessierbare Volumen in Abhängigkeit zur Analyseeffizienz der einzelnen Viren zu überprüfen. Anschließend erfolgen Messungen mit Realproben. Mit diesen Experimenten kommen wir dem Ziel näher, einer aussagekräftigen Virenanalytik zu etablieren, um mit quantitativen Daten eine bessere Risikoabschätzung von pathogenen Viren im Wasser zu erreichen.

Literatur:

Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N.M., Selinka, H.C., Tiehm, A., Niessner, R., Seidel, M., Combination of crossflow ultrafiltration, monolithic affinity filtration, and quantitative reverse transcriptase PCR for rapid concentration and quantification of model viruses in water. *Environmental Science & Technology* **2012**, 46, 10073-10080.