



Herausforderung

Empfindlicher Nachweis verschiedener für die abwasserbasierte Epidemiologie (WBE) wichtiger Ziele; u.a. Krankheitserreger und fäkale Marker, die das Vorhandensein von menschlichem Material in einer Probe anzeigen.

Lösung

Nachweis pathogener Noroviren sowie der fäkalen Marker Bacteroides HF183, CrAssphage und PMMoV durch Anwendung des Analytik Jena Workflows für den Nachweis biologischer Parameter in Abwasser mit dem RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 von Altona Diagnostics und selbstentwickelten Assays.

Überwachung von Abwasser auf epidemiologisch relevante Zielorganismen mittels Real-Time-PCR

Einleitung

Im Zuge der Bemühungen, die Auswirkungen der SARS-CoV-2-Pandemie durch die Überwachung der Prävalenz dieses Virus im Abwasser einzudämmen, besteht ein zunehmendes Interesse an zusätzlichen Informationen, die aus dem Abwasser gewonnen werden können: Der qPCR-basierte Nachweis spezifischer Zielgene kann zum Nachweis von in der Bevölkerung zirkulierenden Krankheitserregern verwendet werden, und Referenzgene können als Marker für menschliches Material in diesen Proben eingesetzt werden. Hier wurden verschiedene Zielgene wie das humanpathogene Norovirus (Genotypgruppen I und II) und drei menschliche Fäkalmarker, nämlich Cross-assembly phage (CrAssphage), bacteroid HF183 und Pepper mild mottle virus (PMMoV), analysiert. CrAssphage und HF183, die im menschlichen Darm und damit in Ausscheidungen vorkommen, werden jeweils über DNA-Zielmoleküle nachgewiesen. PMMoV ist ein RNA-Virus. Es befällt Paprikapflanzen weltweit, sein Vorkommen in menschlichen

Fäkalien ist demnach ernährungsbedingt. Noroviren sind hochinfektiöse, fäkal-oral übertragbare RNA-Viren. Sie können zu Ausbrüchen von Gastroenteritis, z. B. in Krankenhäusern, Pflegeheimen oder auf Kreuzfahrtschiffen führen. Da die Genotypgruppen I und II mit klassischen Methoden nicht oder nur schwer nachweisbar sind, sind PCR-Assays das Mittel der Wahl für diagnostische Tests. Zur Erkennung lokaler Ausbrüche ist die Untersuchung des Abwassers von einer bestimmten Probenahmestelle im Abwassersystem sinnvoll. Auf diese Weise kann das Gesundheitsmanagement auf eine lokal begrenzte Gruppe von Personen beschränkt werden, wobei deren Anonymität gewahrt bleibt. Durch anschließende Vorsichtsmaßnahmen kann ein größerer Ausbruch verhindert werden. Aufgrund des unbekannten, aber möglicherweise hohen Gehalts an PCR-Inhibitoren ist Abwasser eine anspruchsvolle Probenmatrix, die hochwertige Analyseverfahren erfordert.

Analytik Jena bietet die Geräte für den kompletten Arbeitsablauf, der den Nachweis verschiedenster Zielsequenzen im Abwasser ermöglicht. Zunächst werden die Nukleinsäuren durch Filtration aufkonzentriert. Es folgen Aufreinigungsschritte, darunter die Extraktion des Filters mit dem Homogenisator SpeedMill PLUS (Analytik Jena) und die automatisierte Nukleinsäureextraktion auf dem InnuPure C16 *touch* (Analytik Jena) in Kombination mit dem innuPREP AniPath DNA/RNA Kit (IST Innuscreen GmbH). Der Nachweis der Zielgene erfolgt auf dem quantitativen Real-Time-PCR-Gerät qTOWER³ (Analytik Jena) durch Amplifikation der Zielsequenzen mit den entsprechenden qPCR-Assays. Der Arbeitsablauf ist einfach und effektiv: Die Filtration ist eine schnelle und kostengünstige

Methode zur Aufkonzentrierung. Die automatisierte Nukleinsäureextraktion mit dem InnuPure C16 *touch* ist zuverlässig und einfach zu handhaben. Der qTOWER³ garantiert eine sensitive Detektion auch von Multiplex-PCR-Anwendungen zum parallelen Nachweis mehrerer Targets. Aufgrund der anspruchsvollen Probenmatrix müssen die PCR-Assays für den Einsatz in Abwasserproben optimiert und getestet werden. Das Norovirus-Nachweiskit von Altona Diagnostics hat gezeigt, dass es diese Anforderungen erfüllt. Für die anderen Marker wurden eigene Assays entwickelt, zum einen der Einzel-Nachweis von PMMoV, zum anderen ein Duplex-Nachweis von HF183 und CrAssphage.

Material und Methoden

Proben, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- innuSPEED Lysis Tubes J (845-CS-1120100, IST Innuscreen GmbH)
- innuPREP AniPath DNA/RNA Kit - IPC16 (845-IPP-8016096 or 845-PPP-8016096, IST Innuscreen GmbH)
- MF-Millipore MCE Membran Filter, hydrophil, 0,45 µm, Ø 47 mm (HAWP04700, Merck Millipore)
- 96-Well-PCR-Platte (0,2 ml; LP), full-skirted, weiß (844-70038-S, Analytik Jena GmbH)
- Optische Sealingfolie (844-70046-O, Analytik Jena GmbH)
- DNA/RNA-Shield (R1100, Zymo-Research)
- RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 (053003, Altona Diagnostics)
- SensiFAST Probe No-ROX Kit (BIO-86005, Meridian)
- Tetro cDNA Synthesis Kit (BIO-65042, Meridian)
- Primer und Sonden für HF183 (biomers.net GmbH)
 - Primer fwd.: ATC ATG AGT TCA CAT GTC CG,
 - Primer rev.: CTT CCT CTC AGA ACC CCT ATC C,
 - Sonde: 6-FAM-CTA ATG GAA CGC ATC CC-BMN-Q535
- Primers and Probe for CrAssphage (biomers.net GmbH)
 - Primer fwd.: CAG AAG TAC AAA CTC CTA AAA AAC GTA GAG,
 - Primer rev.: GAT GAC CAA TAA ACA AGC CAT TAG C,
 - Probe: Cy5-AAT AAC GAT TTA CGT GAT GTA AC-BMN-Q620
- Primer und Sonden für CrAssphage (biomers.net GmbH)
 - Primer fwd.: GAG TGG TTT GAC CTT AAC GTT GA,
 - Primer rev.: TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT,
 - Sonde: 6-FAM-CCT ACC GAA GCA AAT G-MGB-CDPI3
- 500 ml Abwasser (aus dem Zulauf der Kläranlage)

Geräte

- Edelstahlfilterhalter, 47 mm (16249, Sartorius)
- Kompressor
- SpeedMill PLUS (845-00007-2, Analytik Jena GmbH)
- InnuPure C16 *touch* (845-00020-2, Analytik Jena GmbH)
- qTOWER³ mit der entsprechenden Konfiguration:
 - Grundgerät inklusive Farbmodul zur Detektion von FAM (Farbmodul 1) (844-00553-2),
 - Farbmodul zur Detektion von JOE (Farbmodul 2; 844-00521-0)
 - Farbmodul zur Detektion von Cy5 (Farbmodul 5; 844-00524-0)
- Zentrifuge (für 2 ml Tubes)
- Vortexmixer
- Pipetten
- Pinzetten

Methoden

1. Konzentration und Reinigung der Abwasserproben

Die Abwasserprobe wurde entnommen und in fünf gleiche Teile geteilt. Diese wurden durch Filtration konzentriert, wie in der Applikationsschrift „Kompletter PCR-basierter Workflow zum Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser“^[1] beschrieben, abweichend davon wurde aber den Membranen nach der Filtration DNA/RNA-Shield anstelle von PBS zugesetzt. Das DNA/RNA-Shield-Medium stabilisiert Nukleinsäuren bei Raumtemperatur. Durch diese methodische Verbesserung können die Proben ohne Kühlung ins Analyselabor transportiert und bis zu 6 Tage bei 4 °C gelagert werden. Wie bereits beschrieben^[1], wurden die an den Filter adsorbierten Moleküle durch Stahlkugeln in sogenannten Lysis Tubes mit Hilfe der SpeedMill PLUS freigesetzt. Anschließend erfolgte die Extraktion von Nukleinsäuren mit dem InnuPure C16 *touch* unter Verwendung des innuPREP AniPath DNA/RNA Kits (Protokoll 2: „Isolation from 400 µL cell-free body fluids, cell culture supernatants and whole blood“, Elutionsvolumen 100 µl). Nach der Extraktion wurden die Proben direkt verarbeitet bzw. bei -20 °C gelagert.

2.A Nachweis der Norovirus-Genotypgruppen I und II

Der Norovirus-Nachweis wurde mit dem RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 gemäß den Anweisungen des Herstellers

durchgeführt. Die Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert, die Interne Kontrolle wurde dem Mastermix zugesetzt und als RT-PCR-Inhibitionskontrolle verwendet. Die Programmierung des PCR-Protokolls in der qPCRsoft erfolgte gemäß den Anforderungen des Kits (Abbildung 1 und 2). Die Norovirus-Genotypgruppe I wurde im Cy5-Kanal (Farbmodul 5) gemessen, die Norovirus-Genotypgruppe II im FAM-Kanal (Farbmodul 1), und die Interne Kontrolle wurde im JOE-Kanal (Farbmodul 2) nachgewiesen.

2.B Nachweis von CrAssphage und HF183 mittels eines Duplexassays

Die quantitative PCR wurde nach einem bereits veröffentlichten Verfahren durchgeführt^[2]. Die Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert. Jede Reaktion enthielt 10 µl SensiFAST Probe No-ROX Master Mix, 600 nM HF183-spezifische Primer, 400 nM CrAssphage-spezifische Primer, jeweils 200 nM der beiden Sonden und 5 µl extrahierter Nukleinsäuren in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Sowohl für die Volumen Anpassung als auch als NTC wurde PCR-grade Wasser verwendet. Das Temperaturprofil und die Fluoreszenzeinstellungen wurden wie in Abbildung 3 und 4 dargestellt vorgenommen. Die FAM-markierte Sonde zur Bestimmung von HF183 wurde in Kanal 1 und die Cy5-markierte Sonde für CrAssphage in Kanal 5 des qTOWER³ gemessen.

Lid temp. °C: 100 ☐ Preheat lid Device: qTOWER ³ G									
5 steps		scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
45x	1		55,0	20:00	--	---	--,-	---	8,0
	2		95,0	02:00	--	---	--,-	---	8,0
	3		95,0	00:15	--	---	--,-	---	8,0
	4	◆	55,0	00:45	--	---	--,-	---	6,0
	5		72,0	00:15	3	44	--,-	---	6,0
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								

Abb. 1: Temperatur-Zeit-Protokoll erstellt für den qTOWER³ zur Verwendung des RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 (Altona Diagnostics).
Schritt 1 – Reverse Transkription
Schritt 2 – Initiale Denaturierung
Schritt 3 + 4 + 5 – Amplifikation (Denaturierung + Annealing + Elongation), Datenerfassung in Schritt 4.

Pos.	Channel	Dye	Gain	Measurement	Pass. Ref.
1	Blue	FAM	5	◆	
2	Green	JOE	5	◆	
3	Yellow	TAMRA	5		
4	Orange	ROX	5		
5	Red	Cy5	5	◆	
6	NIR1	Cy5.5	5		

Meas. repeats: 3 Color compensation: Standard1

☒ Scan region according layout
☐ Define scan region manually

Abb. 2: Scaneinstellungen in der qPCRsoft für den qTOWER³ zur Verwendung des RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 (Altona Diagnostics).

Lid temp. °C: 100 ☐ Preheat lid Device: qTOWER ³ G									
3 steps		scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
40x	1		95,0	10:00	--	---	--,-	---	8,0
	2		95,0	00:15	--	---	--,-	---	8,0
	3	◆	60,0	01:00	2	39	--,-	---	6,0
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								

Abb. 3: Temperatur-Zeit-Protokoll erstellt für den qTOWER³ zur Verwendung mit dem CrAssphage/HF183 Duplexassay.
Schritt 1 – Initiale Denaturierung,
Schritt 2 + 3 – Amplifikation (Denaturierung + Elongation),
Datenerfassung erfolgt in Schritt 3.

Pos.	Channel	Dye	Gain	Measurement	Pass. Ref.
1	Blue	FAM	5	◆	
2	Green	JOE	5		
3	Yellow	TAMRA	5		
4	Orange	ROX	5		
5	Red	Cy5	5	◆	
6	NIR1	Cy5.5	5		

Meas. repeats: 3 Color compensation: Aus

☒ Scan region according layout
☐ Define scan region manually

Abb. 4: Scaneinstellungen in der qPCRsoft für den qTOWER³ zur Verwendung mit dem CrAssphage/HF183 Duplexassay.

2 C. Nachweis von PMMoV

Die reverse Transkription von PMMoV-RNA wurde mit dem Tetro cDNA Synthesis Kit gemäß den Anweisungen des Kit-Herstellers durchgeführt. Maximal 0,7 µg RNA wurden als Template eingesetzt. Wasser mit PCR-Qualität wurde als NTC verwendet. Die Reaktion wurde auf dem qTOWER³ durchgeführt, wobei das Temperaturprofil in Abbildung 5 dargestellt ist. Für das qPCR-Protokoll wurde eine Abwandlung einer veröffentlichten Methode verwendet^[3]. Die Proben wurden in doppelter Ausführung getestet. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10 µl SensiFAST Probe No-ROX Master Mix, 500 nM PMMoV-spezifische Primer und 125 nM der Sonde. 3 µl der cDNA-Probe oder nukleasefreiem Wasser als NTC wurden hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Das Temperaturprofil wurde aus der Veröffentlichung übernommen (Abbildung 6). Die FAM-markierte Sonde wurde über Kanal 1 des qTOWER³ nachgewiesen (Abb. 7).

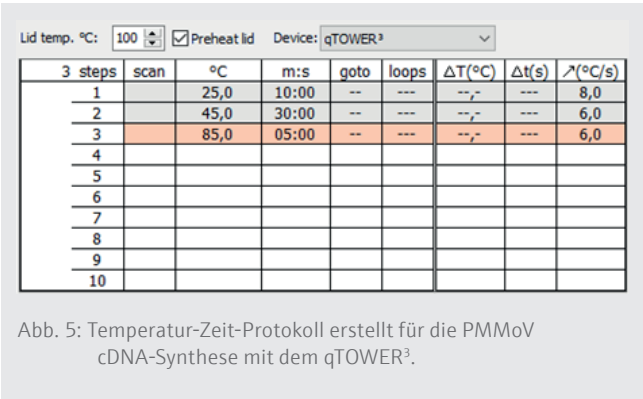


Abb. 5: Temperatur-Zeit-Protokoll erstellt für die PMMoV cDNA-Synthese mit dem qTOWER³.

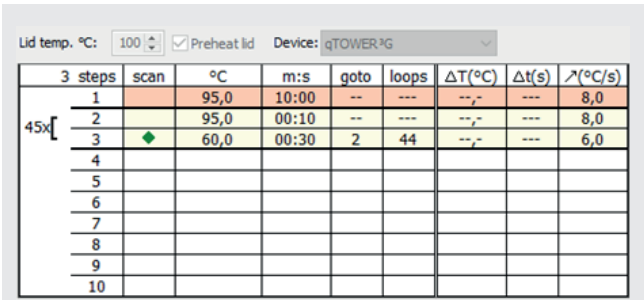


Abb. 6: Temperatur-Zeit-Protokoll für den PMMoV-Assay auf dem qTOWER³. Schritt 1 - Initiale Denaturierung, Schritt 2 + 3 - Amplifikation (Denaturierung + Elongation), Datenerfassung erfolgt in Schritt 3.

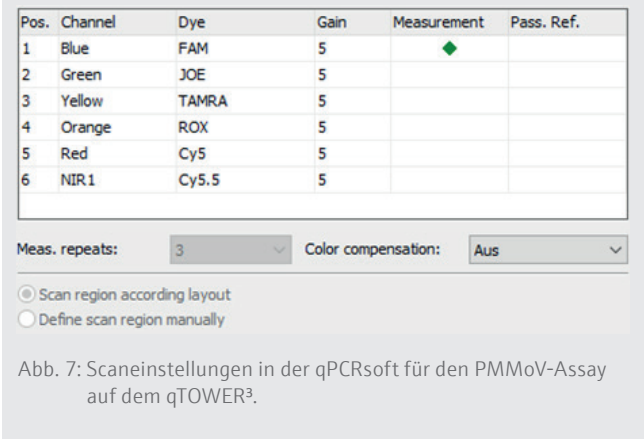


Abb. 7: Scaneinstellungen in der qPCRsoft für den PMMoV-Assay auf dem qTOWER³.

Ergebnisse und Diskussion

A: Nachweis der Norovirus Genotypgruppen I und II

Der PCR-Lauf wird durch die positiven Genotypgruppen-Kontrollen, die negative NTC (Abbildung 8 und 9, Tabelle 1 und 2) und die erfolgreiche Amplifikation der internen Kontrolle (Abbildung 10, Tabelle 3) validiert. Der Virusnachweis war erfolgreich, die untersuchte Abwasserprobe wurde positiv auf Norovirus der Genotypgruppe I bzw. II getestet.

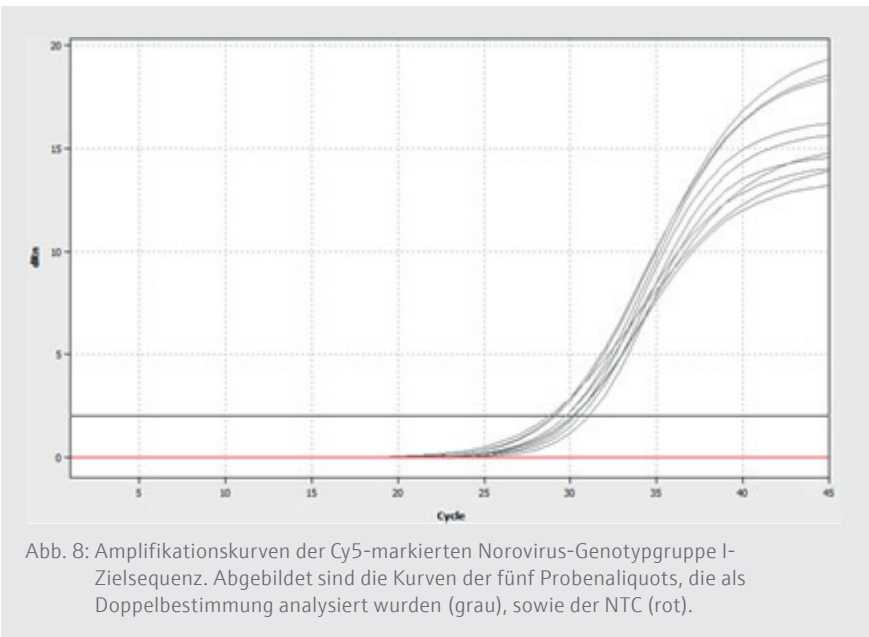


Abb. 8: Amplifikationskurven der Cy5-markierten Norovirus-Genotypgruppe I-Zielssequenz. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (grau), sowie der NTC (rot).

Tabelle 1: Ct-Werte der Amplifikationskurven für das Norovirus Genotypgruppe I Zielgen.

Probenaliquot	Ø Ct
A	29,48
B	30,20
C	31,14
D	30,25
E	29,40
PC Genotypgruppe I	29,69
NTC	kein Ct

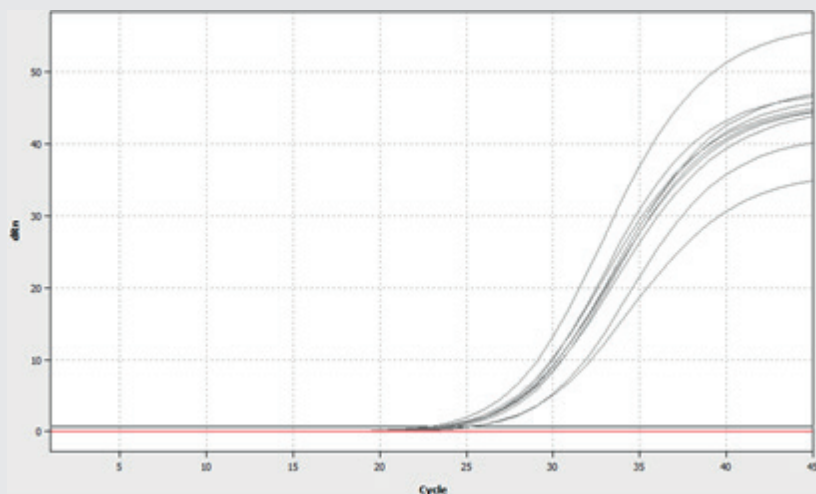


Abb. 9: Amplifikationskurven der FAM-markierten Norovirus-Genotypgruppe II-Zielsequenz. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (grau), sowie der NTC (rot).

Tabelle 2: Ct-Werte der Amplifikationskurven für das Norovirus Genotypgruppe II Zielgen.

Probenaliquot	Ø Ct
A	24,61
B	23,61
C	23,65
D	23,89
E	23,73
PC Genotypgruppe II	29,27
NTC	kein Ct

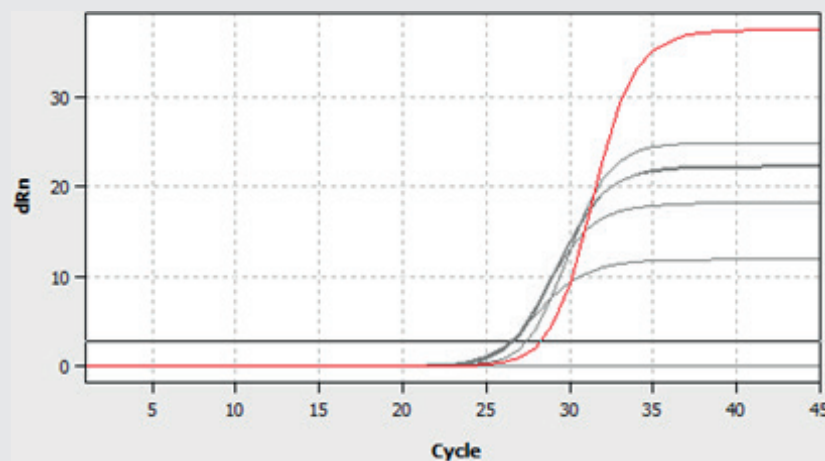


Abb. 10: Amplifikationskurven der JOE-markierten Zielsequenz der Internen Kontrolle. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (grau), sowie die NTC (rot).

Tabelle 3: Ct-Werte der Amplifikationskurven der Internen Kontrolle.

Probenaliquot	Ø Ct
A	27,39
B	26,40
C	26,55
D	26,46
E	26,61
NTC	28,25

B: Nachweis von CrAssphage and HF183 in einem Duplex Assay

Dieser PCR-Lauf ist gültig, da der NTC negativ ist. Da es sich um einen selbstassemblierenden Test handelt, wurden keine Positivkontrollen in das PCR-Setup aufgenommen. Da beide Targets in jeder Probe nachgewiesen wurden, war die Positivkontrolle nicht erforderlich, um die Funktionalität des Tests zu bestätigen.

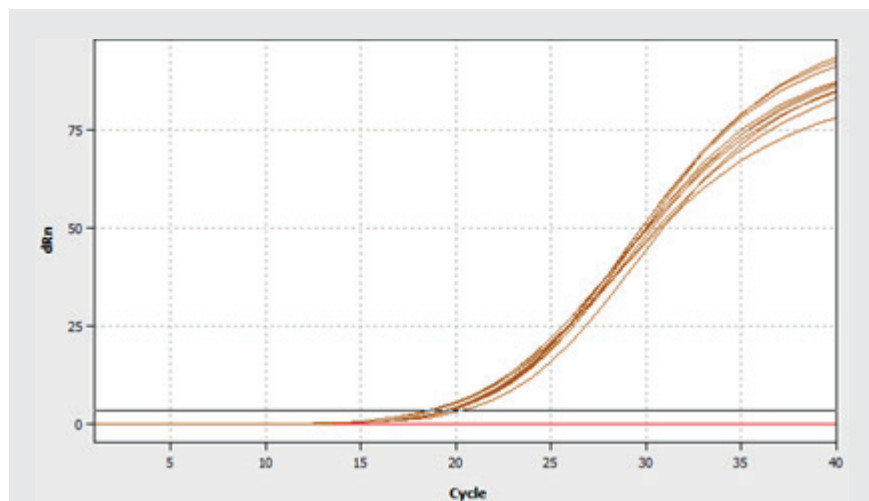


Abb. 11: Amplifikationskurven der FAM-markierten Zielsequenz von HF183. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (braun), sowie die NTC (rot).

Tabelle 4: Ct-Werte für die Amplifikationskurven des HF183 Zielgens.

Probenaliquot	Ø Ct
A	18,72
B	20,06
C	19,56
D	19,48
E	18,78
NTC	kein Ct

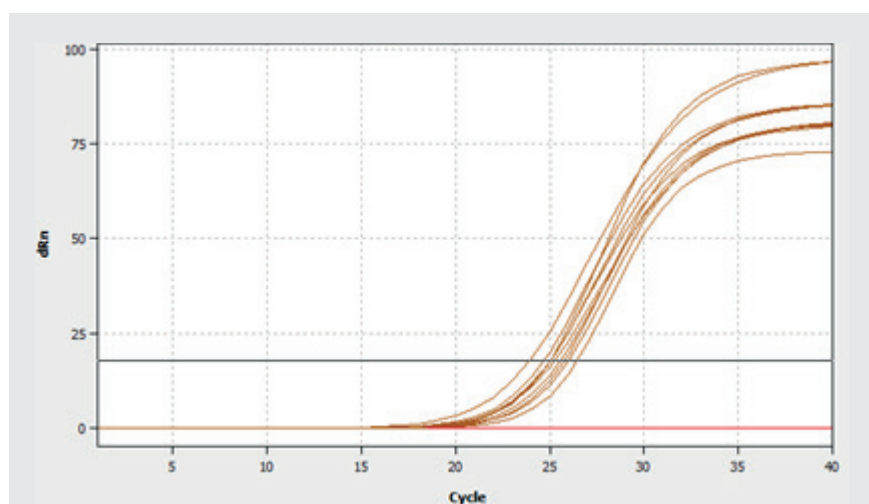


Abb. 12: Amplifikationskurven der Cy5-markierten Zielsequenz von CrAssphage. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (braun), sowie die NTC (rot).

Tabelle 5: Ct-Werte der Amplifikationskurven der CrAssphage Zielsequenz.

Probenaliquot	Ø Ct
A	24,58
B	26,09
C	25,30
D	25,50
E	24,84
NTC	kein Ct

C: Nachweis von PMMoV

Die Gültigkeit des PCR-Tests wird durch den negativen NTC des PCR-Laufs und den negativen NTC der cDNA-Synthese angezeigt. Alle Proben zeigen eine Amplifikationskurve, d. h. die Abwasserproben enthielten die PMMoV-Zielsequenz.

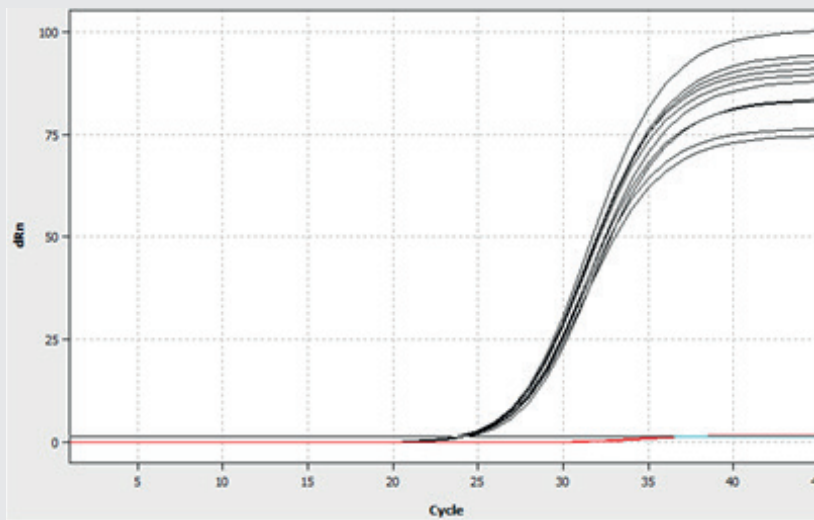


Abb. 13: Amplifikationskurven der FAM-markierten Zielsequenz des PMMoV. Abgebildet sind die Kurven der fünf Probenaliquots, die als Doppelbestimmung analysiert wurden (schwarz), sowie die NTC (rot).

Tabelle 6: Ct-Werte der Amplifikationskurven der PMMoV Zielsequenz.

Probenaliquot	Ø Ct
A	24,16
B	23,92
C	23,92
D	24,10
E	24,33
NTC cDNA Synthese	kein Ct
NTC	kein Ct

Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl das RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 als auch die beiden für HF183/CrAssphage und PMMoV entwickelten Assays wurden erfolgreich zum Nachweis ihrer Zielsequenzen eingesetzt (Abbildung 14). Darüber hinaus war die Assaykohärenz jeweils sehr hoch, wie die Standardabweichungen der Probenreplikate zeigen.

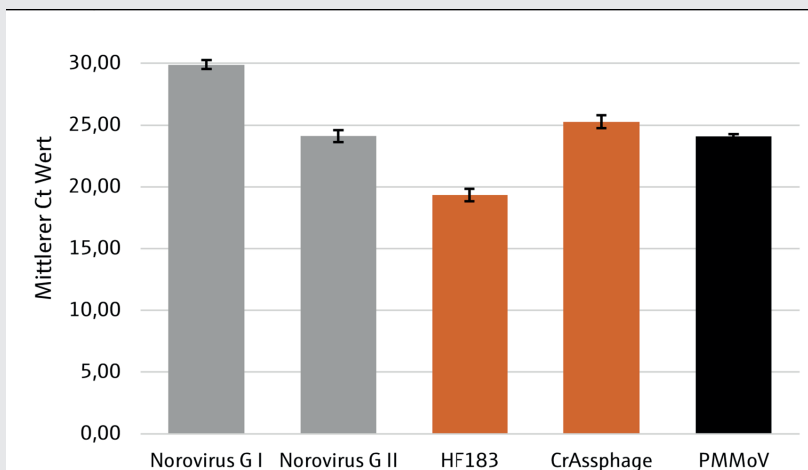


Abb. 14: Überblick über die Ergebnisse der drei Real-Time-PCR-Assays.

Gezeigt sind die mittleren Ct-Werte von fünf Probenaliquots, die jeweils als Duplikate gemessen wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zwischen den Einzelmessungen.

Zusammenfassung

Diese Applikationsschrift demonstriert die erfolgreiche Anpassung des etablierten Arbeitsablaufs für den Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser an neue Zielsequenzen. Darüber hinaus wird gezeigt, dass der Prozess sowohl mit kommerziell erhältlichen PCR-Kits als auch mit Eigenentwicklungen funktioniert. Der verbesserte Arbeitsablauf beinhaltet nun ein neues Proben-transportmedium, das die analytische Zuverlässigkeit weiter erhöht und gleichzeitig die Handhabung deutlich vereinfacht: Nach der Aufkonzentrierung kann das Material auf dem Filter konserviert und bei Raumtemperatur transportiert und mit der SpeedMill PLUS leicht vom Filter gelöst werden.

Alle untersuchten Zielsequenzen von Norovirus, CrAssphage, HF183 und PMMoV wurden in den bearbeiteten Abwasserproben zuverlässig nachgewiesen. Aufgrund der Leistungen der automatisierten Extraktionsplattform InnuPure C16 *touch* und des real-time PCR-Cyclers qTOWER³ ist das Analyseverfahren hoch reproduzierbar und zeigt sehr geringe Standardabweichungen innerhalb der Replikate. Diese Ergebnisse unterstreichen die Eignung der Analysegeräte für die Nukleinsäure-basierte Epidemiologie in der anspruchsvollen Matrix des Abwassers.



Abb. 15: InnuPure C16 *touch* und qTOWER³

Referenzen

- [1] Analytik Jena: Kompletter PCR-basierter Workflow zum Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser, 2021
- [2] W. Ahmed, S. Payyappat, M. Cassidy et al.: A duplex PCR assay for the simultaneous quantification of Bacteroides HF183 and crAssphage CPQ_056 marker genes in untreated sewage and stormwater; Environ Int. 2019 May; 126:252-259. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.035
- [3] P. D'Aoust, E. Mercier, D. Montpetit et al.: Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence; Water Res. 2021 Jan; 188:116560; doi: 10.1016/j.watres.2020.116560

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden, einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.