Aus dem Fachgebiet Umwelt- und Tierhygiene (Prof. Dr. R. Böhm) im Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim

Nachweis von luftgetragenen Viren an Standorten der Abfall- und Abwasserentsorgung

Dissertation Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften vorgelegt der Fakultät IV -Agrarwissenschaften IIder Universität Hohenheim

> von Constanze F. Mayr Diplom-Agrarbiologin aus Eschwege

Die vorliegende Arbeit wurde am 25.06.2002 von der Fakultät IV -Agrarwissenschaften IIder Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	02.07.2002
Dekan:	Prof. Dr. Dabbert
Berichterstatter, 1. Prüfer: Mitberichterstatter: 2. Prüfer: 3. Prüfer:	Prof. Dr. Böhm Prof. Dr. Müller PrivDoz. Dr. Hartung Prof. Dr. Drochner

.....dass diese Furcht zu irren schon der Irrtum selbst ist.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	VIREN IN LUFTGETRAGENEM ZUSTAND	2
211	Definition und Entstehung von Biogerosolen	2
2.1.2	Vorkommen und Übertragung	2
2.1.3	Sammelprinzipien und Sammelgeräte	6
2.1.3.1	Sedimentation	7
2.1.3.2	Impaktion	8
2.1.3.3	Filtration	9
2.1.3.4	Zentrifugation	10
2.1.3.5	Elektropräzipitation	11
2.1.3.6	Impingement	12
2.2	VIREN IN ABWASSER, KLÄRSCHLAMM UND MÜLL	13
2.3	AUFARBEITUNG VON UMWELTPROBEN	18
2.4	VIRUSISOLIERUNG UND -IDENTIFIZIERUNG	21
2.4.1	Physikochemische Methoden	22
2.4.2	Immunologische Methoden	22
2.4.3	Nachweis im Tierversuch	24
2.4.4	Elektronenmikroskopie	
2.4.5	Zellkultur	
2.4.6	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.6.1	Hybridisierung	33
2.4.6.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	33
2.4.6.2.1	Nukleinsäureisolierung	34
2.4.6.2.2	Faktoren, die die RT-PCR beeinflussen	35
2.4.6.2.3	Identifizierung der PCR-Produkte	39
2.4.6.2.4	Quantifizierung von PCR-Produkten	41
2.4.6.2.5	Varianten der PCR	
2.4.6.2.6	Sensitivität der PCR	45
2.4.7	Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises	50
3	MATERIAL UND METHODEN	54
3.1	Zellkultur	54
3.1.1	Kultivierung der verwendeten Zellinien	54
3.1.2	Gefrierkonservierung von Zellen	55
3.1.3	Auftauen von Zellen	56
3.2	VIRUS	57
321	Verwendete Viren und Vermehrung	57
322	Virustitration und Titerberechnung	59
323	Enzymimmunologischer Nachweis von Rotavirus (EIA)	60
3.2.4	Sensitivitätsvergleich des Ridascreen® Rotavirus und des EIA	60
3.2.5	Enzymimmunologischer Nachweis von Hantavirus (EIA)	61

3.2.6	Enzymimmunologischer Nachweis von Hepatitis A-Virus (EIA)	61
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHER VIRUSNACHWEIS	62
3.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	62
3.3.2	Reverse-Transkription (RT-Reaktion)	64
3.3.3	Gelelektrophorese	65
3.3.4	Vorversuche zur DNA- und RNA-Extraktion	65
3.3.5	Vorversuch zum Einsatz von Hybridisierungssonden	68
3.3.6	Etablierung und Optimierung der nested-PCR	69
3.3.6.1	Equines-Rhinovirus	69
3.3.6.1.1	Optimierung der ersten PCR	69
3.3.6.1.2	Virusnachweis und Bestimmung der Sensitivität mit SYBR Green I	70
3.3.6.1.3	Optimierung der zweiten PCR	70
3.3.6.1.4	Etablierung des Spikes und des Standards	71
3.3.6.1.5	Endgültiges Protokoll der nested-PCR	71
3.3.6.2	Humane Enteroviren	73
3.3.6.2.1	Optimierung der ersten PCR	74
3.3.6.2.2	Optimierung der zweiten PCR und Bestimmung der Sensitivität	74
3.3.6.2.3	Etablierung des Standards	75
3.3.6.2.4	Endgültiges Protokoll der nested-PCR	75
3.3.6.3	Protokoll der Poliovirus nested-PCR	76
3.3.6.4	Hepatitis A-Virus	77
3.3.6.4.1	Optimierung der zweiten PCR	77
3.3.6.4.2	Bestimmung der Sensitivität	77
3.3.6.4.3	Endgültiges Protokoll der nested-PCR	78
3.3.6.5	Hepatitis B-Virus	79
3.3.6.5.1	Optimierung der zweiten PCR	79
3.3.6.5.2	Bestimmung der Sensitivität	79
3.3.6.5.3	Endgültiges Protokoll der nested-PCR	79
3.3.6.6	Rotaviren	80
3.3.6.6.1	Optimierung der PCR aus der Literatur und Bestimmung der Sensitivität	81
3.3.6.6.1.1	Optimierung der ersten PCR	81
3.3.6.6.1.2	Optimierung der zweiten PCR	82
3.3.6.6.2	Optimierung der PCR mit neuen Primern und Bestimmung der Sensitivität	83
3.3.6.6.2.1	Optimierung der ersten PCR	83
3.3.6.6.2.2	Optimierung der zweiten PCR	83
3.3.6.6.3	Auswahl neuer Primerkombinationen und Optimierung der PCR	83
3.3.6.6.3.1	Primerkombinationen für die erste PCR	84
3.3.6.6.3.2	Primerkombinationen für die zweite PCR	84
3.3.6.6.3.3	Bestimmung der Sensitivität	85
3.3.6.6.3.4	Optimierung der zweiten PCR	85
3.3.6.6.3.5	Erhöhung der eingesetzten Menge an Template bei der nested-PCR	85
3.3.6.6.4	Endgültiges Protokoll der nested-PCR	85
3.3.6.7	Hantavirus (Puumala und Hantaan)	87
3.3.6.7.1	Bestimmung der Sensitivität	87
3.3.6.7.2	Protokoll der nested-PCR	87
3.3.7	Quantifizierung der PCR-Produkte	88

3.4	Verwendete Sammelgeräte	
3.5	AUFARBEITUNG DER PROBEN ZUM VIRUSNACHWEIS	
3.5.1	Vorversuch zur Vorfiltration	
3.5.2	Vorversuch zur Ultrafiltration	93
3.5.3	Vorversuch zur Ultrazentrifugation mit Stufengradienten	94
3.5.4	Vorversuch zum Gelatineverdau	94
3.5.5	Vorversuche mit Zentrifugenkonzentratoren	94
3.5.5.1	Centriprep-500 (500 kD):	95
3.5.5.2	JumboSep [™] (100 und 300 kD):	95
3.5.5.3	Desinfektion des JumboSep und Centriprep-500:	95
3.5.5.4	Ultrafree-15 (100 kD):	95
3.5.6	Vorversuche zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter	96
3.5.7	Endgültig angewandte Methoden zur Aufarbeitung	
3.5.7.1	Proben der beiden Spezial-Impinger	
3.5.7.2	Proben der "high-volume"-Sammler	96
3.5.7.3	Proben des MD-8 Sammlers	
3.5.7.4	Proben des PGP-GSP-Systems	
3.5.7.5	Substratproben	97
3.6	PROBENAHME BEI AUßENMESSUNGEN UND BESCHREIBUNG DER STANDORTE	97
3.7	Kultureller Virusnachweis	100
371	Isolierung von cytopathogenen Viren	101
3.7.2	Isolierung von humanen Rotaviren	101
3.7.3	Titration und Plaquereinigung der Virusisolate	102
4	ERGEBNISSE	103
4.1	VORVERSUCHE ZUM EIA VON HANTAVIREN, HEPATITIS A-VIRUS UND ROTAVIRUS	103
4.2	VORVERSUCHE ZUR RNA- UND DNA EXTRAKTION	104
4.3	VORVERSUCH ZUM EINSATZ VON HYBRIDISIERUNGSSONDEN	106
4.4	ETABLIERUNG DER NESTED-PCR SYSTEME	107
4.4.1	Equines-Rhinovirus	108
4.4.1.1	Optimierung der ersten PCR	
4.4.1.2	Virusnachweis mit SYBR Green I und Bestimmung der Sensitivität	108
4.4.1.3	Optimierung der zweiten PCR	110
4.4.1.4	Etablierung des Standards	112
4.4.1.5	Endgültiges Protokoll	114
4.4.2	Humane Enteroviren	114
4.4.2.1	Optimierung der ersten PCR	115
4.4.2.2	Optimierung der zweiten PCR und Bestimmung der Sensitivität	115
4.4.2.3	Etablierung des Standards	121
4.4.2.4	Endgültiges Protokoll	122
4.4.3	Hepatitis A-Virus	122
4.4.3.1	Optimierung der zweiten PCR	122
4.4.3.2	Bestimmung der Sensitivität	123
4.4.3.3	Endgültiges Protokoll	124

4.4.4	Hepatitis B-Virus	125
4.4.4.1	Optimierung der zweiten PCR	125
4.4.4.2	Bestimmung der Sensitivität	126
4.4.4.3	Endgültiges Protokoll	127
4.4.5	Rotaviren	128
4.4.5.1	Optimierung der PCR aus der Literatur	128
4.4.5.1.1	Optimierung der ersten PCR	128
4.4.5.1.2	Optimierung der zweiten PCR	129
4.4.5.2	Optimierung der PCR mit neuen Primern	135
4.4.5.2.1	Optimierung der ersten PCR	135
4.4.5.2.2	Optimierung der zweiten PCR	138
4.4.5.3	Auswahl neuer Primerkombinationen	143
4.4.5.3.1	Primer für die erste PCR	143
4.4.5.3.2	Primer für die zweite PCR	144
4.4.5.3.3	Bestimmung der Sensitivität	147
4.4.5.3.4	Optimierung der zweiten PCR	148
4.4.5.3.5	Templateerhöhung der nested-PCR	150
4.4.5.4	Endgültiges Protokoll	152
4.4.6	Hantavirus	152
4.4.6.1	Bestimmung der Sensitivität	152
4 5	ETA DI IDDING DED METHODEN ZUD DODENA USA DDEIZUNG	152
4.5	E TABLIERUNG DER METHODEN ZUR PROBENAUFARBEITUNG	155
4.5.1	Vorversuche zur Vor- und Ultrafiltration	153
4.5.2	Vorversuche zur Ultrazentrifugation mit Stufengradienten	155
4.5.3	Vorversuch zur Wirkung von Trypsin	156
4.5.4	Vorversuche mit Zentrifugenkonzentratoren	157
	e	
4.5.5	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter	159
4.5.5 4.5.6	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode	159 160
4.5.5 4.5.6 4.6	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE	159 160 161
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE	159 160 161 162
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE	159 160 161 162 163
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE	159 160 161 162 163 166
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	159 160 161 162 163 166 168
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal	159 160 161 162 163 166 168 170
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis	159 160 161 162 163 166 168 170 170
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kerspeich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE. Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis.	159 160 161 162 163 166 166 168 170 170 172 173 174 174
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis.	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174 174 176
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 173 174 176 177
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Mülldeponie Gelnhausen-Haller	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 173 174 174 176 179
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE. Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Molekularbiologischer Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Mülldeponie Gelnhausen-Haller Kultureller Virusnachweis.	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 174 174 174 176 179 179 179
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1 4.6.4.2	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE. Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises Mülldeponie Gelnhausen-Haller Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 173 174 174 176 179 179 179 181
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1 4.6.4.2 4.6.4.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE. Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174 174 174 174 174 175 176 177 179 181 181
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1 4.6.4.2 4.6.4.3 4.6.5	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis Molekularbiologischer Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München Kultureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kürtureller Virusnachweis Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kultureller Virusnachweis Mölekularbiologischer Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultureller Virusnachweis Kultaralage Stuttgart Mühlhausen	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 173 174 174 174 179 179 181 181 182
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1 4.6.4.2 4.6.4.3 4.6.5 4.6.5.1	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUBENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München Kultureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärutureller Virusnachweis. Klätureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kläranlage Stuttgart Mühlhausen Kultureller Virusnachweis.	159 160 161 162 163 166 168 170 170 170 172 173 174 174 176 179 179 181 182 183
$\begin{array}{c} 4.5.5\\ 4.5.6\\ \hline \textbf{4.6.1}\\ 4.6.1.1\\ 4.6.1.2\\ 4.6.1.3\\ 4.6.2\\ 4.6.2.1\\ 4.6.2.2\\ 4.6.2.3\\ 4.6.3\\ 4.6.3.1\\ 4.6.3.2\\ 4.6.3.3\\ 4.6.4\\ 4.6.4.1\\ 4.6.4.2\\ 4.6.4.3\\ 4.6.5\\ 4.6.5.1\\ 4.6.5.2\end{array}$	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kreismülldeponie Bruchsal Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Molekularbiologischer Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Klärwerk München. Kultureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kürtureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kültureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Kultureller Virusnachweis. Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises. Kläranlage Stuttgart Mühlhausen Kultureller Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis. Molekularbiologischer Virusnachweis.	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174 175 174 175 176 177 179 181 181 182 183 183
4.5.5 4.5.6 4.6 4.6.1 4.6.1.1 4.6.1.2 4.6.1.3 4.6.2 4.6.2.1 4.6.2.2 4.6.2.3 4.6.3 4.6.3 4.6.3.1 4.6.3.2 4.6.3.3 4.6.4 4.6.4.1 4.6.4.2 4.6.4.3 4.6.5 4.6.5.1 4.6.5.2 4.6.5.3	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174 174 175 174 174 174 175 179 179 181 182 183 185 186
$\begin{array}{r} 4.5.5\\ 4.5.6\\ \hline \textbf{4.6.1}\\ 4.6.1.1\\ 4.6.1.2\\ 4.6.1.3\\ 4.6.2\\ 4.6.2.1\\ 4.6.2.2\\ 4.6.2.3\\ 4.6.3.3\\ 4.6.3.1\\ 4.6.3.2\\ 4.6.3.3\\ 4.6.4\\ 4.6.4.1\\ 4.6.4.2\\ 4.6.4.3\\ 4.6.5\\ 4.6.5.1\\ 4.6.5.2\\ 4.6.5.3\\ 4.6.6\end{array}$	Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter. Endgültige Methode	159 160 161 162 163 166 168 170 170 172 173 174 175 174 175 174 175 176 177 179 181 181 182 183 185 186 187

4.6.6.2	Molekularbiologischer Virusnachweis	190
4.6.6.3	Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	
4.6.7	Abbruchgelände Augsburg	192
4.6.7.1	Kultureller Virusnachweis	
4.6.7.2	Molekularbiologischer Virusnachweis	194
4.6.7.3	Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	
4.6.8	Kanalisation Stuttgart	
4.6.8.1	Kultureller Virusnachweis	
4.6.8.2	Molekularbiologischer Virusnachweis	
4.6.8.3	Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	
4.6.9	Kläranlage Stuttgart Plieningen	
4.6.9.1	Kultureller Virusnachweis.	
4.6.9.2	Molekularbiologischer Virusnachweis	
4.0.9.3	Vergielen des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises	
4.0.10	Kulturallar Virusnachwais	
4.0.10.1	Molekularhiologischer Virusnachweis	
4.0.10.2		
4.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE	
5	DISKUSSION	
5 1		200
5.1	WIETHODIK DER VERSUCHSDURCHFUHRUNGEN	
5.1.1	Probenahme	
5.1.2	Aufarbeitung der Sammelflüssigkeiten	
5.1.3	Inokulation der Zellkulturen	
5.1.4	Molekularbiologischer Virusnachweis	
5.2	ERGEBNISSE DER AUßENVERSUCHE UND DEREN BEDEUTUNG	226
5.2.1	Untersuchung auf Hantaviren	
5.2.2	Untersuchung auf Hepatitis A-Virus	
5.2.3	Untersuchung auf Rotaviren	
5.2.4	Untersuchung auf Hepatitis B-Virus	
5.2.5	Untersuchung auf humane Enteroviren	
5.2.5.1	Humane Enteroviren in Luft	
5.2.5.2	Humane Enteroviren in Abwasser	
6	ZUSAMMENFASSUNG	
7	SUMMARY	239
-		
8	LITERATURVERZEICHNIS	
9	ANHANG	
9.1	Rezepte der verwendeten Lösungen	
9.2	ERGEBNISTABELLEN ZUR BESTIMMUNG DER INHIBITION	
9.3	ERGEBNISTABELLEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER HUMANEN	
	Enteroviren	

Abkürzungen	
Abb.	Abbildung
AC	antigen-capture
AEC	9-Ethylcarbazol-3-Ylammin 3-Amino-9-Ethylcarbazole 9-Etilcarbazol-3-Ilammina
AGI	All-Glass-Impinger
bp	Basenpaare
BMS	Basal-Medium-Supplement
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cpe	cytopathischer Effekt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
EM	Elektronenmikroskopie
FFU	Fluoreszenzbildende Einheit (focus forming units)
FKS	Foetales Kälberserum
GITC	Guanidinthiocyanat
HFRS	Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom
IFT	Immunfluoreszenztest
kD	kilo-Dalton
KSF	Zentrifugalsammlers nach Schiff
KID ₅₀	kulturinfektiöse Dosis50
LEAP	Environmental research corps's LEAP-Sampler
LVS	Litton high volume air sampler
М	Marker
MKS	Maul-und-Klauen-Seuche
MPNCU	Most Probable Number cytopathogene Einheiten (cytopathogenic Unit)

NEA	Non-essential-amino-acids
neg.	negativ
NK	Negativkontrolle
PEG	Polyethylenglycol
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFU	Plaquebildende Einheit (plaque forming units)
РК	Positivkontrolle
R^2	Korrelationskoeffizient
RCS	Reuter-Centrifugal-Sammler
RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	Reverse-Transkription
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Eisessig-EDTA-Puffer
UV	Ultra Violett
w/v	Gewicht pro Volumen
ZK	Zellkontrolle
ZKÜ	Zellkulturüberstand
x g	Beschleunigung

1 Einleitung

Die moderne menschliche Gesellschaft hat einigen Erregern Wege zur Infektion und Verbreitung eröffnet, die ihnen unter "natürlichen" Umständen nicht bzw. nicht in diesem Umfang zur Verfügung stehen. Im Zusammenhang mit der Behandlung und Entsorgung von menschlichen Fäkalien und Abfällen, die mit solchen Fäkalien kontaminiert sein könnten, muss dabei an die erhebliche Konzentrierung gedacht werden, die solche Stoffe heutzutage erfahren. Ebenso werden sie bei der Behandlung oft in erheblichem Umfang mechanisch bewegt. Dadurch können Viren, die in diesen Stoffen enthalten sind, in den luftgetragenen Zustand übergehen (Bildung von Bioaerosolen). Solche Viren könnten unter Umständen ein Risiko einer aerogenen Infektion bedeuten, auch wenn sie normalerweise nicht durch die Luft, sondern auf fäkal-oralem Weg übertragen werden.

Personen, die ein erhöhtes Risiko für solche Infektionen tragen könnten, sind wegen der Häufigkeit der Exposition unter anderem die Beschäftigten, die im Bereich der Abwasser- und Abfallentsorgung arbeiten. Es konnten in der Umgebungsluft von Kläranlagen und in der Luft an verschiedenen Standorten von Abfallbehandlungsanlagen mehrfach humane Enteroviren nachgewiesen werden (PFIRRMANN, 1994; FANNIN et al., 1987; CARDUCCI et al., 2000). Die meisten Erreger erwiesen sich als Echo- und Coxsackieviren. Es wurde aber auch luftgetragenes Poliovirus gefunden (SETTNISCH et al., 1982). Die Zahl der durchgeführten Untersuchungen reicht nicht aus, um eine abschätzende Aussage treffen zu können, ob, welche und wie häufig luftgetragene Viren an solchen Standorten anzutreffen sind.

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Luft bei Beschäftigten in Kläranlagen, in Kanalisationen (Kanalsanierung) und auf Mülldeponien (Deponiesanierung) auf das Vorhandensein von potentiell humanpathogenen Viren untersucht werden. Neben dem Nachweis von Hepatitis B-Virus und Hantaviren stand vor allem die Suche nach Hepatitis A-Virus, Rotaviren und humanen Enteroviren im Vordergrund.

Die Messstrategie stützte sich auf die Verwendung mehrerer Sammelgeräte mit unterschiedlichen physikalischen Abscheideprinzipien zur standortbezogenen Luftkeimmessung und auf das personengetragene Gefahrstoff-Probenahmesystem (PGP-GSP-System), mit dem die Exposition einzelner Arbeitnehmer während ihrer Tätigkeit untersucht werden kann. Aus den Proben der standortbezogenen Luftkeimmessung erfolgte der Virusnachweis sowohl über kulturelle Anzucht als auch unter Verwendung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion). Die so gewonnenen Daten sollten zum einen einen Überblick über Art, Häufigkeit und Konzentration der Erreger an diesen Standorten liefern, als auch die Nachweistechnik, insbesondere mit der PCR, in der Sensitivität steigern. Die personenbezogenen Luftkeimproben wurden mit der weiterentwickelten Technik des PCR-Nachweises untersucht.

2 Literatur

2.1 Viren in luftgetragenem Zustand

2.1.1 Definition und Entstehung von Bioaerosolen

Aerosole sind in einem gasförmigen Medium suspendierte Teilchen, die sich im festen oder flüssigen Aggregatzustand befinden (JARNYCH, 1976). Die Teilchen können anorganischen oder organischen Ursprungs sein. Hier interessieren nur die Teilchen organischen Ursprungs, die so genannten "Bioaerosole". THORNE et al. (1992) sprechen bei hygienisch relevanten Bioaerosolen von einem komplexen Gemisch aus lebenden und toten Mikroorganismen und deren Produkten.

Mikrobiologische Aerosole entstehen sowohl auf natürliche Weise z.B. Husten, Niesen, Sprechen, Wind (Staubwolken und Wassertröpfchen) und Erdrutsch, als auch durch anthropogene Prozesse. Die anthropogene Aerosolentstehung steht im Rahmen dieses Projektes im Vordergrund. Dabei kann man zwischen sogenannten "*indoor*"- und "*outdoor*"- Umgebungen unterscheiden (STETZENBACH, 1997). Im "*indoor*"-Bereich entstehen sie beispielsweise bei Laborarbeiten (HANSON et al., 1967), beim Fegen staubiger Räume (PILASKI et al., 1991), durch Klima- und Belüftungsanlagen (BLOCH et al., 1985), bei der Toilettenspülung (GERBA et al., 1975) oder bei Arbeitsprozessen in der Industrie (STETZENBACH, 1997). "*Outdoor*" werden sie z.B. in Bereichen der Müllverarbeitung auf Deponien und während der Tätigkeit in Kompostierungsanlagen (PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE, 1994), bei der Verrieselung von Abwässern (TELTSCH et al., 1980) oder bei der Belüftung von Abwasser in Kläranlagen hervorgerufen (SETTNISCH et al., 1982). Eine ausführliche Übersichtstabelle anthropogener Bioaerosole und deren Untersuchungen ist in der Publikation von STETZENBACH (1997) dargestellt. Auffallend ist dabei, dass sich nur wenige Studien mit Virusaerosolen beschäftigen.

2.1.2 Vorkommen und Übertragung

Allgemeine Voraussetzungen für eine aerogene Übertragung von Viren sind, neben günstigen klimatischen und meteorologischen Bedingungen, infektiöse Wirkung bei der Aufnahme der Viren über den Respirationstrakt, hohe Populationsdichten empfänglicher Individuen, Ausscheidung hoher Viruskonzentrationen und vor allem eine hohe Tenazität in der Atmosphäre (KAADEN, 1985). Unter Feldbedingungen haben zahlreiche Faktoren der Luft, wie Sonneneinstrahlung (DONALDSON und FERRIS, 1975; STOLZE und KAADEN, 1989; HYSLOP et al., 1971), chemische Faktoren (EHRLICH und MILLER, 1972), Temperatur, Windgeschwindigkeit und Luftfeuchtigkeit (SETTNISCH et al., 1982) Einfluss auf die Stabilität infektiöser Aerosole. Der Effekt der relativen Luftfeuchte und der Temperatur wurde unter experimentellen Bedingungen in Aerosolkammern an den unterschiedlichsten Viren besonders gut studiert. Laut MOHR (1997), STETZENBACH (1997), IJAZ et al. (1987) und BOURGUEIL et al. (1992a) handelt es sich hierbei um die beiden wichtigsten Umweltparameter, die sowohl bei Aerosolstudien, als auch bei Feldversuchen während den Luftkeimmessungen häufig dokumentiert werden. Viren haben im Allgemeinen bei niedrigen Temperaturen eine hohe Überlebensfähigkeit (HYSLOP, 1971). Behüllte Viren zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber hohen Luftfeuchten (BOURGUEIL et al., 1992a). Eine generell gültige Aussage über die inaktivierende oder stabilisierende Wirkung bestimmter Luftfeuchten kann jedoch nicht gezogen werden. Vielmehr kann die Infektiosität einzelner Virusspezies auch innerhalb einer Familie unterschiedlich beeinflusst werden (HYSLOP, 1971).

Eine Auswertung der in der Literatur mitgeteilten Befunde zeigt, dass es zahlreiche tier- und humanpathogene Viren gibt, die im luftgetragenen Zustand nachgewiesen werden können. Dabei handelt es sich zum Großteil um Aerosolkammerversuche, in denen Virussuspensionen vernebelt werden, um die Stabilität der Viren unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Jedes Virus, das im luftgetragenen Zustand stabil bleibt, kann potentiell auf dem Luftweg übertragen werden (SATTAR und IJAZ, 1997). Ein Zusammenhang zwischen Virusaerosol und einer potentiellen Infektionsgefahr für Mensch und Tier kann jedoch nur anhand epidemiologischer Studien geklärt werden.

Neben den experimentellen Studien in der Aerosolkammer wurden viele Untersuchungen zur aerogenen Übertragung von Viren in geschlossenen Räumen, so genannte "indoor"-Versuche, durchgeführt. MOORE et al. (1975) diskutieren beispielsweise die mögliche Übertragung von Hepatitis durch Aerosole, die beim Dialyseprozeß entstehen können. Hierzu simulierten sie, unter Verwendung eines Bakteriophagen, verschiedene Tätigkeiten wie z.B. das Legen von Infusionsnadeln oder das Zerplatzen von Blutflaschen. Den Einfluss von Regen auf die aerogene Übertragung von MKS-Virus untersuchten SELLERS und HERNIMAN (1972), indem sie infizierte Tierställe mit unterschiedlichen Wassermengen ausspritzten. GERBA et al. (1975) untersuchten experimentell die Verbreitung von Viren beim Spülvorgang von Toiletten, wobei sie Poliovirus Typ 1 repräsentativ für Enteroviren einsetzten. Die Ergebnisse zeigten, dass die eingesetzten Viren beim Spülvorgang in der Umgebung der Toilette verteilt werden. Es wird angenommen, dass die frei werdenden Viruskonzentrationen ausreichend sind, um eine Infektion auszulösen. Eine ähnliche Studie wurde von WALLIS et al. (1985) durchgeführt. Des weiteren wurden Untersuchungen zur aerogenen Übertragung von MKS-Virus (DONALDSON et al., 1970), Polyoma-Virus (McGARRITY und DION, 1978), Porcines-respiratorisches-Coronavirus (BOURGUEIL et al., 1992a) Afrikanisches-Schweinefieber-Virus (WILKINSON et al., 1977) und Aujeszky-Virus (BOURGUEIL et al., 1992b) innerhalb von Tierstallungen durchgeführt. Im Bereich der humanpathogenen Viren isolierten ARTENSTEIN und MILLER bereits 1966 Adenovirus Typ 4 aus Unterkünften von erkrankten Soldaten. Die aerogene Übertragung von Arboviren, die vor allem bei Laborpersonal zu Infektionen führt, beschreiben HANSON et al. (1967). Ein Drittel aller Laborinfektionen sind auf eine Übertragung durch infektiöse Aerosole zurückzuführen (VAN DER MEYDEN et al., 1992). MENKHAUS et al. (1990) und LeCLAIR et al. (1980) berichten vom Variecella-Zoster-Virus (Windpocken) und ANONYM a) (1970) von Smallpox-Virus (Pocken), das auf dem Luftweg in einem Krankenhaus übertragen wurde. Sowohl an Bord eines Schiffes (HO et al., 1989) als auch bei einer 3-tägigen Busreise (CHADWICK et al., 1994) und in einem Krankenhaus (SWYER, 1988) brach eine Gastroenteritis aus, deren Ursache ein durch Flüssigkeitsaerosole verbreitetes "small-roundstructured" Virus (Norwalkvirus) war. Die aerogene Übertragung von Masern in einer Praxis dokumentieren BLOCH et al. (1985).

Die Ausbreitung luftgetragener Viren kann jedoch auch über große Distanzen erfolgen und am Ort ihrer Verfrachtung zu Neuausbrüchen führen. Die aerogene Ausbreitung des Aujeszky-Virus über die Deutsch-Dänische Grenze im Winter 1987/88 konnte von CHRIS-TENSEN et al. (1990) bewiesen werden. In einem Fall wurden mehr als 80 km zurückgelegt. Die klimatischen Bedingungen während dieser Jahreszeit (mittlere Luftfeuchtigkeit und niedrige Temperaturen) begünstigten die Ausbreitung (CHRISTENSEN et al., 1993). Auch die Verbreitung des infektiösen MKS-Virus ist in der Literatur hinreichend dokumentiert. SELLERS und GLOSTER (1980) berichten, dass die Viren im luftgetragenen Zustand bis zu 20 km zurücklegen können und am Ort der Verfrachtung zu Infektionen führen. Es wird aber auch von Verbreitungen über das Meer berichtet (GLOSTER et al., 1982). Eine Übertragung des Influenza-Virus über weite Entfernungen hinweg wird vermutet (HAMMOND et al.,

1989). Auf eine mögliche aerogene Übertragung von Rotaviren wird in einer Studie von COOK et al. (1990) zum jahreszeitlich bedingten Auftreten von Diarrhoe bei Kindern und einer Untersuchung von SATTAR et al. (1984) hingewiesen. Nach Angaben von IJAZ et al. (1994) wurden bisher noch keine Versuche zur Isolierung natürlich vorkommender Rotaviren im luftgetragenen Zustand durchgeführt. Doch wenn sie in der Umwelt in gleichem Ausmaß wie an das Labor adaptierte Stämme stabil sind, kann mit einer aerogenen Virusverbreitung an Standorten wie z.B. Kläranlagen gerechnet werden (IJAZ et al., 1994). Rotaviren, erstmals von BISHOP et al. 1973 entdeckt, sind der Familie der Reoviridae zugehörig, die als einzige Viren ein segmentiertes, doppelsträngiges RNA-Genom besitzen. Die Virionen haben keine Membranhülle. Sie besitzen eine hohe Stabilität und können daher in der Umwelt längere Zeit überdauern (GENTHE et al., 1991). Zahlreiche Aerosolstudien ergaben, dass die Viren bei einer mittleren Luftfeuchte (50 %) und niedrigen Temperaturen am stabilsten sind (IJAZ et al., 1994; SATTAR et al., 1984). Dies erklärt möglicherweise auch das saisonale Auftreten von Erkrankungen. Infektionen treten gehäuft in den kühleren Monaten auf (COOK et al., 1990). Eine Langzeitstudie über fünf Jahre in einer Pariser Kinderklinik ergab, dass die meisten Erkrankungen in den Monaten Dezember und Januar in Erscheinung treten (GENDREL et al., 1999). Beim Menschen handelt es sich meist um Rotaviren vom Subtyp A. Sie sind weltweit die Hauptursache von schweren Durchfallerkrankungen bei Kindern (DESSELBERGER, 1996; WILDE et al., 1990). BURKE und DESSELBERGER (1996) und PARASHAR et al. (1998) berichten von jährlich 800000 bis 850000 Todesfällen, wobei die meisten in den Entwicklungsländern registriert werden. Die Erreger werden oral aufgenommen, infizieren die Epithelzellen der Dünndarmzotten, vermehren sich dort und werden mit dem Stuhl ausgeschieden (MODROW und FALKE, 1997). Nach Informationen von WARD et al. (1986) ist das Rotavirus sehr infektiös. Schon eine bis zwei plaquebildende Einheiten (plaque forming units, PFU) kann zu einer Infektion führen.

Die Auswertung der Literatur zeigte außerdem, dass weitaus weniger Versuche zur Isolierung viraler Erreger unter so genannten "outdoor"-Verhältnissen durchgeführt wurden. HUGH-JONES et al. (1973) gelang es, Newcastle-Disesase-Virus in einer Entfernung von 64 m und MACK et al. (1986), Aujeszky-Virus in einer Distanz von 9 km von der Emissionsquelle zu isolieren. Bei Luftuntersuchungen in der Umgebung von belüfteten Abwasserreinigungsbecken konnten SETTNISCH et al. (1982) bei einer Entfernung von bis zu 20 m humane Enteroviren (Echo Typ 11, Coxsackie Typ B3 und Poliovirus Typ 2) isolieren. Dabei erwiesen sich im Frühjahr von 24 Proben vier als positiv, wohingegen im Winter sechs der untersuchten 11 Proben positive Ergebnisse lieferten. In einer Studie von FANNIN et al. (1985) gelang es in zwei von neun Proben Coxsackievirus Typ B1 nachzuweisen. Auch hier wurde die Luftkeimsammlung auf dem Gelände einer Kläranlage durchgeführt. Entsprechende Messungen führten CARDUCCI et al. (1995) durch. In einer Entfernung von 2 m vom Belüftungsbecken wiesen sie Enteroviren nach. Ein verstärktes Vorkommen wurde dabei zwischen den Monaten August und November registriert. In einer weiteren Untersuchung wurden sowohl "outdoor"- als auch "indoor"-Proben gezogen. Neben Enteroviren wurden dabei hauptsächlich Reoviren detektiert. Die höchsten Viruskonzentrationen konnten die Autoren im Bereich der Klärschlammbehandlung und der eingehausten Waschanlage ermitteln (CARDUCCI et al., 2000). Bei der Verregnung von Abwasser bilden sich Flüssigkeitsaerosole, die unter entsprechenden meteorologischen und klimatischen Bedingungen Kilometer weit transportiert werden können. Hierzu untersuchten TELTSCH et al. (1980) in einem Feldversuch das Vorkommen und die Ausbreitung humaner Enteroviren. Bei den Isolaten handelte es sich um Polio Typ 1 und 2, Coxsackie Typ B1 und verschiedene Echoviren. Es konnte bei einer Entfernung von 100 m vom Bewässerungsspränkler noch Poliovirus nachgewiesen werden. Eine ähnliche Untersuchung wurde von TELTSCH und KATZENELSON (1978) durchgeführt. Hier erwiesen sich vier der im Abstand von 40 m gesammelten 12 Luftproben als virus-positiv (Echo Typ 7). MOORE et al. (1979) führten ebenfalls Luftkeimmessungen während der Verrieselung von Abwasser durch. Sie detektierten Poliovirus 1 und 2 und Coxsackievirus B3. PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE (1994) untersuchten die Luft von verschiedenen Abfallbeseitigungs- und Abfallverwertungsanlagen. Dabei konnten sie sowohl auf einer Mülldeponie als auch in einer Müllverbrennungsanlage Enteroviren (Coxsackie und Echovirus) isolieren.

Alle Vertreter der Gattung Enterovirus gehören zur Familie der Picornaviridae. Dabei handelt es sich um sehr kleine Viruspartikel (28-30 nm), die aus einem Kapsid ohne umgebende Membranhülle und einer einzelsträngigen RNA bestehen. Hierzu gehören das Poliovirus, Coxsackieviren, Echoviren und die Enteroviren. Sie wurden erstmals 1941 von PAUL und TRASK (1941) isoliert. Alle enteritischen Viren zeichnen sich durch eine hohe Stabilität in der Umwelt, auch im luftgetragenen Zustand, aus (STETZENBACH, 1997). Aerosolstudien von IJAZ et al. (1987) zeigten, dass Poliovirus bei einer hohen Luftfeuchtigkeit am stabilsten ist. Obwohl sie in der Umwelt nur in geringen Konzentrationen vorkommen, stellen sie ein gesundheitliches Risiko dar (PUIG et al., 1994; GANTZER et al., 1997; ABBASZADEGAN et al., 1999). Schon geringe Virusmengen sind für eine Infektion ausreichend (ABBAS-ZADEGAN et al., 1993). Nach Angaben von SNOWDON et al. (1989) sind ein bis 200 Viruspartikel und nach HURST (1989) 1 PFU für eine Infektion notwendig. Die Übertragung der Enteroviren erfolgt vor allem auf fäkal-oralem Weg (KOPECKA et al., 1993). Die Bedeutung der Enteroviren als Ursache unterschiedlichster Krankheiten wurde lange Zeit unterschätzt (FOHLMAN et al., 1997). Mit ihren 67 Serotypen handelt es sich um die größte und wichtigste Gruppe humanpathogener Viren (ROMERO et al., 1995). Alleine in den USA werden schätzungsweise jährlich fünf bis 10 Millionen aller akut symptomatisch verlaufenden Krankheiten durch Enteroviren hervorgerufen (STRIKAS et al., 1986). Noch 1992 wurden weltweit insgesamt über 150000 Fälle von Kinderlähmung, durch das Poliovirus hervorgerufen, registriert (MODROW und FALKE, 1997). Von Meningitis-Ausbrüchen, vor allem bei Kindern, wird häufig berichtet (SAWYER, 1999). So schildern CHAMBON et al. (1999) einen Ausbruch in Frankreich und VALDEZATE et al. (1998) in Spanien. In beiden Fällen wurden Echoviren diagnostiziert. Meist verläuft jedoch eine Infektion mit Coxsackie-, Echound Enteroviren asymptomatisch (POZO et al., 1998). Neben den Rotavirusinfektionen wird auch bei den humanen Enteroviren von einem saisonalen Auftreten berichtet. So treten sie vermehrt im Sommer und Herbst in Erscheinung (SAWYER, 1999). In den Tropen sind sie das ganze Jahr über vertreten (NAIRN und CLEMENTS, 1999). NAIRN und CLEMENTS (1999) fassen in ihrer Studie das Ergebnis einer 20 Jahre langen Beobachtung von Enterovirusinfektionen in Schottland zusammen. In den Jahren 1977 bis 1997 wurden insgesamt 3039 Enteroviren aus Patientenmaterial isoliert, von denen sich 67 % als Echoviren, 14,2 % als Coxsackie B und 5,6 % als Coxsackievirus vom Typ A erwiesen. In keinem Fall konnte ein Poliovirus vom Wildtyp nachgewiesen werden. Alle 391 (13 %) Isolate erwiesen sich als Impfstämme oder importierte Viren. Im Gegensatz dazu wurden in der Zeit zwischen 1967 und 1974 zu 55,4 % Echoviren und zu 44,6 % Coxsackie A und B differenziert (GRIST et al., 1978 zitiert nach NAIRN und CLEMENTS, 1999).

Weitere Viren, die über Staub und Aerosole übertragen werden können, sind die **Hantaviren** (KIM et al., 1994). Die weltweit verbreiteten Viren gehören neben vier weiteren Gattungen zur Familie der *Bunyaviridae*. Alle Bunyaviren besitzen ein in drei Segmente gegliedertes, einzelsträngiges RNA-Genom, das mit zwei Proteinen zu Nukleokapsiden komplexiert ist. Die Nukleokapside sind von einer Hüllmembran umgeben. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von 100 bis 120 nm (MODROW und FALKE, 1997). Das Virus (Subtyp Hantaan) wurde erstmals 1978 in Korea in Gewebekultur isoliert (LEE et al., 1978). Inzwischen sind mehrere Subtypen bekannt, wobei in Deutschland vor allem Puumala-

ähnliche Viren von Bedeutung sind (SCHMITZ, 1996). Hantaviren persistieren in den Geweben infizierter Nager, die klinisch nicht erkrankt sind und werden über Speichel, Urin und Kot ausgeschieden (LEE et al., 1984, zitiert nach TENNSTEDT et al., 1994). Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Hantastämmen auch diejenigen zwischen den als Reservoir fungierenden Nagern widerspiegeln (SCHMITZ, 1996). Die Hantavirus-induzierten Erkrankungen werden unter dem Begriff "Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom" (HFRS) zusammengefaßt (ZÖLLER und ZEIER, 1990). PILASKI et al. (1991) zeigten in ihrer Studie, dass HFRS in Deutschland endemisch verbreitet ist. Im Zeitraum zwischen 1985 und 1991 wurden insgesamt 26 klinische Fälle vorwiegend im Südwesten der Bundesrepublik festgestellt. Des Weiteren untersuchten sie einzelne wild lebende Nagetierarten, wobei diese unterschiedlich durchseucht waren. 30 % aller positiven Nager waren Feldmäuse, 27,3 % Wanderratten, 13,3 % Hausmäuse und 0,7 % Rötelmäuse. Der für den Menschen besonders pathogene Typ dürfte jedoch vorwiegend durch die Rötelmaus während der Sommermonate übertragen worden sein. Bei zwei Patienten, die sich während der Wintermonate beim Aufräumen eines staubigen Stalles oder Dachbodens infiziert hatten, war ein Kontakt mit Wanderratten wahrscheinlich. Über ein weiteres endemisches Auftreten im Kreis Reutlingen und dem Nordrand der Schwäbischen Alb berichten SCHUBERT et al. (1991). Aus diesem Einzugsgebiet wurden in den Jahren 1987 bis 1990 insgesamt neun Patienten mit klinisch manifester Hantanephritis stationär behandelt. In einer umfassenden seroepidemiologischen Studie in Ostdeutschland sind bei 0,8 % der Bevölkerung Hanta-Antikörper nachgewiesen worden, wobei sie bei Waldarbeitern und Tierpflegern mit Nagerkontakt besonders hoch waren (TENNSTEDT et al., 1994). Nach Angaben von KULZER und HEIDLAND (1994) besteht vor allem bei Personen, die sich vermehrt in Wälder, Feldern, Bauernhöfen oder in der Nähe von Wasser aufhalten ein erhöhtes Infektionsrisiko.

Sowohl die Befunde der "*indoor*" und "*outdoor*"-Untersuchungen, als auch die Ergebnisse der Aerosolstudien müssen jedoch teilweise sehr kritisch betrachtet werden. Noch heute existieren weder für die Sammlung noch für den Nachweis von Virusaerosolen Standardprotokolle, was den Vergleich der Daten unterschiedlicher Untersuchungen erschwert (BUTTNER et al., 1997; SATTAR und IJAZ, 1997; IJAZ et al., 1987). Es werden verschiedene Luftkeim-sammler eingesetzt, die mit unterschiedlichen Luftdurchflussraten, Sammelmedien und Zeiten betrieben werden. Des Weiteren ergeben sich Unterschiede in der Aerosolzusammensetzung (vor allem bei Aerosolstudien), der Lagerung und im Transport der Proben, in der Überprüfung der Umweltparameter (Temperatur und relative Luftfeuchte), im eigentlichen Erregernachweis und der Datenpräsentation. In vielen Untersuchungen zur aerogenen Übertragbarkeit bestimmter Viren wird mit nicht definierten oder unrealistisch hohen Erregerkonzentrationen im erzeugten Aerosol gearbeitet. Häufig ist auch durch den Versuchsaufbau eine nicht aerogene Infektion nicht auszuschließen. Des weiteren werden fast ausschließlich an das Labor adaptierte Virusstämme für die Untersuchungen eingesetzt (SATTAR und IJAZ, 1997).

2.1.3 Sammelprinzipien und Sammelgeräte

Die Bestimmung pathogener Virusaerosole ist schwierig, da sie in der Umwelt nur in geringen Konzentrationen vorkommen (CARDUCCI et al., 1995). Von der Vielzahl der Sammelmethoden, die für luftgetragenen Bakterien, Pilzsporen oder Pollen entwickelt worden sind, sind die meisten auch für luftgetragene Viren geeignet (SPENDLOVE und FANNIN, 1982). Notwendige Modifikationen betreffen vor allem die Art des Sammelmediums. Eine wichtige Voraussetzung für das Erzielen guter Sammelausbeuten ist ein Sammelmedium, welches aufgrund seiner Zusammensetzung die abgeschiedenen Viren zu stabilisieren und ihre Infektiosität auch über einen längeren Zeitraum zu konservieren vermag. Daneben sollte

das Sammelmedium für den Erregernachweis in Kultur nicht toxisch wirken und für den molekularbiologischen Nachweis keine inhibitorische Wirkung haben. STOLZE und KAADEN (1989) verglichen verschiedene Medien auf ihre Eignung zum Sammeln von behüllten Viren und ihre konservierende Wirkung. Ein Medium aus phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,2), 0,5 % bovinem Serumalbumin und 0,5 % Gelatine zeigte dabei die besten Resultate. In einer Studie von DONALDSON et al. (1970) war die Wiederfindung des zugesetzten MKS-Virus bei einem Medium mit M/15 Phosphatpuffer und 1 % inaktiviertem Ochsenserum am höchsten. RIEF-BRENNER (1986) führte in ihrer Arbeit Versuche zur Optimierung der Zusammensetzung der Sammelflüssigkeit zur Sammlung luftgetragener Viren mit einem Spezial-Impinger durch. Dabei etablierte sie für jedes der eingesetzten Referenzviren ein geeignetes Sammelmedium. Dem Grundmedium aus M/90 phosphatgepufferter Salzlösung wurden verschiedene Seren, Proteine, Pepton und Zellkulturmedium zugesetzt. Eine ähnliche Studie wurde von HÄNEL (1987) durchgeführt, wobei dort der Zentrifugalsammler nach Schiff verwendet wurde. BOURGUEIL et al. (1992a) verglichen vier verschiedene Zusammensetzungen zur Sammlung von Coronavirus. Dabei konnten mit einem Medium aus phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,2), Hepes-Puffer (20 mM), 0,5 % Gelatine und 10 % foetalem Kälberserum die besten Resultate erzielt werden.

Auf die Virus-stabilisierende Wirkung von Proteinzusätzen wird in der Literatur häufig hingewiesen. Demnach neutralisieren sie Proteasen, Hydrolasen und Lipasen (HÜBSCHLE, 1980; HORZINEK, 1972) und wirken besonders bei behüllten Viren schützend, indem sie die luftgetragenen Partikel daran hindern, die Oberfläche des Aerosoltröpfchens zu erreichen, wo sie inaktiviert werden (STOLZE und KAADEN, 1989). Es werden Beef-Extrakt (TELTSCH et al., 1980), foetales Kälberserum (TELTSCH und KATZENELSON, 1978; PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE, 1994; BOURGUEIL et al., 1992a und 1992b) oder bovines Serumalbumin (RABEY et al., 1969; MACK et al., 1986; McGARRITY und DION, 1978; WILKINSON et al., 1977) dem Sammelmedium hinzugegeben. Da der Zusatz von Protein, vor allem bei Sammlungen mit einem hohem Luftdurchsatz, zu einer starken Schaumbildung führt, werden den Medien Schaumhemmer zugesetzt. Dabei werden Silikonöl (STOLZE und KAADEN, 1989; MACK et al., 1986), Down-Corning-Antifoam-A (EHRLICH und MILLER, 1972; RABEY et al., 1969; McGARRITY und DION, 1978), SRE-Antischaumemulsion (HÄNEL, 1987) und andere nicht näher beschriebene Entschäumer (AKERS et al., 1973; DUBOVI und AKERS, 1970) verwendet. IJAZ et al. (1987) untersuchten hierzu die Wirkung unterschiedlicher Substanzen auf die Infektiosität von Rotavirus.

GÄRTTNER (1976) beschreibt verschiedene Sammelverfahren, die auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien der Partikelabscheidung beruhen, zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen. Im Einzelnen sind dies die Sedimentation, Präzipitation, Impaktion, Filtration, Zentrifugation und das Impingement.

2.1.3.1 Sedimentation

Sie Sedimentation stellt die älteste, billigste und einfachste Methode der Luftkeimsammelverfahren dar und wird vor allem für den Nachweis luftgetragener Bakterien genutzt. Die Aufimpfung der Teilchen erfolgt dabei durch die Schwerkraft in offene Gefäße, meist Petrischalen, die ein geeignetes Auffangmedium enthalten. Mit dieser Methode lassen sich keine quantitativen Aussagen treffen, da ein Bezug auf ein definiertes Luftvolumen in der Regel nicht möglich ist. Des Weiteren sind die Sammelergebnisse nicht repräsentativ, da bevorzugt große Partikel, die relativ schnell sedimentieren, erfasst werden (BUTTNER et al., 1997). Daher ist dieses Verfahren zur Sammlung von Viren weniger geeignet. Aufgrund ihrer geringen Größe, es sei denn sie sind an Trägersubstanzen gebunden, zeigen sie eine geringere Tendenz zur Sedimentation. Außerdem bedarf es zur Isolierung von Viren einer sehr hohen Virusbelastung der Luft.

HANKINS und HEARN (1970) und SPENDLOVE und FANNIN (1982) halten es für möglich, in keimarmer Umgebung luftgetragene Viren direkt auf einer Zellkultur zu sammeln. BOURGUEIL et al. (1992a) gelang es über eine Zeitraum von einer Stunde in Petrischalen mit 3 ml Sammelmedium Porcines-Respiratorisches-Coronavirus innerhalb eines Tierstalles zu isolieren. Die Autoren berichten von besseren Ergebnissen als mit dem zusätzlich eingesetzten "Stainless-steel" Zyklon Sammler. Bei Außenmessungen in einer Kläranlage verwendeten SETTNISCH et al. (1982) neben anderen Geräten einen Fangtopf, der mit einem Liter Leitungswasser bestückt war. Nach einer Sammelzeit von drei Stunden und anschließender Aluminiumsulfat-Fällung konnten sie verschiedene humane Enteroviren nachweisen. MOORE et al. (1975) verwendeten in einer Studie zur Ausbreitung von Aerosolen während Tätigkeiten bei der Dialyse das Sedimentationsverfahren. Der Nachweis der als Referenzvirus eingesetzten Bakteriophagen gelang auf Petrischalen, die mit E. coli beimpft waren. Eine andere Art der Sedimentation wird von den Autoren GERBA et al. (1975) beschrieben. Um die Bildung von Virusaerosolen während des Spülvorganges von Toiletten zu studieren, breiteten sie angefeuchtete Gazetücher aus, die nach der Sammlung ausgepresst und auf Viren untersucht wurden.

2.1.3.2 Impaktion

Nach dem Verfahren der Impaktion arbeiten Keimsammler, in welchen die angesaugte Luft so stark beschleunigt wird, dass die in ihr enthaltenen Partikel den Luftstrom aufgrund ihrer Trägheit verlassen und sich auf festen Oberflächen absetzen. Der bekannteste Sammler dieser Art ist der Andersen-Sammler, ein 6-stufiger Kaskadenimpaktor (ANDERSEN, 1958). Bei diesem Gerät wird durch hintereinander schalten von mehreren Impaktoren mit fortschreitend kleiner werdenden Düsendurchmessern eine zunehmende Aerosolbeschleunigung und damit eine Größenfraktionierung der aus der Luft abgeschiedenen Teilchen erreicht. Man kann somit durch das Auftreten von Partikeln auf einer bestimmten Platte auf ihre Größe und damit auf ihren Depositionsort im Respirationstrakt rückschließen. Es gibt verschiedenen Variationen dieses Gerätes, die sich in der Anzahl der Kaskaden und Düsen und deren Beschaffenheit unterscheiden.

IJAZ et al. (1987) setzten den Andersen-Sammler in ihren Aerosolstudien ein. Die Petrischalen enthielten ein festes Medium, bestehend aus Tryptose-Phosphat-Boullion und 3 % Gelatine. Der Sammler wurde für eine Minute und 28 l/min betrieben. Der Nachweis der zuvor in eine Aerosolkammer vernebelten Rotaviren erfolgte aus dem bei 37°C verflüssigten Sammelmedium. JENSEN (1964) verwendete als Sammelmedium für den Andersen-Sammler 2 %igen Agar, der mit einer Magermilchsuspension überschichtet war. Die Oberfläche wurde nach der Sammlung mit Hanks-Pufferlösung abgespült und anschließend auf Viren untersucht. Durch den Magermilchüberzug werden das Ankleben der Viren auf der Agaroberfläche und eine Diffusion in den Nährboden weitgehend verhindert. Als Testviren wurden Coxsackie-, Influenza-, Sindbis-, Vaccinia- und Adenovirus eingesetzt. Ein anderer Kaskadenimpaktor wurde von HUGH-JONES et al. (1973) verwendet. Luftgetragenes Newcastle-Disease-Virus wurde auf Glasplatten, die mit 5 % Gelatine und 10 % Glyzerin beschichtet waren, mit einem Volumenstrom von 17 l/min abgeschieden. Die Virusdetektion erfolgte, indem der erregerhaltige Film bei 37 °C in Puffer gelöst wurde. THOMAS (1970) bestrich Sammelplatten des Andersen- und Schlitzsammlers mit einer klebrigen Mischung aus Saccharose, Glycerin und bovinem Serumalbumin. Nach ihrer Exposition (60 min.) in den Sammlern wurde zum Virusnachweis eine Suspension empfänglicher Zellen hinzugegeben, die problemlos zu einem Monolayer auswuchsen. Die Versuche wurden mit vernebeltem Polio- und Vacciniavirus durchgeführt. In der oben bereits erwähnten Studie von MOORE et al. (1975) wurde neben dem Sedimentationsverfahren auch der Schlitzsammler zum Nachweis von Bakteriophagen verwendet, die als Referenzviren eingesetzt waren.

2.1.3.3 Filtration

Bei der Filtration wird ein definiertes Luftvolumen pro Zeiteinheit durch ein starres oder suspendierbares Filtermaterial gesaugt, wobei die Mechanismen der Trägheitsabscheidung, Diffusion und elektrostatischen Anziehung zur Ablagerung der Partikel auf dem Trägermaterial führen. SETTNISCH et al. (1982) verwendeten in Porzellannutschen eingespannten, mehrlagigen Verbandsmull, der mit Hanks-Lösung unter Zusatz von 0,5 % Lactalbuminhydrolysat angefeuchtet war, als Filter. Nach einer Sammelzeit von drei Stunden, in der durchschnittlich 3 m³ Luft mittels einer Saugpumpe gezogen wurden, wurde das Filter in 50 ml gewaschen und die Lösung auf Viren untersucht. Auf diese Weise gelang es, auf dem Gelände einer Kläranlage Echovirus Typ 11 und Coxsackievirus B3 zu isolieren. WALLIS et al. (1985) verwendeten zur quantitativen Erfassung von Poliovirus-Aerosolen Membranfilter (Porendurchmesser 0,45 µm), die mit 200 ml Glycin-Puffer (0,05 M, pH 3,5) befeuchtet waren. Die Durchflussrate betrug dabei 100 1/min und die Sammelzeit 2 min. Das beaufschlagte Virus wurde vier mal mit 200 ml Glycin-Puffer (0,05 M, pH 10) eluiert, nochmals über ein Filter mit Druck aufkonzentriert und auf Zellkulturen verimpft. Die Virusretention im Filter beruhte dabei auf Adsorption der Partikel an das Filtermaterial. Die Wiederfindung betrug 50 %. Eine sensitive Methode zum Nachweis geringer Erregerkonzentrationen entwickelten NEEF et al. (1995). Die Autoren vernebelten Bakterien (E. coli) die anschließend unter Verwendung des MD 8-Sammlers (nähere Beschreibung s. 3.4) und verschiedenen Filtermaterialien (Gelatine-, Nitrocellulose und Polyamidfilter) gesammelt wurden. Die Detektion der Mikroorganismen erfolgte mit der Hybridisierungstechnik. Dabei wurden Fluoreszenz-, Digoxigenin- oder Enzym-markierte Oligonukleotidsonden eingesetzt. Der molekularbiologische Nachweis virushaltiger Aerosole wäre demnach unter Verwendung geeigneter Gensonden möglich.

Da es sich häufig als schwierig erwiesen hat, die gesammelten Mikroorganismen quantitativ vom Filtermaterial in ein geeignetes Nachweissystem zu überführen, werden heute bevorzugt wasserlösliche Filter verwendet. Hierzu werden häufig Gelatinefilter eingesetzt, die in einem geeigneten Medium nach der Luftkeimsammlung bei 37 °C aufgelöst werden können. Eine Studie von JASCHHOF (1993) ergab, dass eine Lagerung der beaufschlagten Filter in gequollenem Zustand die Stabilität der gesammelten Viruspartikel erhöht. Für seine Versuche setzte er Influenzaviren ein, deren Stabilität er bei einer Lagerung in 5 ml Erhaltungsmedium nach ADAMCZYK (1975) bei 4 °C über einen Zeitraum von 72 Stunden beobachtete. Die Luftkeimsammlung erfolgte mit dem MD 8-Sammler. Auf die Virus-stabilisierende Wirkung von Proteinen wurde bereits unter 2.1.3 hingewiesen. Die Autoren STOLZE und KAADEN (1989) und BOURGUEIL et al. (1992a) setzten ihren Sammelmedien zusätzlich 0,5 % Gelatine hinzu. Unter Verwendung des MD 8-Sammlers und Gelatinefiltern gelang es JASCHHOF et al. (1991), in einer Kinderpoliklinik Influenzavirus A aus der Raumluft zu isolieren. Die Sammlung betrug 15 min. bei einer Durchflussrate von 120 l/min.

Bei Gelatinefiltern besteht jedoch die Gefahr, dass bei hohen Luftfeuchtigkeiten die Wirksamkeit des Filters durch Aufweichen und Vergrößerung der Poren beeinträchtigt wird. Des Weiteren kommt es vor allem bei hohem Luftdurchsatz und langen Sammelzeiten zu einer Dehydration der Mikroorganismen, und damit zu einer irreversiblen Schädigung dieser. Gelatinefilter zeigen sich empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen und Spritzwasser. Demnach sind sie für Außenmessungen während Niederschlägen ungeeignet.

2.1.3.4 Zentrifugation

Bei den nach diesem Prinzip der Zentrifugation arbeitenden Keimsammlern werden die gegenüber der Gasphase des Aerosols spezifisch schwereren luftgetragenen Partikel durch Einwirkung von Zentrifugalkräften abgeschieden. Nach diesem Sammelprinzip arbeitet der Reuter-Centrifugal-Sammler (RCS). Als Prallfläche dienen Nähragarstreifen, die die Innenwand des Gerätes bedecken. CLARK et al. (1981) stellten fest, dass die Nachweisrate sehr kleiner Partikel (< 5 µm) gering ist. HÜBSCHLE (1980) dagegen berichtet von guten Ergebnissen beim Nachweis luftgetragener ECBO- und Newcastle-Disease-Viren mit dem RCS. Ein weiteres kleines handliches Sammelgerät ist der "*SAS-Super 90 air Sampler*", bei dem die Abscheidung der Partikel auf Agarplatten erfolgt. Mit diesem Gerät führten CARDUCCI et al. (1995 und 2000) Messungen auf dem Gelände einer Kläranlage durch. Der Nährboden (Tryptose) wurde nach der Sammlung zerkleinert und die Viren mit 3 % Beef-Extrakt eluiert. Es gelang mit dieser Methode, luftgetragene Entero- und Reoviren nachzuweisen.

Eine spezielle Art von Zentrifugalsammlern sind Zyklone. Das zu untersuchende Aerosol wird tangential in einen feststehenden zylindrischen Raum eingesaugt und vollführt mehrere Umdrehungen in diesem. Aerosolpartikel, die die Wand erreichen, werden abgeschieden und in einem Sammelgefäß aufgefangen. Zur Sammlung wird der Zuluft eine bestimmte Menge Sammelflüssigkeit beigegeben, die den Innenraum des Gerätes befeuchtet und am Ende einer Sammlung aufgearbeitet werden kann. Da unter Feldbedingungen mit stark verdünnten Aerosolen gerechnet werden muss, ist der hohe Grad der Konzentrierung der Partikel, der durch die Zyklone erreicht wird, von großer Bedeutung. HÄNEL (1987) untersuchte in einer umfassenden Studie die Eignung des Zentrifugalsammlers nach Schiff (KSF 70) zur Sammlung luftgetragener Viren. Die Sammelversuche wurden in Aerosolkammern ausgeführt, in die künstlich erzeugte Aerosole von ECBO¹-, IBR/IPV²-, Newcastle-Disease- und Vacciniavirus eingeleitet wurden. TELTSCH et al. (1980) sammelten unter Verwendung eines "large-volume scrubber-cyclone type" Sammlers noch in einer Entfernung von 100 m humane Enteroviren bei der Verrieselung von Abwasser. Dabei wurden 27 m³ Luft in 60 ml Sammelmedium abgeschieden. Als Sammelmedium wurde DMEM oder 1 % Beef-Extrakt verwendet. In einer ähnlichen Studie von TELTSCH und KATZENELSON (1978) setzten die Autoren einen "large-volume aerojet-general liquid scrubber" ein, der für 15-20 min. bei einer Durchflussrate von 600 l/min betrieben wurde. Die Flussrate des Sammelmediums (DMEM oder destilliertes Wasser) betrug 3 ml/min. In vier der 12 untersuchten Proben konnte Echovirus nachgewiesen werden. Ein weiterer Zyklon ist der "stainless-steel cyclone" Sammler nach ERRINGTON und POWELL (1969), der mit einer Luftrate von 300 l/min und einer Mediumflussrate von 2 ml/min arbeitet. Mit diesem Sammler gelang es BOURGUEIL et al. (1992b), bei einer Sammelzeit von 15 min. Aujeszky-Virus innerhalb von Stallungen abzuscheiden. Das Sammelmedium war aus phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,2), 20 mM Hepes und 10 % foetalem Kälberserum zusammengesetzt. Die Untersucher kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass dieser Zyklon-Sammler nicht in der Lage ist, geringe Virusmengen zu sammeln. In einer weiteren Untersuchung setzten die Autoren den "stainless-steel cyclone" zur Sammlung luftgetragenen Coronavirus in einem Tierstall ein (BOURGUEIL et al. 1992a).

¹ Rinderenterovirus (enteritic cytopathogenic bovine orphan)

² Bovines-Herpesvirus 1 (Infektiöse-Bovine-Rhinotracheitis/ Infektiöse-Pustulöse-Vulvovaginitis

2.1.3.5 Elektropräzipitation

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen stellt die Elektropräzipitation dar. Dabei wird durch Pumpwirkung ein Luftstrom über einen Lufttrichter in ein Hochspannungsfeld geleitet, in dem die in der Luft enthaltenen, an Partikel gebundenen Mikroorganismen negativ aufgeladen werden und anschließend auf eine positiv geladene, sich drehende Sammelscheibe prallen, die ständig mit Sammelflüssigkeit überspült wird. Dieses Verfahren arbeitet mit sehr hohen Luftdurchsätzen, so dass auch bei geringer Virusbelastung der Luft eine Virusisolierung möglich ist. DECKER et al. (1969) beschreiben zwei "*high volume electrostatic precipitators*" mit Durchflussraten bis zu 15000 l/min. Es sind dies der "*Litton high volume air sampler*" (LVS) und der "*Environmental research corps's LEAP-Sampler*". Ein weiterer Sammler, bei dem die Impaktion auf einer festen Oberfläche erfolgt, ist der Schlitzsammler, der bereits unter 2.1.3.2 erwähnt wurde.

Die Auswertung der Literatur zeigt, dass zahlreiche Studien zum Nachweis luftgetragener Viren unter Verwendung des LVS durchgeführt wurden. ARTENSTEIN und MILLER setzten diesen Sammler bereits 1966 zur Isolierung von Adenovirus innerhalb eines Krankenzimmers ein. Dabei wurden innerhalb von 5 min. die Partikel aus 1785 ft³ Luft in 180 ml Sammelflüssigkeit abgeschieden. McGARRITY und DION (1978) konnten bei einer Luftrate von 1100 l/min und Mediumflussrate von 5 ml/min in vier der sechs untersuchten Proben Polyoma-Virus innerhalb eines Mäuselabors detektieren. Die Sammlung erfolgte mit verschiedenen Medien, wobei Hanks-Eagle's Medium mit 10 % bovinem Serumalbumin und 0,1 % Thalliumacetat die besten Ergebnisse lieferte. Um eine Aufkonzentrierung der in der Luft enthaltenen Partikel zu erreichen, ließen HUGH-JONES et al. (1973) 30 ml Sammelflüssigkeit über einen Zeitraum von 60 min. und einer Durchflussrate von 1000 l/min im LVS rezirkulieren. Auf diese Weise gelang es, luftgetragenes Newcastle-Disease-Virus sowohl in Tierstallungen als auch in Außenversuchen nachzuweisen. In mehreren Untersuchungen zur aerogenen Übertragung des MKS-Virus wurde der LVS eingesetzt (SELLERS und PARKER, 1969; SELLERS und HERNIMAN, 1972; DONALDSON et al., 1970). WILKINSON et al. (1977) versuchten mit verschieden Luftkeimsammlern, unter anderem auch dem LVS, luftgetragenes Afrikanisches-Schweinefieber-Virus zu isolieren. Die Sammlung erfolgte über einen Zeitraum von 25 und 30 min. bei einer Luftrate von 1000 l/min in ein Medium aus M/15 Phosphatpuffer und 1 % bovinem Serumalbumin. Keine der untersuchten Luftproben lieferte in der Zellkultur ein positives Ergebnis. In einer Feldstudie zur Bildung von Virusaerosolen während der Verregnung von Abwasser setzten MOORE et al. (1979) mehrere LVS ein. Die Sammler wurden bei 1000 l/min für 30 min. betrieben. Die Partikelabscheidung erfolgte in 100 ml brain-heart-infusion-broth unter Zusatz von 0,1 % Tween 80. Nach einer Probenaufkonzentrierung gelang der Nachweis unterschiedlicher humaner Enteroviren.

PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE (1994) setzten bei ihren Untersuchungen zum Vorkommen von luftgetragenen humanen Enteroviren im Bereich der Abfallentsorgung neben einem Spezial-Impinger den LEAP-Sammler ein. Der Elektropräzipitator wurde mit einem Luftdurchsatz von 10000 l/min für eine Sammeldauer von 20 min. betrieben. Als Sammelmedium dienten 500 ml DMEM mit 2 % foetalem Kälberserum. In 12 von 36 Proben konnte Virus nachgewiesen werden. Von diesen 12 Isolaten wurden 11 mit dem Elektropräzipitator erfasst und nur eine mit dem Spezial-Impinger. Dies wurde neben dem Abscheidungsprinzip auf den höheren Luftdurchsatz des Gerätes zurückgeführt. MACK et al. (1986) verwendeten dieselben Sammler, um aerogenes Aujeszky-Virus nachzuweisen. Der LEAP-Sammler wurde mit 10000 l/min für 20 min. betrieben. Die Partikelabscheidung erfolgte in 150 ml MEM mit Hepes-Puffer und 0,1 % bovinem Serumalbumin. Dabei zeigten 29 der 42 mit dem LEAP und 33 der 47 mit dem Spezial-Impinger gezogenen Luftproben ein positives Ergebnis in der Zellkultur.

2.1.3.6 Impingement

Beim Impingement wird das Aerosol durch eine Flüssigkeit geleitet, wobei in der Luft enthaltene Partikel in der Waschflüssigkeit zurückgehalten werden. Bei dieser Technik greifen die Mechanismen der Trägheitsabscheidung und der Diffusion. Der Sammelerfolg des Impingers ist von den Faktoren Sammelstress, Bildung von Sekundäraerosolen, Durchreißeffekt und Adsorption abgeschiedener Partikel an der inneren Oberfläche des Sammlers abhängig. Das Impingement ist eine klassische Luftkeimsammelmethode, die am meisten angewendet wird (STOLZE und KAADEN, 1989).

Das bekannteste und am häufigsten verwendete Gerät ist der "All-Glass-Impinger" (AGI-30). Er wird vor allem für Aerosolstudien, die in Aerosolkammern durchgeführt werden, eingesetzt (WARREN et al., 1969). In den hierzu durchgeführten Untersuchungen wird der Sammler üblicherweise mit 20 bis 20,5 ml Sammelflüssigkeit bestückt und die Messung mit einer Durchflussrate von 12,5 l/min für eine Minute angesetzt (AKERS et al., 1973; DUBOVI und AKERS, 1970; EHRLICH und MILLER, 1972; RABEY et al., 1969). Auf einem internationalen Aerobiologen-Symposium, das im Oktober 1963 im kalifornischen Berkeley (USA) abgehalten wurde, einigte man sich den AGI-30 neben dem Andersen-Sammler als Referenzsammler einzusetzen (BRACHMAN et al., 1964). Der AGI-30 wird daher in zahlreichen Studien als Referenzgerät mitgeführt, so beispielsweise in den Untersuchungen zur Abscheidung von Viren mit dem KSF 70 (HÄNEL, 1987) und einem Spezial-Impinger (RIEF-BRENNER, 1986). Des Weiteren ist in der Literatur eine Vielzahl modifizierter Geräte beschrieben. Der "Porton-Impinger", "Standard-Impinger", "Capillary-Impinger", "Bulged All-Glass-Impinger" (TYLER und SHIPE, 1959), der "Shipe-Sammler" (SHIPE et al., 1959), "Pre-Impinger" (MAY und DRUETT, 1953) und der AGI-4. In einer Untersuchung von McGARRITY und DION (1978) zur Detektion von luftgetragenem Polyoma-Virus wurden der LVS und ein AGI-4 verwendet. Der Impinger wurde mit 22 ml Sammelmedium (Hanks-Eagle's Medium, 10 % bovines Serumalbumin und 0,1 % Thalliumacetat) befüllt und mit einer Durchflussrate von 12,3 l/min betrieben. Im Gegensatz zu den mit dem Präzipitator gesammelten Proben konnte in keiner der 12 Impingerproben Virus nachgewiesen werden.

Zu einer Auftrennung der luftgetragenen Partikel in verschiedene Größenordnungen kommt es beim Sammeln mit dem "Multistage Liquid" Impinger nach MAY (1966). Dieser 3-Stufen-Sammler (Stufe 1: >6 µm, Stufe 2: 3-6 µm und Stufe 3: < 3 µm Partikelgröße) ist mit einer Durchflussrate von 55 l/min auch zur Sammlung geringer Virusmengen geeignet. HUGH-JONES et al. (1973) setzten unter anderem den "Multistage Liquid" Impinger für ihre Studien zur aerogenen Übertragung von Newcastle-Disease innerhalb von Geflügelstallungen ein. Die Sammlung erfolgte für 30 min. in destilliertes Wasser. Die Versuche ergaben, dass die höchsten Viruskonzentrationen in den ersten beiden Stufen zu finden waren. Ähnliche Resultate ergaben die Untersuchungen von SELLERS und PARKER (1969), die MKS-Virus aus Schweineställen mit dem "Multistage Liquid" Impinger isolierten. Die Sammelzeit betrug dabei 45 min. und als Medium wurde PBS eingesetzt. Die höchsten Viruskonzentrationen detektierten SELLERS und HERNIMAN (1974) in der ersten Stufe bei ihren Versuchen zur aerogenen Übertragung von Schweine Vesicular-Disease-Virus. WILKINSON et al. (1977) versuchten bei Sammelzeiten von 25 und 30 min. Afrikanisches-Schweinefieber-Virus in PBS oder M/15 Phosphatpuffer abzuscheiden. SETTNISCH et al. (1982) gelang es, aus Aerosolen einer Kläranlage neben der Filtration und Sedimentation auch mit dem Impingement verschiedene Enteroviren zu isolieren. Hierzu verwendeten sie eine 2-l-Saugflasche, die mit 1 l Leitungswasser bestückt war. Durch ein Glasrohr wurden innerhalb von 3 h 3 m³ Luft gesaugt. Im Bereich der Abfallentsorgung konnten PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE (1994) in einem Fall humane Enteroviren unter Verwendung des Spezial-Impingers nach Prof. W. Müller (BÖHM et al., 1998) isolieren. Der Sammler wurde mit 1 l Sammelmedium Literatur

(MEM, 2 % foetales Kälberserum) für 20 min. bei einer Pumpenleistung von 180 l/min betrieben. Eine weitere Untersuchung zur Sammlung luftgetragener Viren mit dem Spezial-Impinger nach Prof. W. Müller führten MACK et al. (1986) durch. Abweichend bestand die Sammelflüssigkeit aus PBS und 1 % Pepton. In 33 der 47 untersuchten Proben konnte Aujeszky-Virus nachgewiesen werden. Ein weiterer Sammler, dessen Abscheideprinzip das Impingement ist, ist der "*XM-2 Biological Sampler*", der unter 3.4 näher beschrieben wird. Das Gerät wurde von BRENNER et al. (1988) in einer Studie zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen bei der Verregnung von Abwasser eingesetzt. Die 2-stündige Sammlung erfolgte in Earle-Lactalbumin-Hydrolysat. An diesem Standort konnten Coliphagen und Bakterien nachgewiesen, wohingegen in keiner der untersuchten Proben Virus detektiert wurde.

2.2 Viren in Abwasser, Klärschlamm und Müll

Die Bedeutung und das Vorkommen von humanpathogenen enteralen Viren in Oberflächenwasser und Grundwasser für die Trinkwasseraufbereitung zeigen GERBA und ROSE (1990) in einem Übersichtsartikel auf. Demnach gelang es auch aus Trinkwasser Viren zu isolieren. Im Einzelnen waren dies neben den humanen Enteroviren Hepatitis A-, Reo-, Adeno- und Rotaviren. Nach Angaben von HURST (1989) werden über 130 verschiedene Serotypen humanpathogener Viren mit dem Kot ausgeschieden und können somit über die Kanalisation in die kommunalen Abwässer gelangen. Im Einzelnen handelt es sich um Astro-, Calicivi-, Corona-, Parvo-, Reo-, Adeno-, Entero-, Rotaviren und Hepatitis A-Virus, wobei den vier letzt genannten die größte Bedeutung zukommt. Sie werden in Konzentrationen von bis zu 10¹⁰ KID₅₀/g Stuhl von kranken oder auch infizierten Personen mit inapparenten Krankheitsverläufen ausgeschieden (DUMKE und FEUERPFEIL, 1997; ABBASZADEGAN et al., 1999). Eine geringere Anzahl von Serotypen kann über Urin oder bei der Entsorgen von Blut über die Kanalisation das Abwasser kontaminieren (HURST, 1989). Das Überleben der Viren in der Umwelt ist, wie bereits schon erwähnt, von zahlreichen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Sonneneinstrahlung, anorganische Anionen und Kationen, anderen Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte abhängig. Das Hepatitis A-Virus und die Adenoviren (PINA et al., 1989), die Rotaviren (GENTHE et al., 1991) und humanen Enteroviren zeigen vor allem in Abwasser eine hohe Stabilität. Durch Adsorption der Viren an Partikel in Abwässern und Böden können die Erreger über Monate hinweg in der Umwelt persistieren (HURST, 1989).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dem Nachweis von humanen Enteroviren aus Abwasser, Oberflächenwasser, Grundwasser und Trinkwasser. Die Höhe der im Wasser vorkommenden Viruskonzentrationen ist dabei von mehreren Faktoren abhängig. Sie wird durch den hygienischen Standard, die Populationsdichte, die Jahreszeit, die Verbreitung von Infektionen innerhalb der Bevölkerung und von Impfkampanien mit Lebendvakzinen beeinflusst (KOPECKA et al., 1993). GRABOW et al. (1999) zeigten, dass in ihren in Südafrika gezogenen Wasserproben weder mit unterschiedlichen Zellkultursystemen noch mit der PCR Poliovirus vom Wildtyp nachgewiesen werden konnten. Alle Isolate erwiesen sich als Impfstamm, mit dem zuvor die orale Vakzination von ca. 5800 Kindern erfolgt war. Über das jahreszeitliche Vorkommen humaner Enteroviren in Oberflächenwasser berichten DUMKE und FEUERPFEIL (1997). Bei der Untersuchung von Wasser aus der Elbe wurden die höchsten Viruskonzentrationen im Sommer und Herbst ermittelt. Die Typisierung von 183 Virusisolaten ergab in 56 % Coxsackie B, in 28 % Echoviren und in 16 % Poliovirus. ABBASZADEGAN et al. (1993) untersuchten 10 Grundwasserproben, von denen zwei in der Zellkultur und eine in der PCR positive humane Enterovirus-Ergebnisse lieferten. In einer weiteren Studie untersuchten ABBASZADEGAN et al. (1999) 150 Grundwasserproben, in denen in 30,1 % der Proben der molekularbiologische Erregernachweis gelang. Die kulturelle Isolierung war hingegen in 8,7 % aller untersuchten Proben erfolgreich. Von der Isolierung und dem molekularbiologischen Virusnachweis aus Meerwasser in Küstennähe auf Hawaii berichten REYNOLDS et al. (1998). PINA et al. (1998) konnten in 22 % ihrer Flusswasserproben, jedoch in keiner der 14 Meerwasserproben, die ebenfalls in Küstennähe gezogen wurden, humane Enteroviren mittels der PCR detektieren. PUIG et al. (1994) detektiert sowohl mit der PCR als auch in der Zellkultur Entero- und Adenoviren in verschmutzten Flüssen und in Abwasser. Die molekularbiologischen Nachweise zeigten dabei für alle untersuchten Flusswasserproben positive Ergebnisse. Die Abwasserproben waren zu 100 % Adenovirus- und zu 75 % Enterovirus-positiv. Unter Verwendung der PCR untersuchten KOPECKA et al. (1993) mehrere Proben, die aus einer Kläranlage und einem mit Fäkalien verschmutzten See in Berlin stammten. Es gelang in allen Proben die Detektion von Enterovirus-RNA. Bei der Untersuchung von Abwasser während der Behandlung in einer Kläranlage konnten GANTZER et al. (1998) sowohl RNA als auch infektiöse Enteroviren nachweisen. Es zeigte sich, dass die PCR nach dem ersten Abwasser-Reinigungsschritt (Sedimentation) in allen untersuchten Proben positiv war. In einer anderen Studie konnte nach einer Optimierung der Methode zur Viruskonzentration in 72 % der 25 untersuchten, bereits geklärten Abwasserproben Enterovirus-RNA detektiert werden (GANTZER et al., 1997). LEISINGER und METZLER (1997) wiesen ebenfalls in sechs von acht geklärten Siedlungsabwasserproben humane Enteroviren mit der RT-PCR nach. Die kulturelle Isolierung humaner Enteroviren gelang ROSE et al. (1986) aus fünf von 54 bereits geklärten Wasserproben. Bei der Untersuchung von Rohwasser waren hingegen 47 % aller Proben in der Zellkultur positiv, bei denen es sich um Coxsackie B, Polio 1 und Echoviren handelte.

Neben der großen Gruppe der humanen Enteroviren wird aber auch über das regelmäßige Vorkommen von Hepatitis A-Virus in verschiedenen Wässern berichtet. Das Hepatitis A-Virus gehört ebenfalls zur Familie der Picornaviridae und wurde lange aufgrund seiner biophysiologischen und biochemischen Eigenschaften als Mitglied der Enteroviren betrachtet (GUST et al., 1983). MELNICK (1982) klassifiziert es als Enterovirus Typ 72. Da sich das Virus jedoch vor allem durch seine Hitze- und Säurestabilität, Genomstruktur und Vermehrung in der Zellkultur von anderen Vertretern der Gruppe Enteroviren unterscheidet, wurde der Vorschlag einer Klassifizierung als Hepatovirus innerhalb der Picornarviridae laut (MINOR, 1991). Das Hepatitis A-Virus ist weltweit verbreitet, wobei es vor allem in unterentwickelten Gebieten der Erde endemisch ist (TICEHURST, 1986). Obwohl in Europa im Allgemeinen ein Rückgang des Hepatitis A-Virus verzeichnet wird, ist das Infektionsrisiko im mediterranen Raum nach wie vor hoch (GRAFF et al., 1993; DIVIZIA et al., 1998). Die Übertragung erfolgt fäkal-oral durch Schmutz- und Schmierinfektionen, über verunreinigte Lebensmittel und Trinkwasser, wobei eine unzureichende Behandlung von Abwasser eine große Rolle bei der Verbreitung der Viren spielt (GRAFF et al., 1993; FRÖSNER, 1982). Die Viren gelangen nach der Aufnahme über den Darm und der Ausbreitung über das Blut in das Hauptzielorgan, die Leber. Hier vermehren sich die Viren und gelangen über die Gallenwege in den Darm und werden somit wieder in hohen Konzentrationen (10^8 bis 10^9 KID₅₀/g Kot) ausgeschieden (TICEHURST et al., 1987). Das Hauptsymptom einer Infektion mit dem Hepatitis A-Virus ist eine Leberentzündung mit Gelbsucht. Die Infektion ist altersabhängig. Es erkranken hauptsächlich Erwachsene, wobei sich bei Kindern meist ein asymptomatischer Krankheitsverlauf zeigt (MODROW und FALKE, 1997).

Aufgrund der Bedeutung von unzureichend geklärtem Abwasser bei der Verbreitung des Erregers wurden hierzu zahlreiche Studien durchgeführt. DIVIZIA et al. (1998) untersuchten Abwasserproben, die an unterschiedlichen Stationen des Klärprozesses in einer Kläranlage in Italien genommen wurden unter Verwendung einer "*antigen-capture*" PCR. Es zeigte sich, dass 80 % der Rohwasserproben und 10 % der Proben beim Verlassen der Anlage Hepatitis

A-Virus-positiv waren. LEISINGER und METZLER (1997) hingegen konnten mit der PCR kein Hepatitis A-Virus aus geklärtem Siedlungsabwasser detektieren. Bei einer Untersuchung von Wasser unterschiedlicher Herkunft wiesen PINA et al. (1998) in vier von 18 Abwasserund in 10 von 23 Flusswasserproben die Virus-RNA nach, wohingegen alle Proben aus dem Meer negativ waren. ABBASZADEGAN et al. (1999) konnten mit der PCR in 12 von insgesamt 139 untersuchten Grundwasserproben Hepatitis A-Virus detektieren. Von zahlreichen positiven Befunden unter Einsatz eines Radio-Immuno-Assays in verschiedenen Oberflächenwässern berichten LEWIS und METCALF (1988). Eine Studien von STRAUB et al. (1994a) bestätigte die häufig erwähnte hohe Stabilität von enteritischen Viren, indem sie zeigten, dass sowohl in unbehandelten als auch in anaerob behandelten Klärschlämmen Virus-RNA nachgewiesen werden konnte. Die Autoren konnten in sieben der acht untersuchten Klärschlämmen Hepatitis A-Virus und in allen untersuchten Proben humane Enteroviren mit der PCR detektieren. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch GRAFF et al. (1993) bei ihren Untersuchungen in Deutschland. Ihnen gelang neben dem molekularbiologischen Nachweis von Hepatitis A-Virus auch die kulturelle Isolierung des Erregers aus behandelten und unbehandelten Klärschlämmen.

Über ein erhöhtes Infektionsrisiko von Arbeitskräften, die im Bereich der Abwasserbehandlung tätig sind, wird an zahlreichen Stellen kontrovers diskutiert (WARLEN und HOFF, 1998, DeSERRES und LALIBERTE, 1997; SALANO und COPELLO, 1998; LERMAN et al., 1999; BRUGHA et al., 1998; ANDREN und BRUGHA, 1999). Durch Umpumpen, Zuleiten und Mischen von Abwasser, bei der Beseitigung von Klärschlamm und Reinigungsarbeiten der Anlage können erregerhaltige Aerosole entstehen. In wie weit sie direkt für eine Infektion verantwortlich sein können ist umstritten (WARLEN und HOFF, 1998). Die Aerosole können jedoch, ebenso wie das Spritzwasser, verschiedene Oberflächen mit Virus kontaminieren, das dann vor allem über die Hände aufgenommen werden kann. BRUGHA et al. (1998) gehen von einem erhöhten Risiko einer Hepatitis A-Infektion für Menschen aus, die im Abwasserbereich tätig sind. Ihre Studie umfasste 241 Beschäftigte, deren Speichel und Serum auf Antikörper (IgG anti-HAV) untersucht wurde. Des Weiteren wurden zahlreiche andere Parameter, wie Alter, Geschlecht, Tätigkeit, Auslandsbesuche usw. protokolliert. Die Untersuchung ergab, dass Mitarbeiter, die am häufigsten mit Rohwasser in Berührung kommen zu 60 % positive Ergebnisse lieferten. Es wird daher eine Impfung serum-negativer Mitarbeiter empfohlen. DeSERRES und LALIBERTE (1997) berichten ebenfalls von einem erhöhten Infektionsrisiko für Beschäftigte in Kläranlagen. Im Gegensatz dazu stehen die Publikationen von LERMAN et al. (1999), LEVIN et al. (2000) und SALANO und COPELLO (1998), in denen im Vergleich zur Kontrollgruppe kein erhöhtes Risiko beobachtet wurde. Des Weiteren werden die Ergebnisse bereits durchgeführter Studien in Kansas und Quebec City von WARLEN und HOFF (1998) kritisch betrachtet.

Weiterer Vertreter der enteritischen Viren, auf deren Bedeutung schon im Zusammenhang einer möglichen aerogenen Übertragung hingewiesen wurde, sind die **humanen Rotaviren**. Auch sie werden in hohem Maße (10¹⁰ bis 10¹¹ Viruspartikel/g Kot) von infizierten Individuen ausgeschieden und kontaminieren auf diese Weise vor allem das Abwasser. Mehrere Untersuchungen hatten gezeigt, dass auch die Rotaviren während des Klärprozesses häufig nicht inaktiviert werden. SMITH und GERBA (1982) konnten im Zu- und Ablauf einer Kläranlage sowohl Entero- als auch Rotaviren nachweisen. Auffallen war, dass die Konzentrationen der humanen Enteroviren durch den Klärprozess abnahmen, wohingegen die der humanen Rotaviren im Roh- und im geklärten Wasser gleich blieben. Die Detektion der Rotaviren erfolgte mittels der Immunfluoreszenz. Mit derselben Methode untersuchten ROSE et al. (1986) die Effizienz einer Kläranlage, indem sie an unterschiedlichen Klärstationen Wasserproben entnahmen. Dabei zeigte sich, dass Rotavirus an allen Probenahmepunkten nachgewiesen werden konnte. Unter Verwendung der RT-PCR detektierten LEISINGER und METZLER (1997) neben Enteroviren ebenfalls Rotaviren in geklärtem Siedlungsabwasser. Von acht untersuchten Proben waren sieben Enterovirus-positiv. Bei der Untersuchung von sieben weiteren Proben, die alle aus derselben Anlage stammten, konnten in allen Proben Rotavirus-RNA nachgewiesen werden. In einer Studie zur Etablierung einer "*Triplex*" PCR zum Nachweis von Rota-, Polio- und Hepatitis A-Virus gelang es TSAI et al. (1994) alle drei Viren in Abwasser zu amplifizieren. Des Weiteren wird in der Literatur vom Rotavirus-Nachweis aus verschiedenen Oberflächenwässern (LEWIS und METCALF, 1988), aus Grundwasser (ABBASZADEGAN et al., 1999) und Trinkwasser (GERBA und ROSE, 1990) berichtet.

Eine weitere wichtige Gruppe sind die Adenoviren mit 41 verschiedenen Serotypen. Dabei handelt es sich um 70 bis 80 nm große, unbehüllte Viruspartikel, die als einzige Vertreter der enteralen humanpathogenen Viren eine doppelsträngige DNA besitzen. Die meisten Serotypen verursachen Erkrankungen der oberen Luftwege und Bindehautentzündungen (HURST, 1989). Die wichtigsten Adenoviren sind der Subtyp 40 und 41, die vor allem bei Kindern neben den Rotaviren zu schweren Gastroenteritiden führen. Ihre Bedeutung und Vorkommen in Abwässern wurde lange Zeit unterschätzt (PUIG et al., 1994). WILLIAMS et al. (1988) schätzen die Zahl der Adenoviren auf 10800/l, hingegen die der Enteroviren nur auf 1320/l Abwasser. Von mehreren Autoren werden die Adenoviren als Indikatorkeim für das Vorkommen humanpathogener Viren in der Umwelt vorgeschlagen (PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998). PINA et al. (1998) untersuchten in ihrer Studie kommunales Abwasser, Abwasser eines Schlachthofes, Oberflächenwasser (Fluss und Meer) und Muscheln auf das Vorhandensein von Adeno-, Enteroviren und Hepatitis A-Virus mittels der PCR. Dabei zeigte sich, dass in den meisten Proben Adenoviren detektiert werden konnten. Gelang der Nachweis von Hepatitis A- oder Enteroviren, so war die Probe immer gleichzeitig auch positiv für Adenovirus. Des Weiteren wurde im Fall der Adenoviren kein Jahreszeiten abhängiges Vorkommen beobachtet.

Es ist schon seit langem bekannt, dass mache Berufsgruppen, wie Zahnärzte, Dialyseschwestern oder andere Personen, die mit Blut oder Blutprodukten in Kontakt kommen, ein erhöhtes Risiko für eine Hepatitis B-Virus Infektion tragen. Das Hepatitis B-Virus ist der Hauptvertreter der Virusfamilie Hepadnaviridae. Es besteht aus einem teilweise doppelsträngigen DNA-Genom, das mit Kapsidproteinen zu einem Nukleokapsid assoziiert ist. Dieses wird von einer Lipidmembran umhüllt und bildet so den Dane-Partikel mit einem Durchmesser von 42 nm. Das Hepatitis B-Virus wird perkutan oder permukosal durch erregerhaltiges Blut oder Körperflüssigkeiten, die bei der Geburt, beim Sexualverkehr oder beim Verwenden kontaminierter Injektionsnadeln in die Blutbahn gelangen übertragen. Von dort gelangt der Erreger in die Leber und kann eine akute Hepatitis, deren Hauptsymptom eine Gelbsucht (Ikterus) ist, verursachen. Bei einer perinatalen Infektion und bei einer Ansteckung im Kleinkindalter kommt es zu chronischen Formen der Hepatitis, meist ohne eine akute Erkrankung. Folgeerkrankungen sind die Leberzirrhose und das Leberzellkarzinom (MODROW und FALKE, 1997). Das Virus zeichnet sich besonders durch seine hohe Resistenz gegen Umweltfaktoren und seine hohe Infektiosität aus. Eine Konzentration von 100 Partikeln/ml ist ausreichend, um einen Schimpansen zu infizieren (ULRICH et al., 1989). Weltweit wird die Zahl von chronischen Hepatitis B-Virus Trägern auf über 200 Millionen geschätzt (LUCOTTE et al., 1994). In einer seroepidemiologischen Studie von ARVANI-TIDOU et al. (1998) wurde das Blut von 166 Mitarbeitern einer Kläranlage in Griechenland auf das Vorhandensein von Antikörpern (anti-HBc) überprüft. Zusätzlich wurden zahlreiche weitere Parameter wie Alter, Geschlecht, Schulbildung, sexuelle Kontakte, Drogenkonsum usw. der Probanden erfasst. Die Auswertung aller Ergebnisse ergab, dass fünfmal mehr Mitarbeiter anti-HBc-positiv waren, die mit Abwasser in Kontakt kamen, als die der entsprechenden Kontrollgruppe. Laut ARVANITIDOU et al. (1998) hatten sich die Klärwerker wahrscheinlich über Hautläsionen oder über die Schleimhäute mit dem Erreger infiziert. Das Virus gelangt sowohl über Blut und blutige Körperflüssigkeiten als auch über den Urin infizierter Personen in das Abwasser. Eine Studie von KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN (2000) ergab, dass Hepatitis B-Virus in gleichen Maßen in Urin, wie in Sperma oder Speichel enthalten ist. Des Weiteren werden in England ca. drei Billionen Hygieneartikel verbraucht, von denen 66 % über die Kanalisation entsorgt werden (PHILIPP et al., 1997).

Neben kontaminierten Abwässern kommen die Beschäftigten einer Kläranlage auch mit Klärschlamm in Kontakt. Die mikrobielle Belastung solcher Schlämme ist hoch, da es hier zu einer Aufkonzentrierung der Erreger kommt (STRAUB et al., 1992). In einem Zeitraum von drei Jahren gelang es HAMPARIAN et al. (1985) aus 307 Klärschlammproben, die drei unterschiedlichen Kläranlagen entnommen wurden, 297 Enteroviren zu isolieren. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Echovirus Typ 7 (22 %), Coxsackievirus B3 (16 %), Poliovirus 2 (15 %) und Echovirus Typ 24 (6 %). Ausgenommen von Polioviren wurden insgesamt 22 verschiedene humane Enteroviren detektiert. GRAFF et al. (1993) berichten von der kulturellen Isolierung von Hepatitis A-Virus aus behandelten und unbehandelten Klärschlämmen. Weitere Studien hatten gezeigt, dass Viren häufig durch anaerobe (STRAUB et al., 1994a) und aerobe (HURST, 1989) Behandlungen nicht vollständig inaktiviert werden. Demnach kommen Klärschlämmen neben kontaminiertem Abwasser eine besondere Bedeutung als Erregerreservoir zu.

Durch das steigende Müllaufkommen bei immer knapper werdendem Deponieraum kommt es zu einer ständigen Konzentrierung von Abfällen. Dadurch muss auch mit einer erhöhten mikrobiologischen Belastung gerechnet werden. Alle bereits erwähnten enteritischen Viren können durch die hohen Ausscheidungsraten von sowohl klinisch erkrankten als auch klinisch inapparent infizierten Individuen in den Hausmüll gelangen. Ebenso ist der Eintrag von Hepatitis B-Virus über kontaminierte Krankenhausabfälle oder Hygieneartikel aus Privathaushalten denkbar. Des Weiteren ist auch eine Kontamination der Abfälle im Deponiebereich durch Nagetierkot, insbesondere Rattenkot, mit **Hantaviren** möglich. Hierzu wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt.

Um bei Freilandmessungen einen Zusammenhang zwischen Virusaerosolen und der Emissionsquelle herzustellen, wurden Studien durchgeführt, in denen der Erregernachweis parallel im gesammelten Aerosol und im Substrat, meist Abwasser, erfolgte. Bei der kulturellen Isolierung von humanen Enteroviren im Bereich einer Kläranlage konnten TELTSCH et al. (1980) in 71 % aller untersuchten Abwasser- und in 44 % aller Luftproben erfolgreich Virus isolieren. Die Typisierung der Isolate ergab, dass in Abwasser häufiger Poliovirus nachgewiesen werden konnte. CARDUCCI et al. (2000) isolierten parallel aus Abwasser, Luft und Klärschlamm, wobei 55 % der Luft- und 55 % der Abwasser- bzw. 45 % der Luft- und 40 % der Klärschlammproben cytopathische Effekte in der Zellkultur zeigten. Die anschließende Identifizierung der Isolate mittels der RT-PCR ergab jedoch in den meisten Fällen Reovirus. In einer weiteren Studie enthielten 58 % der Abwasser- und 25 % der Luftproben humane Enteroviren. Der Nachweis erfolgte mit dem indirekten Immunfluoreszenztest. Interessanterweise konnten die Erreger in der Luft nur in den Monaten August bis November detektiert werden, wohingegen der Nachwies aus Abwasser über einen längeren Zeitraum (Juni bis Januar) möglich war (CARDUCCI et al., 1995). Unter Verwendung des XM-2 Sammlers konnten BRENNER et al. (1988) aus keiner der gezogenen Luftproben beim Verregnen von Abwasser Virus in der Zellkultur isolieren. Entsprechend waren auch alle untersuchten

Abwasserproben negativ. MOORE et al. (1979) hingegen konnten sowohl in Luft- als auch in Abwasserproben humane Enteroviren in der Zellkultur nachweisen. Der parallele Nachweis von Aujeszky-Virus aus Flüssig-, Festmist und Luftproben war in einer Studie von MACK et al. (1986) erfolgreich. Von 68 untersuchten Flüssigmistproben verursachten 46 typische cytopathische Effekte, ebenso 21 der 22 Festmistproben. 29 der 42 mit einem Elektropräzipitator und 33 der 47 mit einem Spezial-Impinger waren ebenfalls in der Zellkultur positiv. Die Ergebnisse wurden im Immunfluoreszenztest bestätigt.

2.3 Aufarbeitung von Umweltproben

Bevor der eigentliche Virusnachweis erfolgt, werden die Erreger aus Umweltproben häufig aufkonzentriert und gereinigt. Dies findet vor allem bei flüssigem Probenmaterial wie Abwasser und Luftproben, die mit Sammelflüssigkeiten arbeiten Anwendung. Die wichtigsten Reinigungs- und Konzentrationsverfahren von virushaltigen Suspensionen sind die Präzipitation, Adsorption, Zentrifugation und die Ultrafiltration, wobei die Methoden oft in Kombination eingesetzt werden. Vergleichende Studien zur Effektivität unterschiedlicher Methoden wurden vor allem im Bereich der Abwasseraufarbeitung durchgeführt. Entscheidend für die Wahl der Aufarbeitungsmethode ist zum einen die Beschaffenheit des Probenmaterials (Verschmutzung, Probenmenge), zum anderen das später eingesetzte Nachweissystem (kultureller Nachweis, RT-PCR, enzymimmunologische Detektion) und die Eigenschaften des nachzuweisenden Erregers (Stabilität, Größe usw.).

Zur Präzipitation werden hauptsächlich Polyethylenglycol (PEG), Ammoniumsulfat und Protaminsulfat, aber auch Alkohol und Zinkacetat, eingesetzt. pH-stabile Viren können auch durch Präzipitation am isoelektrischen Punkt (IEP) gefällt werden. Das Ausfällen von Stoffen wird durch Verdrängung (PEG), durch Änderung des pH-Wertes (IEP), durch Aussalzen (z.B. Ammoniumsulfat und andere Salze) oder durch Bildung unlöslicher Verbindungen erreicht. MACK et al. (1986) konzentrierten Probenflüssigkeiten, die unter Verwendung eines Spezial-Impingers beprobt worden waren, sowohl mit der PEG- als auch mit der Ammoniumsulfat-Fällung. Die Proben des LEAP-Sammlers hingegen wurden ultrabeschallt und abzentrifugiert. Auf diese Weise gelang es Aujeszky-Virus aus der Stallluft infizierter Bestände zu isolieren. Die Reisolierungsrate lag dabei bei 46,2 %. In den Experimenten von SCHWAB et al. (1991) wurde mit PEG aus Trinkwasser eine Wiederfindung von 90 bis 95 % der zugesetzten Viren ermittelt, wohingegen SHIEH et al. (1997) von 44 % aus Abwasser berichten. In einer Studie von LEWIS und METCALF (1988) ergaben sich unter Verwendung von PEG zur Präzipitation von Viren in Oberflächenwasser ebenfalls hohe Wiederfindungsraten. Es konnten 86 % der zugesetzten Hepatitis A-Viren, 77 bzw. 87 % der Rotaviren und 86 % der Polioviren wieder gefunden werden. Für Hepatitis A- und Rotavirus ließen sich in Laborversuchen bessere Ergebnisse erzielen als mit der organischen Fällung.

Zur Adsorption von Viren werden verschieden Adsorbenzien eingesetzt. Neben Kalziumphosphat, Kalziumsulfat, Aluminiumsulfat und Bariumsulfat finden vor allem Membranfilter Anwendung. Eine Adsorption erfordert eine Elution der Viren, die beispielsweise mit Beef-Extrakt, mit verschiedenen Beef-Extrakt Substituenten oder mit foetalem Kälberserum erfolgt. Durch die Adsorption an Aluminiumsulfat konnten SETTNISCH et al. (1982) humane Enteroviren in der Luft in der Umgebung einer Abwasserreinigungsanlage nachweisen. Die Luftproben wurden dabei mit dem Fangtopf (Sedimentation) und einem Spezial-Impinger gezogen. Des Weiteren wurden die Viren, die nach dem Prinzip der Filtration gesammelt worden waren, mit Hanks-Lactalbuminhydrolysat-Lösung (pH 8,0) vom Trägermaterial eluiert. Die Rückgewinnung von auf Gaze beaufschlagtem Poliovirus durch Elution mit Glycin-Puffer (pH 11,5) untersuchten GERBA et al. (1975). Hierbei ergab sich eine Wiederfindung zwischen 75 und 97,5 %. CARDUCCI et al. (2000) gelang es, luftgetragene Entero- und Reoviren zu isolieren, indem sie die mit dem "SAS-Super 90 air sampler" gesammelten Viren mit 3 % Beef-Extrakt von dem zuvor zerkleinerten Nährboden eluierten. Vorversuche ergaben eine Wiederfindung von 19 bis 68 % (CARDUCCI et al., 1995). In einer Studie von WALLIS et al. (1985) zur Aerosolbildung beim Spülvorgang von Toiletten wurden die Viren des beprobten Filters (0,45 μ m) stufenweise mit insgesamt 800 ml Glycin-Puffer (pH 10) eluiert. Das Eluat wurde weiter aufkonzentriert, indem es unter Druck durch ein weiteres Filter (0,25 μ m) gepresst und abschließend erneut mit 6 ml Glycin-Puffer eluiert wurde. In Vorversuchen wurde die Effizienz der Aufarbeitung anhand Poliovirus-kontaminierter Filter überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Wiederfindung bei hohen Konzentrationen (10⁶ PFU) 107 % und bei niedrigen (10³ PFU) durchschnittlich 50 % betrug.

Das Prinzip der Adsorption findet vor allem auch bei der Aufkonzentrierung von Viren aus unterschiedlichen Wässern Anwendung. Auf diese Weise können große Volumenmengen aufgearbeitet werden. GANTZER et al. (1997) verglichen den Einsatz von Glaswolle und Glaspuder zur Aufkonzentrierung humaner Enteroviren aus 40 l geklärtem Abwasser. Die Elution erfolgte mit 300 ml Beef-Extrakt (3 %). In der anschließenden RT-PCR ergaben sich für beide Methoden entsprechende Ergebnisse. Die Isolierung von Poliovirus aus Abwasser gelang GRABOW et al. (1999). Hierzu wurden 9 l Abwasser über eine Säule mit Glaswolle geleitet. Die Erreger wurden mit 100 ml Glycin-Beef-Puffer eluiert und anschließend in der Zellkultur detektiert. Dabei wurde von einer Wiederfindung von 60 bis 95 % ausgegangen. Sie ist vor allem vom Trübungsgrad und Anteil der Feststoffe in der Probe abhängig. PUIG et al. (1994) konzentrierten 50 l Abwasser unter Verwendung von Glaspuder auf und konnten somit in 75 % aller untersuchten Proben humane Enteroviren detektieren. Vorversuche ergaben eine Wiederfindung von 60 %. Die Konzentrierung von Viren aus geklärtem Siedlungsabwasser mit Glasmilch (Siliciumdioxid) schildern LEISINGER und METZLER (1997). Die Adsorption an adsorptiv wirkende Filtersysteme ist in der Literatur vielfach beschrieben. Die Wiederfindung ist dabei von der Wasserqualität, der Filterfläche und der Probenmenge abhängig (YANO et al., 1991; DUMKE und FEUERPFEIL, 1997). Es werden hauptsächlich elektropositive Filter eingesetzt, für die sich in Laborversuchen eine Reisolierungsrate von 50 % ergab (SOBSEY, 1986). Die Adsorption von Viren an Zelta-Plus Filter untersuchten YANO et al. (1991). Die Wiederfindung wurde anhand von mit Poliovirus versetztem Flusswasser bestimmt. Die Studie zeigte, dass die eingesetzten Filter die besten Ergebnisse bei einer Probenmenge von weniger als einem Liter lieferten. Es wurden dabei 20 bis 61 % der eingesetzten Virusmenge wieder gefunden. Unter Verwendung elektropositiver Filter gelang ROSE et al. (1986) die Isolierung von humanen Enteroviren und Rotaviren aus Wässern einer Kläranlage und ABBASZADEGAN et al. (1993) die Detektion von Enteroviren in Grundwasser.

Unter der Virusreinigung und -konzentrierung durch **Zentrifugation** versteht man das fraktionierte Zentrifugieren, d.h. das nieder- und hochtouriges Zentrifugieren der virushaltigen Flüssigkeit. In einer Studie von McGARRITY und DION (1978) zur aerogenen Übertragung von Polyoma-Virus wurde diese Methode zur Aufarbeitung der Luftproben gewählt. Zuerst wurde die Sammelflüssigkeit bei 16000 x g für 20 min. zentrifugiert und das Pellet anschließend in Puffer aufgenommen. Die zweite Zentrifugation, auch als Ultrazentrifugation bezeichnet, wurde für 60 min. bei 82600 x g durchgeführt, indem das resuspendierte Pellet zuvor auf ein 10 %iges CsCl Kissen pipettiert wurde. Das Pellet wurde abschließend wieder in Puffer gelöst und auf Viren untersucht. Auf diese Weise konnten die Proben um den Faktor 300 aufkonzentriert werden. Die Ultrazentrifugation mittels Gradienten wurde in der Vergangenheit zur Charakterisierung von Viren verwendet. Noch heute wird sie vor allem zur Reinigung von Viren aus Kulturüberständen eingesetzt (SHIEH et al., 1991; IJAZ et al., 1994 und 1987; WILDE et al., 1990; DeLEON et al., 1990). Zur Reinigung von

Virussuspensionen eignen sich vor allem Succrose, Ficoll, Nycodenz, Metrizamid, CsCl und Percoll als Trennmittel, wobei der Einsatz von Stufengradienten bei der Abtrennung von Zellen oder Viren gute Ergebnisse liefert (HERZOG, 1986). BUSTOS et al. (1991) setzten Percoll und Succrosegradienten zur Reinigung von Rubella-Virus ein, wobei sie unter Verwendung von Percoll bessere Ergebnisse erzielten. Mit Percoll lag die Wiederfindung bei 72 %, wohingegen mit Succrose nur 8,6 % wieder gefunden wurde. Von entsprechenden Resultaten berichten CARRASCOSA et al. (1985) bei der Reinigung von Afrikanischem-Schweinefieber-Virus. Unter Verwendung von Percoll war die Wiederfindung infektiöser Viruspartikel 20-mal höher als beim Einsatz von Succrose. Percoll hat den Vorteil, dass es sich um ein nicht toxisch wirkendes Trennmittel geringer Viskosität handelt, das auf Viren nicht inaktivierend wirkt. Durch kurze Zentrifugationszeiten wird der mechanische Stress vor allem auf unbehüllte Viren minimiert. Des weiteren zeichnet es sich durch eine geringe Osmolarität aus, ist autoklavierbar und hat keinen Einfluss auf nachgeschaltete Detektionssysteme (SVENNERHOLM et al., 1980; ANONYM e), 1995). Für Succrose ist der Zusammenhang zwischen Konzentration, Dichte, Brechungsindex und Viskosität bekannt. Auch sie hat keinerlei schädigende Wirkung auf Viren, wodurch Infektiosität und Struktur der Erreger erhalten bleiben. Nachteilig ist jedoch, dass hoch konzentrierte Lösungen sehr viskos sind und in Konzentrationen über 9 Vol.-% hyperton wirken. Problematisch ist auch die Tatsache, dass Succrose oft mit Ribonukleasen kontaminiert ist, das vor allem bei der Trennung von RNA von Bedeutung ist (HERZOG, 1986).

Bei der Ultrafiltration werden virushaltige Suspensionen durch keramische, Glas-, Asbestund/ oder Membranfilter filtriert. Auf diese Weise lassen sich auch große Probenmengen einfach aufarbeiten, wobei es zu einer Partikelkonzentrierung von mehreren Zehnerpotenzen kommen kann. SCHWAB et al. (1991) verwendeten Zentrifugenkonzentratoren mit den Ausschlussgrößen 100, 300 und 1000 kD. Als Testviren setzten sie Polio- und Hepatitis A-Virus ein. Bei einer 100 kD Membran wurden mehr als 99 % Polio- und Hepatitis A-Virus, bei 300 kD 70 % Polio- und 98 % Hepatitis A-Virus und bei 1000 kD nur 2 % Poliovirus wohingegen 65 % Hepatitis A-Virus wieder gefunden wurden. TSAI et al. (1994) konzentrierten über ein Centriprep und Centricon mit 100 kD Membran Meer- und Abwasser zum Nachweis von Polio-, Rota- und Hepatitis A-Virus auf. Die Detektion von Rotaviren aus Flüssen, Meer und Abwasser gelang GENTHE et al. (1991), nachdem die Proben über Ultrafiltration konzentriert waren. STRAPPE (1991) verglich die organische Fällung, Ultrafiltration und Dialyse zur Aufkonzentrierung von Rotaviren aus Oberflächenwasser. Die besten Ergebnisse mit einer Wiederfindung von 60 % wurde mit der Dialyse, die schlechtesten mit nur 4 % unter Verwendung der Fällungsreaktion erzielt. Mit der Ultrafiltration konnte 48 % der eingesetzten Virusmenge detektiert werden. In einer Untersuchung zum molekularbiologischen Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Abwasser wurde von DIVIZIA et al. (1998) neben der Adsorption an Filtern und der Präzipitation mit PEG auch die Ultrafiltration eingesetzt. Nach der Ultrafiltration erwiesen sich 80 % aller untersuchter Abwasserproben als virus-positiv, wohingegen nach der Adsorption an Filtermaterialien 30 % und nach der Präzipitation nur 20 % der Proben positive Ergebnisse lieferten. GILGEN et al. (1997) verwendeten zur Aufarbeitung ihrer Wasserproben die Adsorption an eine elektropositive Membran und die Ultrafiltration. Auf diese Weise gelang es ihnen, humane Enteroviren, Rotavirus und "Small round structured" Virus aus Flusswasser mit der PCR nachzuweisen. Nachdem 100 bis 200 1 Wasser über ein Filter geleitet und die Mikroorganismen mit Beef-Extrakt eluiert waren, wurde das Eluat mittels der Ultrafiltration (10 kD) weiter aufkonzentriert. VAN OLPHEN et al. (1991) konnten bei der im Anschluss durchgeführten Inokulation in der Zellkultur cytopathisch wirkende Viren in Badegewässern detektieren.

Neben den bisher beschriebenen Methoden findet auch das **Ausschütteln** mit Phenol-Chloroform zur Reinigung von Viren aus Umweltproben Anwendung. Diese Methode lässt sich nur für Chloroform-resistente Viren wie Picorna-, Reo-, Parvo-, Papova- und Adenoviren anwenden. Besonders bei stark mikrobiell verunreinigten Virusproben ist eine Chloroformbehandlung empfehlenswert (MAYR et al., 1977). KOPECKA et al. (1993) setzten dieses Verfahren zur Aufarbeitung von 10 ml Klärschlamm ein. Sowohl mit der RT-PCR als auch in der Zellkultur gelang somit der Nachweis von humanen Enteroviren.

Des Weiteren werden kombinierte Aufarbeitungsmethoden, die zum Teil sehr arbeits- und zeitintensiv sind beschrieben. PFIRRMANN (1994) verwendete in ihrer Arbeit zum Nachweis luftgetragener Viren an Standorten der Abfallentsorgung die Hydroextraktion mit PEG in Kombination einer gestaffelten Zentrifugation. Durch die Solubilisierung des pelletierten Materials mit anionischem Tensid (SDS) und anschließender Ultraschallbehandlung zur Isolierung unbehüllter Viren und der Elution der Pellets mit Beef-Extrakt zur Isolierung behüllter Viren konnte sie auf verschiedenen Zellkulturen in 49 von 165 untersuchten Proben Virus nachweisen. Im Einzelnen handelte es sich um Coxsackie B, Echound Herpes-simplex-Viren. JOTHIKUMAR et al. (1993) beschreiben eine sehr aufwendige Methode zur Konzentrierung von Virus aus Abwasser. Dabei kommt die Adsorption der Erreger an verschiedene Filter, mehrere Zentrifugationsschritte, Phenol-Chloroformextraktion und die Präzipitationen mit Ammoniumsulfat zum Einsatz. Unter Verwendung von mit Poliovirus kontaminierten Abwasserproben konnte eine Wiederfindung von 90 % ermittelt werden. Mit dieser Methode gelang es erstmals Hepatitis E-Virus aus Abwasser einer Kläranlage in Indien nachzuweisen. In einer Studie von SHIEH et al. (1997) zum Nachweis enteritischer Viren aus kommunalen Abwässern und Flugzeugtoiletten werden zuerst die Feststoffe aus dem Proben-material abgetrennt. Anschließend werden die Viren aus beiden Fraktionen isoliert. Hierzu wurden Fällungen mit PEG, Zentrifugation, Chloroformextraktion und Säulenchromatographie verwendet. Die Effizienz der Methoden wurde anhand von mit Virus versetztem Probenmaterial bestimmt.

In der Literatur sind neben den Aerosolstudien, die in Aerosolkammern durchgeführt werden, auch zahlreiche Untersuchungen beschrieben, bei denen auf eine aufwendige Aufarbeitung der Luftproben verzichtet wird. FANNIN et al. (1985) behandelten ihre beprobten Sammel-flüssigkeiten vor der Inokulation in der Zellkultur mit Ultraschall und filtrierten sie anschließend durch ein 0,2 µm Membranfilter, das zuvor mit Hitze inaktiviertem foetalem Kälberserum getränkt worden war. Dabei konnten aus zwei von neun untersuchten Proben humane Enteroviren isoliert werden. TELTSCH et al. (1980) isolierten aus 44 % ihrer untersuchten Luftproben Enteroviren, wobei sie die tatsächlich in der Luft vorkommenden Konzentrationen um den Faktor 10 bis 100 höher einschätzen. Sie führen dies auf die angewandte Methode zurück. Aus einem Probenvolumen von 120 ml wurden 2 ml in der Zell-kultur inokuliert. In weiteren Studien von BOURGUEIL et al. (1992a und 1992b), TELTSCH und KATZENELSON (1978), SELLERS und HERNIMAN (1974), SELLERS und PARKER (1969), DONALDSON et al. (1979) und WILKINSON et al. (1977) wurde ebenfalls ein Aliquot der beprobten Sammelflüssigkeit ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt auf die Zellkultur übertragen.

2.4 Virusisolierung und -identifizierung

Zur Virusisolierung und Virusidentifizierung sind zahlreiche Methoden beschrieben. Die wichtigsten werden in diesem Kapitel erläutert, wobei auf die kulturelle Virusisolierung und den molekularbiologischen Erregernachweis näher eingegangen wird. Neben der Probenaufarbeitung ist auch die Wahl des angewendeten Detektionssystems von verschiedenen Faktoren wie z.B. Vermehrungsfähigkeit des Erregers in der Zellkultur, Begleitsubstanzen im

Probenmaterial, Fragestellung (Virusisolierung für weitere Untersuchungen oder nur Detektion, rein qualitative und/oder quantitative Aussage) und Probenmenge abhängig.

2.4.1 Physikochemische Methoden

Zur Grobidentifizierung, d.h. zum Zuordnen zu einer Virusgruppe, können verschiedene physikochemische Methoden eingesetzt werden (BONIN, 1973). Dabei wird die ungefähre Partikelgröße mit Hilfe von Membranfiltern unterschiedlicher Porengrößen bestimmt. Das Verhalten der Viren gegenüber Lipidlösungsmitteln, z.B. Chloroform, gibt Auskunft über das Vorhandensein einer Lipidhülle. Die Bestimmung des Nukleinsäuretyps wird durch Blockierung der DNA-Synthese ermöglicht. Dazu werden meist halogenierte Uridine, die den Einbau von Thymidin in die DNA verhindern, verwendet. Des Weiteren sind die Virusarten auch durch ihre spezifische Dichte definiert, die im Dichtegradienten (in CsCl oder Succrose) ermittelt wird. PFIRRMANN (1994) charakterisierte die im Rahmen ihrer Studie zum Vorkommen luftgetragener Viren an Arbeitsplätzen der Abfallwirtschaft isolierten Viren unter Verwendung dieser Methoden. Aufgrund der Eigenschaften konnte sie die Isolate der Familie der *Picornaviridae* zuordnen.

2.4.2 Immunologische Methoden

Der immunologische Erregernachweis erfolgt im Radio-Immuno-Assay (RIA), Immunfluoreszenztest (IFT) oder Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Die Sensitivität und Spezifität des Testsystems wird dabei hauptsächlich durch die Qualität der verwendeten Antikörper bestimmt. Daher werden meist monoklonale Antikörper eingesetzt. Die Schwierigkeit immunologischer Nachweise besteht in der Definition und Standardisierung spezifischer Erregerantigene (BUTTNER et al., 1997). Der Vorteil immunologischer Nachweissysteme ist, dass sich auch nicht cytopathogene Viren und Viren, die sich nur sehr schwer und/oder langsam in Kultur vermehren, nachweisen lassen. Da sich das Hepatitis A-Virus vom Wildtyp ohne erkennbare cytopathischen Effekte in der Zellkultur sehr schwer oder überhaupt nicht vermehren lässt, werden sie immunologisch nachgewiesen (TICEHURST et al., 1987). McGREGOR et al. (1983) stellten drei monoklonale Antikörper her, die sich in einer umfassenden Untersuchung als sehr wertvoll für die Diagnostik und Erforschung von Hepatitis A-Virus erwiesen. Für den Nachweis von Rotaviren werden häufig ebenfalls immunologische Verfahren eingesetzt, die von verschiedenen Firmen als kommerziell erhältliche Testkits angeboten werden, wobei hier der Antigennachweis direkt aus der Probe erfolgt. CUBITT (1991) hält sie für empfindlich und spezifisch, wodurch sie für die Virusdiagnose vor Ort in Wasser geeignet sind. Eine Studie von GENTHE et al. (1991) ergab hingegen, dass der von ihnen beschriebene ELISA 10⁵-fach sensitiver ist als zwei Testkits. die nach dem Prinzip der Latex-Agglutination und einem ELISA (ohne Inokulation der Probe in der Zellkultur) arbeiten. Die Autoren führen dies auf die Virusvermehrung während der Inkubation der Probe in der Zellkultur zurück, wodurch die Menge des Antigens ansteigt. Hantaviren vermehren sich ebenfalls sehr langsam und meist ohne cytopathische Effekte in der Zellkultur (ROLLIN et al., 1995; GRANKVIST et al., 1992; MARSHALL und STONE, 1993) und werden daher in der Regel immunologisch nachgewiesen, wobei sich auch hier eine vorangegangene Vermehrung in der Zellkultur positiv auf die Sensitivität auswirkt (XIAO et al., 1991). Nach Angaben von SAWYER (1999) sind immunologische Methoden für die Routinediagnostik von humanen Enteroviren ungeeignet, da die Gruppe sehr viele Subtypen umfasst und die Methoden zu viel Zeit benötigt. Für den RIA und ELISA werden große Virusmengen (10 bis 100 Viruspartikel) benötigt. Dies erschwert die Anwendung dieser Methoden für Umweltproben, da dort die Viruskonzentrationen meist sehr gering sind (GERBA und ROSE, 1990). WALTER (2000) hält die Anwendung von immunologischen Verfahren ebenfalls für ungeeignet für die Umweltvirologie, da sehr hohe Viruskonzentrationen (8 x 10^3 bis 10^6 Viren) im Untersuchungsmaterial vorhanden sein müssen.

Der Immunfluoreszenztest (IFT) ist darauf ausgerichtet, in infizierten Zellen oder Gewebeschnitten Viren oder Virusproteine mit einem bekannten gegengerichteten Fluorochrom-markierten Antikörper nachzuweisen. Der Immunkomplex wird durch Bestrahlung mit kurz-welligem Licht durch Auftreten einer lokalisierten Fluoreszenz sichtbar gemacht. Dadurch wird das Virus nicht nur identifiziert, es werden zusätzlich Informationen über den Ort der Virusvermehrung in der Zelle gewonnen (Zytoplasma-, Kernfluoreszenz) (ROLLE und MAYR, 1993). CARDUCCI et al. (1995) konnten unter Verwendung eines IFT humane Enteroviren in der Luft einer Kläranlage nachweisen. Die Detektion von Aujeszky-Virus aus der Stalluft infizierter Bestände gelang MACK et al. (1986). ROSE et al. (1986) überprüften Abwasser an verschiedenen Stellen einer Kläranlage auf das Vorhandensein von Rotaviren. Der IFT kann auch zur Quantifizierung von Erregern eingesetzt werden. STRAPPE (1991) ermittelte die Reisolierungsraten beim Vergleich verschiedener Methoden zur Aufkonzentrierung von Rotaviren aus Wasser. DeLEON et al. (1990) und SCHWAB et al. (1991) bestimmten die Sensitivität ihres molekularbiologischen Rotavirusnachweises aus Wasser neben dem Plaquetest auch mit dem IFT. Die Hepatitis A-Virusvermehrung in verschiedenen Zellsystemen wurde von CHITAMBAR et al. (1994) untersucht. Hierzu wurden die Zellkulturen nach unterschiedlich langen Bebrütungszeiten angefärbt. Es zeigte sich, dass nach einer Woche ca. 24 % und nach zwei Wochen 95 % der Zellen Fluoreszenz aufwiesen. Die Ausbreitung der Infektion von Hantaviren in der Zellkultur wird von ROLLIN et al. (1995) beschrieben. Nach 42 Tagen ließen sich 10 bis 15 % und nach 56 Tagen 50 bis 60 % des Zellrasens anfärben. Der IFT wird häufig bei der Detektion von Hantaviren aus Gewebeschnitten (CHU et al., 1995; AVSIC-ZUPANC et al., 1992; GLIGIC et al., 1989; XIAO et al., 1991; KIM et al., 1994) angewendet.

Der enzymgebunden Immunadsorptionstest (Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay ELISA) ist eine hoch spezifische serologische Reaktion zum Nachweis, zur Identifizierung und Quantifizierung von Viren und Virusproteinen. Die hohe Spezifität wird durch den Einsatz gereinigter hoch spezifischer Antikörper erreicht. Als Indikator für das Antigen oder beim "Sandwitch"-Verfahren gegen den ersten Antikörper fungieren mit Enzymen gekoppelte Immunglobuline, die gegen das gesuchte Virus gerichtet sind, sich an dieses binden und durch Zugabe eines Substrates eine sicht- und messbare Farbreaktion ergeben (ROLLE und MAYR, 1993). Der Antigennachweis kann direkt aus der Probe erfolgen oder entsprechend dem IFT nach der Inokulation der Probe auf einer empfänglichen Zelllinie in der Zelle. Der ELISA ist die Standardmethode der World Health Organization (WHO) zum Nachweis von Rotaviren in Stuhlproben. Er wurde von BEARDS et al. (1984) entwickelt, wobei sowohl monoklonale Antikörper als auch polyvalentes Antiserum eingesetzt werden. Beide ELISAs zeigten eine höhere Empfindlichkeit als die Elektronenmikroskopie. GENTHE et al. (1991) gelang es mit einem ELISA infektiöse Rotaviren in Flüssen, Meerwasser und Abwasser nachzuweisen. Eine Quantifizierung der Erreger wurde nicht durchgeführt. Die Empfindlichkeit ihrer Probenaufarbeitung und des PCR-Nachweises zur Detektion von Rotaviren in geklärtem Siedlungsabwasser bestimmten LEISINGER und METZLER (1997) unter Verwendung eines ELISA. CHITAMBAR et al. (1994) führten eine Studie zur Optimierung der Vermehrung von Hepatitis A-Virus in Zellsystemen durch. Der Virustiter im Zellkulturüberstand wurde im ELISA ermittelt. Neben dem IFT wird v.a. der ELISA zur Detektion von Hantaviren eingesetzt. Beim Antigen Nachweis direkt aus Urin ergab sich in einer Untersuchung von HÖRLING et al. (1995) für den ELISA eine Nachweisgrenze von 50 PFU/ml. ALEXEYEV et al. (1996) bestimmten die Sensitivität ihres Testsystems (0,5 ng/ml) anhand einer Verdünnungsreihe eines rekombinanten Nukleokapsidproteins.

Der Radioimmuntest (*Radio-Immuno-Assay* RIA) ist dem ELISA sehr ähnlich. Er ermöglicht den Nachweis von Antigenen in Pikogramm oder Nanogramm Konzentrationen, ist also äußerst empfindlich. Die induzierten Antikörper werden dabei, anstatt mit einem Enzym mit einem radioaktiven Isotop (Jod) gekoppelt. Die Testreaktion muss mit einer Eichgeraden verglichen werden. In der Virologie wird der RIA routinemäßig nur noch selten genutzt (ROLLE und MAYR, 1993). In einer Studie zur Konzentrierung humanpathogener Viren aus Umweltproben mit PEG setzten LEWIS und METCALF (1988) einen "*solid-phase*"-RIA zur Detektion von Hepatitis A-Virus ein. Eine vergleichende Untersuchung zum Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Lebergewebe, Serum und Kot mit der cDNA-Hybridisierung, der Elektronenmikroskopie und dem RIA wurde von TICEHURST et al. (1987) durchgeführt. Dabei war die Hybridisierung um eine Zehnerpotenz empfindlicher als die beiden anderen Methoden. HAIKALA et al. (1983) untersuchten 115 Stuhlproben auf das Vorhandensein von Rotaviren. Der Nachweis erfolgte neben der Elektronenmikroskopie mit einer Agglutination und dem RIA. Dabei waren 62 Proben mit der Agglutination und 67 der untersuchten Proben mit dem RIA Rotavirus-positiv.

Weiterhin wird der Neutralisationstest eingesetzt. Er basiert auf der Bindung spezifischer Antikörper an die für die Zellinfektion maßgeblichen Oberflächenantigene eines Virus. Hat eine solche Bindung stattgefunden, dann wird die Ankopplung des Virus an den Rezeptor einer empfänglichen Zelle verhindert. In dieser Reaktion wird somit die Virusinfektiosität "neutralisiert". Der Test ist eine "Alles oder Nichts Reaktion", während beim Plaque-Reduktionstest auch eine partielle Neutralisation erfasst werden kann, die als Überlebensrate berechnet wird (MAYR et al., 1977). Das St. Louis-Encephalitis-Virus wurde in einer Aerosolstudie von RABEY et al. (1969) mit dem Neutralisationstest detektiert. Der Neutralisationstest mittels dem "Lim-Benyesh-Melnick serum pool" wird häufig zur Identifizierung humaner Enteroviren eingesetzt. PFIRRMANN (1994) verwendete ihn neben kommerziell erhältlichen Pferdeseren zur Typisierung ihrer aus Luft isolierten Enteroviren. Die Isolate, die nicht als Enteroviren klassifiziert wurden, konnte sie im Plaque-Reduktionstest typisieren. Die Charakterisierung von humanen Enteroviren, die aus Abwasser, geklärtem Wasser und Klärschlamm isoliert wurden, mit dem "Lim-Benyesh-Melnick serum pool" ist in der Literatur hinreichend beschrieben (HAMPARIAN et al., 1985; ROSE et al., 1986; SHIEH et al., 1991; SHIEH et al., 1997; GRABOW et al., 1999,). TELTSCH et al. (1980), TELTSCH und KATZENELSON (1978) sowie FANNIN et al. (1985) typisierten aus Luftproben isolierte humane Enteroviren mit Hilfe des Neutralisationstests. Die kulturelle Isolierung und Charakterisierung von humanen Rotaviren aus Stuhlproben beschreiben WYATT et al. (1983). Dabei konnten vier Serotypen mit dem Plaque-Reduktionstest und dem Neutralisationstest definiert werden. Die Definition neuer Hantavirus Subtypen erfolgt meist, indem das neue Isolat neben der PCR im Plaque-Reduktionstest überprüft wird (GLIGIC et al., 1992). Dabei erweist sich jedoch die langsame Virusvermehrung mit geringem Virustiter und fehlenden cytopathischen Eigenschaften mancher Hantaviren als problematisch (HÖRLING et al., 1996). PUTHA-VATHANA et al. (1992 und 1993) etablierten eine PCR zur Typisierung von Hantavirus Isolaten, wobei die Ergebnisse mit denen des Plaque-Reduktionstests verglichen wurden. Beide Verfahren lieferten entsprechende Resultate.

2.4.3 Nachweis im Tierversuch

Der Erregernachweis kann im Versuchstier erfolgen, indem Probenmaterial einer empfänglichen Tierart injiziert wird, und die darauf folgende Immunreaktion (Antikörperproduktion) oder Virusvermehrung beobachtet wird. McGARRITY und DION (1978) führten eine Studie zur aerogenen Übertragung von Polyoma-Virus innerhalb eines Mäuselabors durch. Die Luftproben wurden durch fraktionierte Zentrifugation aufgearbeitet und anschließend Mäusen intraperitoneal gespritzt. Die Produktion spezifischer Antikörper wurde nach zwei Wochen unter Verwendung des Hämagglutinationstests untersucht. Der Nachweis luftgetragenen MKS-Virus in Tierställen wurde von SELLERS und PARKER (1969) und DONALDSON et al. (1970) sowohl in der Zellkultur als auch in Mäusen durchgeführt. DONALDSON et al. (1970) zeigten, dass die Zellkultur dem Tierversuch entsprechende Ergebnisse liefert. Um luftgetragenes Newcastle-Disease-Virus zu detektieren, inkubierten HUGH-JONES et al. (1973) 100 µl Sammelflüssigkeit in neun Tage bebrütete Hühnereier. Nach dem Absterben des Embryos wurde das Virus im Hämagglutinationstest überprüft. Da sich das Hepatitis B-Virus nicht in der Zellkultur vermehren lässt, ist die Inokulation in Schimpansen und wenigen anderen Primaten die einzige Möglichkeit infektiöse Partikel nachzuweisen (KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN, 2000). Zum Nachweis von Hantaviren aus Blut und Urin werden die Proben Versuchstieren gespritzt und die Gewebe nach einer bestimmten Inkubationszeit mit dem IFT getestet (XIAO et al., 1991).

2.4.4 Elektronenmikroskopie

Mittels der Elektronenmikroskopie (EM) kann ein Virus sehr schnell nachgewiesen werden. Dieses optische Verfahren ist jedoch nur sinnvoll, wenn die Probe relativ reines und konzentriertes Virus enthält. Die Methode kann zur Virusidentifizierung eingesetzt werden. Die Partikel lassen sich aufgrund ihrer Morphologie bestimmten Virusfamilien zuordnen. Die EM liefert jedoch keine Aussage über die Infektiosität eines Viruspartikels. PFIRRMANN (1994) verwendete u.a. dieses Verfahren, um ihre Isolate, die im Rahmen ihrer Untersuchung zum Vorkommen luftgetragener Viren an Arbeitsplätzen der Müllentsorgung isoliert wurden, zu charakterisieren. JOHL et al. (1991) untersuchten Wasser der Elbe auf das Vorhandensein von Viren. Sie setzten neben serologischen Methoden die EM ein, um ihre Isolate bestimmten Virusfamilien zuzuordnen. Es werden Picorna-, Adeno- und Parvoviren beschrieben. Die Identifizierung von Reoviridae, die aus Klärschlamm isoliert wurden, wird von HAM-PARIAN et al. (1985) beschrieben. SMITH und GERBA (1982) verwendeten neben dem Neutralisationstest und dem IFT die EM, um ihre Ergebnisse abzusichern. Demnach waren die aus Abwasser stammenden Virusisolate eindeutig Feldisolate und nicht auf eine Laborkontamination zurückzuführen. Die EM kann auch zur Quantifizierung von Viruspartikeln herangezogen werden. Dabei stehen v.a. Sensitivitätsbestimmungen im Bereich des Methodenvergleichs und der Methodenetablierung im Vordergrund (JIANG et al., 1986; LEWIS und METCALF, 1988; BEAULIEUX et al. 1997).

2.4.5 Zellkultur

Virusarten unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften. Anhand des Zellspektrums sowie der Morphologie der cytopathischen Effekte bzw. der Vermehrung ohne erkennbaren Effekt können Unterschiede festgestellt werden. In der Zellkultur lassen sich nur infektiöse bzw. vermehrungsfähige Partikel isolieren und nachweisen. Zum kulturellen Erregernachweis wird die Probe und/oder entsprechende Verdünnungen in einem empfänglichen Zellsystem inokuliert. Obwohl die eingesetzte **Probenmenge** von großer Bedeutung für den Erfolg der Virusisolierung ist (HAMPARIAN et al., 1985), wird sie in den meisten Publikationen nicht erwähnt. TELTSCH und KATZENELSON (1978) inokulierten 20 ml Sammelflüssigkeit zum Nachweis luftgetragener humaner Enteroviren, GANTZER et al. (1998) 10 ml und ROSE et al. (1986) 2 ml aufkonzentrierte Wasserproben, wohingegen PUIG et al. (1994) nur 250 µl aufgearbeitete Abwasserproben zur Isolierung von Adenoviren einsetzten.

Bei der klassischen Virusvermehrung wird die Virussuspension i.d.R. nach einer Inkubation von 1 bis 2 h wieder abgezogen, der Zellrasen mit Zellkulturmedium oder PBS gewaschen und abschließend wieder Nährflüssigkeit hinzugegeben. FANNIN et al. (1985) isolierten nach diesem Prinzip humane Enteroviren aus beaufschlagten Luftkeimsammelmedien. Die Inokulation betrug dabei 2 h. MOORE et al. (1979) inkubierten ihre Luft- und Abwasserproben für 45 bis 60 min. Auch ihnen gelang der Nachweis humaner Enteroviren. In den meisten in der Literatur dokumentierten Studien zum kulturellen Virusnachweis aus Luft und Wasser ver-

bleibt die aufgetragene Probe im Zellsystem, häufig auch ohne vorherige Aufarbeitung der Proben. Es folgt lediglich die Zugabe von Kulturmedium. Anders verhält es sich bei stark verschmutzten oder mit zelltoxischen Substanzen versehenen Proben. MACK et al. (1986) berichten von Problemen bei der kulturellen Virusisolierung von Aujeszky-Virus aus Flüssigmist und PINA et al. (1998) bei der Inokulation von Abwasserproben. Bei der Isolierung von humanen Enteroviren aus Klärschlamm wurde die Probe zum Kulturmedium hinzugegeben und nach 1 h wieder entfernt. Auf diese Weise konnte die toxische Wirkung der Eluate verhindert werden (HAMPARIAN et al., 1985). Ebenso verhielt es sich bei der Isolierung von humanen Enteroviren und Rotaviren aus Abwasserkonzentraten. Die Probe wurde nach 45 min. wieder entfernt und der Zellrasen mit Medium gewaschen (SHIEH et al., 1997), wohingegen SMITH und GERBA (1982) eine Filtration zur Abtrennung der Substanzen vorschlagen. In der Untersuchung von PFIRRMANN (1994) bereiteten die Eluate der aufbereiteten Luftproben aufgrund ihrer Toxizität Probleme. Die Proben wurden in das Zellkulturmedium gegeben (1:10 verdünnt) und nach 2 h wieder abgenommen. Neben zell-toxischen Substanzen wird von Stoffen berichtet, die sich hemmend auf die Infektiosität von Viren auswirken (PRESTON et al., 1990). Da jede Umweltprobe eine andere Zusammensetzung aufweist, ist bis jetzt wenig über solche Stoffe in Umweltmaterialien bekannt (ABBAS-ZADEGAN et al., 1999).

Die im Anschluss daran benötigte Beobachtungsdauer ist für die Effizienz des Virusnachweises auf Zellkulturen von großer Bedeutung und ist vom Erreger und dem eingesetzten Zellsystem abhängig. Die Virusausbeute, die man nach einer Zellkulturpassage von maximal 10 Tagen erhält, erhöht sich deutlich, wenn das gesamte Material dieses Versuchsansatzes in einer zweiten Kulturpassage beobachtet wird. Weitere Passagen erhöhen die Ausbeute, wobei zwei Beobachtungspassagen nach Angaben von WALTER (2000) ein Minimum zum Nachweis aus Umweltmaterialien sind. In den meisten Studien wird zum Nachweis von humanen Enteroviren von zwei Zellpassagen berichtet (ROSE et al., 1986; GANTZER et al., 1998; ABBASZADEGAN et al., 1999; GRABOW et al., 2000). DUMKE und FEUERPFEIL (1997) und JOHL et al. (1991) führten mehrere Passagen durch, so dass eine Gesamtbeobachtungsdauer von 35 Tagen erfolgt war. Auf diese Weise gelang es, Enteroviren innerhalb der Trinkwasseraufbereitung bzw. aus Oberflächenwasser zu isolieren. In einer Untersuchung von PUIG et al. (1994) zum Nachweis von Humanen Enteroviren in Abwasser wurden die Proben für einen Beobachtungszeitraum von fünf bis sechs Tagen in der Zellkultur inokuliert. Eine weitere Zellpassage erfolgte nicht. KOPECKA et al. (1993) verzichteten ebenfalls auf eine Passage. Die Isolierung von humanen Enteroviren wurde aus Klärschlamm und Oberflächenwasser durchgeführt. Für den kulturellen Nachweis von Rotaviren wird, aufgrund einer langsamen Replikationsrate (BARARDI et al., 1999), von langen Beobachtungszeiträumen berichtet. So wurden in einer Studie von WYATT et al. (1983) zum Erregernachweis aus Stuhlproben drei bis 14 Passagen durchgeführt. Die meisten Hepatitis A-Viren vom Wildtyp vermehren sich, wenn überhaupt, dann nur sehr langsam in der Zellkultur, wobei die Viren zellassoziiert sind und nur in sehr geringen Konzentrationen im Zellkulturüberstand zu finden sind (CHITAMBAR et al., 1994). Da sie nicht zytolytisch sind, werden sie immunologisch nachgewiesen (TICEHURST et al., 1987). Bevor jedoch der Nachweis in der Kultur erfolgen kann, ist nach FRIEDMAN-ALVERMANN et al. (1985) eine Inkubation von vier Wochen und nach Angaben von GRAFF et al. (1993) von mindestens acht Wochen notwendig. GRAFF et al. (1993) konnten nach einer Bebrütung von insgesamt zwei Monaten Hepatitis A-Virus in bereits geklärtem Abwasser nachweisen. Nach einer Inokulation von drei bis vier Wochen detektierten SHIEH et al. (1991) unter Verwendung von ssRNA-Sonden Hepatitis A-Virus in Brunnenwasser. Die Isolierung von Hantaviren gestaltet sich äußerst schwierig, da eine monatelange Adaptation des Virus an Gewebekulturzellen nötig ist (SCHMITZ, 1996). Die Virusvermehrung läuft meist ohne
erkennbaren cpe ab, dem zufolge erfolgt der Erregernachweis immunologisch mit dem IFT. KIM et al. (1994) und TANTIVANICH et al. (1992) inkubierten hierzu die Kulturen über einen Zeitraum von 45 bis 72 Tagen und GLIGIC et al. (1992) von 14 bis 42 Tagen, wobei die Zellpassage alle 14 Tage angesetzt wurde. Eine Studie von ROLLIN et al. (1995) hatte gezeigt, dass nach einer Inkubation von 60 Tagen erst 50 bis 60 % der Zellkultur im IFT Hantavirus-positiv ist, wohingegen AVSIC-ZUPANC et al. (1992) von 90 % nach ca. 56 Tagen berichten.

Für viele Viren ist das von ihnen bevorzugte Zellspektrum bekannt. Zur Isolierung von humanen Enteroviren aus Umweltmaterialien werden hauptsächlich BGM³ Zellen eingesetzt. Mit dieser Zelllinie gelang es CARDUCCI et al. (2000 und 1995), FANNIN et al. (1985) TELTSCH et al. (1980) und TELTSCH und KATZENELSON (1978), luftgetragene Enteroviren in Kläranlagen oder beim Verregnen von Abwasser nachzuweisen. SETTNISCH et al. (1982) verwendeten hingegen F1 Amnionzellen, in denen die Isolierung von Echo 11 und Coxsackievirus B3 möglich war. Zur Virusisolierung aus Flusswasser setzten JOHL et al. (1991) ebenfalls F1 Zellen ein. Die Isolate erwiesen sich als Coxsackie B, Echo- und Poliovirus. Eine Untersuchung von CARDUCCI et al. (2000) zeigte, dass neben humanen Enteroviren sich v.a. auch Reoviren in BGM vermehren. Von allen untersuchten Luftproben erwiesen sich 46 % als Reovirus-positiv, wohingegen nur in 9 % der Proben humane Enteroviren zu finden waren. Diese Studie macht deutlich, dass eine Trypsinierung der Isolate mit einer der bereits erwähnten Methoden unumgänglich ist. Da sich jedoch nicht alle humanen Enteroviren auf BGM vermehren, wird der Einsatz mehrerer Zelllinien zur Virusisolierung aus Probenmaterial empfohlen (HAMPARIAN et al., 1985; ABBASZADEGAN et al., 1993). Über die Schwierigkeiten der kulturellen Virusisolierung von Coxsackieviren vom Typ A wird an vielen Stellen berichtet. Demnach lassen sie sich in den herkömmlich verwendeten Zellsystemen gar nicht (POZO et al., 1998) bzw. nur sehr schlecht (NAIRN und CLE-MENTS, 1999) vermehren. Bereits 1978 verglichen SCHMIDT et al. (1978) mehrere Zelllinien zur Isolierung humaner Enteroviren. Die Studie hatte gezeigt, dass sich sowohl Coxsackieviren vom Typ A als auch Echovirus vom Typ 4 nicht auf BGM mit dem Plaquetest nachweisen lassen, vielmehr wird der Einsatz von RhMK⁴ Zellen (SCHMIDT et al., 1978) und RD⁵ Zellen (SHIEH et al., 1991; HAMPARIAN et al., 1985) zum kulturellen Nachweis von Coxsackie A empfohlen. Um möglichst viele Vertreter der Gruppe der humanen Enteroviren aus Probenmaterialien isolieren zu können, werden mehrere Zellsysteme verwendet. KOPECKA et al. (1993) setzten BGM und VERO⁶, POZO et al. (1998) A549⁷, BGM, RD und WI-38⁸, FANNIN et al. (1985) neben BGM auch WI-38 und CARDUCCI et al. (1995) BGM und Hep-2⁹ ein. Die Isolierung aus Klärschlamm führten HAMPARIAN et al. (1985) auf RD, HeLa¹⁰, BGM und CMK¹¹ durch. Dabei zeigte sich, dass in RD 60 %, in BGM 15 % und in HeLa, 26 % aller Isolate detektiert wurden. Die Isolierung von mehreren Echoviren und Coxsackie A war nur in RD Zellen möglich. In den meisten Studien werden MA104¹² Zellen zur kulturellen Isolierung von Rotaviren verwendet. WYATT et al. (1983) inokulierten

³ buffalo green monkey kidney cells

⁴ primary rhesus monkey kidney cells

⁵ human rhabdomyocarcinoma-derivated cells

⁶ african green monkey kidney cells

⁷ human lung carcinoma cells

⁸ human normal lung fibroblast cells

⁹ human laringeal carcinoma cells

¹⁰ human adenocarcinoma cervix cells

¹¹ human acute megacaryocytic leukemia

¹² rhesus monkey foetal kidney cells

verschiedene Isolate aus Stuhlproben zusätzlich in AGMK¹³. Die Virusdetektion erfolgte neben der Auswertung der cytopathischen Effekte im IFT. Dabei waren die meisten Serotypen sowohl in MA104 als auch in AGMK kultivierbar. Einige Isolate waren jedoch nur in einer der beiden Zellsysteme positiv. Des Weiteren zeigte die Untersuchung, dass sich viele Subtypen nicht in der Zellkultur bzw. ohne sichtbaren cpe vermehren. Der Nachweis von Rotaviren erfolgt demnach meist mit immunologischen Methoden (SMITH und GERBA, 1982; ROSE et al., 1986; LEWIS und METCALF, 1988; STRAPPE, 1991; GENTHE et al., 1991). Die kulturelle Isolierung von Rotaviren erfordert den Zusatz von Trypsin im Nährmedium. Dabei unterscheiden sich die zugesetzten Konzentrationen erheblich. GUTTMAN-BASS et al. (1987) setzten ihrem Medium 20 μ g/ml, PFIRRMANN (1994) 10 μ g/ml, LEWIS und METCALF (1988) 7 bis 10 μ g/ml, BARARDI et al. (1999) 5 μ g/ml, LEISINGER und METZLER (1997) 2 μ g/ml, WYATT et al. (1983) und STRAPPE (1991) hingegen nur 0,5 μ g/ml Trypsin hinzu. In den Untersuchungen von STRAPPE (1991) und WYATT et al. (1983) wird die Virussuspension vor der Inokulation in der Zellkultur mit 10 μ g/ml Trypsin für 1 h bei 37 °C aktiviert.

Für die Isolierung von Hepatitis A-Viren werden unterschiedliche Zelllinien eingesetzt. FRIEDMAN-ALVERMANN et al. (1985) verwendeten PLC/PRF/5¹⁴ Zellen zur Virusisolierung aus Kotproben, wobei der nachfolgende Erregernachweis im EM und EIA erfolgte. Den Einsatz von AGMK zur erfolgreichen Isolierung aus Brunnenwasser bzw. Oberflächenwasser beschreiben SHIEH et al. (1991) und LEWIS und METCALF (1988). Des Weiteren inokulierten GRAFF et al. (1993) ihre Abwasserproben in FRhK-4¹⁵ Zellen. Die Virusisolierung von Hantaviren erfolgt hauptsächlich aus Gewebeproben von Tieren, die als Reservoir der Erreger in Frage kommen. Hierzu wird die Zelllinie Vero-E6 bevorzugt eingesetzt. Auf diese Weise gelang beispielsweise die erfolgreiche Isolierung aus Ratten (TANTIVANICH et al., 1992), Fledermäusen (KIM et al., 1994) und Vögeln (SLONOVA et al., 1992), aber auch der Nachweis aus Patientenserum (ROLLIN et al., 1995). SONG et al. (1992) beschreiben GHKC¹⁶ als hochempfängliche Zelllinie, die sie zur Impfstoffproduktion einsetzten.

Anhand der Morphologie des **cytopathischen Effekts** lassen sich Viren unterschiedlichen Virusarten zuordnen. Dabei werden die charakteristischen Veränderungen im Monolayer beobachtet. Typische Bilder sind z.B. die Zytolyse mit degenerativen Veränderungen wie Abkugelung der Zellen und granulierende oder vakuolisierende Degeneration, die Bildung von Riesenzellen (Synzytienbildung), die durch Plasmazusammenfluss mehrerer infizierter Zellen und Verlust der Zellmembran entstehen und die Proliferation (Transformation der Zellen). Die Zuordnung ist jedoch nur aus gereinigten Isolaten möglich, da der cpe bei ungereinigten Wildstämmen nicht in gleichmäßigen, vergleichbaren Formen auftritt. PFIRRMANN (1994) konnte anhand der Morphologie des cpe ihre Isolate eindeutig den *Picornaviridae* (Abkugelung der Zellen nach ein bis zwei Tagen) und den humanen Herpesviren (herdförmige Lysiszonen nach zwei bis drei Tagen, im Randbereich nukleäre Einschlusskörperchen und teilweise Synzytienbildung) zuordnen. WYATT et al. (1983) beobachtete die Plaquebildung unter-schiedlicher Rotavirus Isolate. Von 55 Isolaten bildeten 11 (31 %) deutlich erkennbare Läsionen und 12 (34 %) nur kleine und schwach ausgeprägte Plaques. Bei den restlichen Subtypen blieb eine Plaquebildung völlig aus.

¹³ primary African green monkey kidney cell

¹⁴ human primary liver carcinoma cell

¹⁵ rhesus monkey foetal kidney-derivated cells

¹⁶ primary golden hamster kidney cell

Der Gehalt an infektiösem Virus in einer Suspension ermittelt man durch Titrieren. Hierzu werden logarithmische Verdünnungen einer Probe angelegt, mit gleichem Volumen auf mehrere Reagenten eines für das Virus möglichst empfänglichen Zellsystems verimpft und abschließend der Virusvermehrung in jedem Reagenten anhand verschiedener Kriterien, wie cpe oder Läsionen, ausgewertet. Bei der Endverdünnungsmethode werden die cytopathischen Effekte abgelesen und die Zahl der infizierten Kulturen mit jener der nicht infizierten verglichen. Der Virustiter wird nach der mathematischen Formel von SPAERMANN (1908) und KAERBER (1931) als 50 % kulturinfektiöse Dosis (KID₅₀) berechnet. Der Plaquetest macht die Virusverbreitung von der primär infizierten Zelle auf die benachbarten Zellen sichtbar. Zu diesem Zweck wird dem Zellkulturmedium etwas Agar zugefügt und damit der infizierte Monolayer überschichtet. Dadurch wird das Infektionsgeschehen um den primären Infektionspunkt lokalisiert (Läsionen, Plaques). Nach einer Anfärbung können die in der Probe vorhandenen Infektionseinheiten direkt ausgezählt werden. Der Virustiter wird als plaquebildende Einheiten (plaque forming units, PFU) ausgedrückt. Ein weiters Verfahren ist die Bestimmung der Viruskonzentration nach der "Most Probable Number" Methode (MPN). Die Registrierung der synchronen Zerstörung der Zellkultur nach der Endverdünnungsmethode in den einzelnen Verdünnungsansätzen ergibt einen Ergebniscode. Dieser Code wird zur Ermittlung der MPN Cytopathogenic Unit (MPNCU/Inokulum) genutzt (CHANG et al., 1985).

Die nachfolgende Tabelle Tab. 1 liefert einen Überblick über erfolgreiche Virusisolierungen aus den Umweltmaterialien Luft, Wasser und Klärschlamm, wobei die Zusammenstellung in Anbetracht der in dieser Arbeit zu detektierenden Viren erfolgte. Des Weiteren sind sowohl die im Probenmaterial detektierten Viruskonzentrationen als auch die hierzu verwendeten Methoden dargestellt.

Erreger	Proben- material	Methode	Typisierung der Isolate	Konzentration	Quelle
hum. Enteroviren	Luft (Kläranlage)	Plaquetest, BGM, Wistar-38	Neutralisationstest	4,7 x 10 ⁻³ bis 1,0 x 10 ⁻² PFU/ m ³	FANNIN et al. (1985)
hum. Enteroviren	Luft (Beregnung)	BGM	Neutralisationstest	$8,2 \ge 10^{-2}$ bis 1,4 x 10 ⁻¹ Isolate/ m ³	TELTSCH et al. (1980)
hum. Enteroviren, Reoviren	Luft (Kläranlage)	MPN, BGM	RT-PCR	1,07 x 10 ⁻⁴ bis 31,6 x 10 ⁻³ MPN/ 1 Luft	CARDUCCI et al. (2000)
hum. Enteroviren	Luft (Kläranlage)	F1	keine Angaben	nur qualitativ	SETTNISCH et al. (1982)
hum. Enteroviren	Luft (Kläranlage)	BGM, Hep-2	IFT	nur qualitativ	CARDUCCI et al. (1995)
hum. Enteroviren Herpes-simplex- Viren	Luft (Müll- verwertung)	Endverdünnungsmethode, CRFK, BGM, HeLa, VERO	Neutralisationstest, Plaquetest, IFT, ELISA, EM	$> 1 \ge 10^{0} \text{ bis} > 4 \ge 10^{4} \text{ KID}_{50} / \text{ m}^{3}$ Luft	PFIRRMANN (1994)
hum. Enteroviren	Luft (Beregnung)	BGM	Neutralisationstest	nur qualitativ	TELTSCH und KATZENELSON (1978)
Aujeszky-Virus	Luft	SK	IFT	nur qualitativ	MACK et al. (1986)
Aujeszky-Virus	Luft (Stall)	Plaquetest, PK	nicht durchgeführt	10^{0} bis $10^{4,3}$ PFU/ m ³	BOURGUEIL et al. (1992 b)
MKS-Virus	Luft (Stall)	Endverdünnungsmethode calf thyroid	nicht durchgeführt	1,4 bis 6,5 KID ₅₀	DONALDSON et al. (1970)
Porcines- respiratorisches- Coronavirus	Luft (Stall)	Plaquetest, <i>swine testis cells</i> (ST)	nicht durchgeführt	$10^{0.5}$ bis $10^{1.87}$ PFU/ m ³	BOURGUEIL et al. (1992 a)
Polyoma-Virus	Luft (Stall)	Endverdünnungsmethode, <i>mouse embryo fibroblasts</i> (3T-6)	Tierversuch, Antikörper- produktion	0,045 KID ₅₀ / l Luft	McGARRITY und DION (1978)
Swine-vesicular- disease-virus	Luft (Stall)	Endverdünnungsmethode, IB-RS-2	nicht durchgeführt	10 ^{1,25} bis 10 ^{1,4} KID ₅₀ / Probe	SELLERS und HERNIMAN (1974)
Adenovirus	Luft (Zimmer)	Endverdünnungsmethode, keine Angaben	keine Angaben	1 KID ₅₀ / ml	ARTENSTEIN und MILLER (1966)

Tab. 1: Virusisolierung aus Luft, Wasser und Klärschlamm

Erreger	Proben- material	Methode	Typisierung der Isolate	Konzentration	Quelle
hum. Enteroviren	Luft (Beregnung) Abwasser	Plaquetest, HeLa, BGM	Neutralisationstest	< 7,5 x 10 ⁻⁴ bis 1,7 x 10 ⁻² PFU/ m ³ 23 bis 350 PFU/ l	MOORE et al. (1979)
hum. Enteroviren	Abwasser	MPN, BGM	(RT-PCR)	1,5 bis 22,5 MPNCU/ 1	GANTZER et al. (1998)
hum. Enteroviren	Abwasser	RD	Neutralisationstest	nur qualitativ	SHIEH et al. (1997)
hum. Enteroviren	Abwasser	MPN, BGM	RT-PCR	4,0 x 10 ⁻² bis 3,3 x 10 ³ MPNCU/ 1	REYNOLDS et al. (1998)
hum. Enteroviren Rotaviren	Abwasser	BGM MA104	Neutralisationstest IFT	nur qualitativ	ROSE et al. (1986)
hum. Enteroviren Reovirus	Abwasser Flusswasser Sediment	PLC/PRF/5, BGM, PVK, L20B	Neutralisationstest RT-PCR	nur qualitativ	GRABOW et al. (1999)
hum. Enteroviren	Abwasser	Plaquetest, BGM	Neutralisationstest	6,0 x 10 ⁰ bis 8,2 x 10 ⁴ PFU/ 1	TELTSCH et al. (1980)
hum. Enteroviren, Reoviren	Abwasser	BGM	RT-PCR	nur qualitativ	CARDUCCI et al. (2000)
hum. Enteroviren	Abwasser	BGM, Hep-2	IFT	nur qualitativ	CARDUCCI et al. (1995)
hum. Enteroviren	Abwasser	Plaquetest, BGM	nicht durchgeführt	< 5,0 x 10 ¹ bis 8,3 x 10 ⁴ PFU/ 1	GUTTMAN-BASS et al. (1987)
hum. Enteroviren Rotaviren	Abwasser	Plaquetest, BGM MA104	nicht durchgeführt IFT, Neutralisationstest	10 bis 2962 PFU/ 20 1 150 bis 7488 positive Zellen/ 20 1	SMITH und GERBA (1982)
hum. Enteroviren	Abwasser Flusswasser	Plaquetest, BGM	(RT-PCR)	14 PFU/ 20 ml 2 PFU/ 20 l	PINA et al. (1998)
hum. Enteroviren	Abwasser Flusswasser	Plaquetest, BGM	(RT-PCR)	2 bis 12 PFU/ 20 ml 2 PFU/ 2 l	PUIG et al. (1994)
enterale Viren	Flusswasser	MPN, MA104, BGM, FL	nicht durchgeführt	1,05 bis 4,30 MPNCU/ 1	DUMKE und FEUERPFEIL (1997)
hum. Enteroviren	Flusswasser	MPN, F1	Neutralisationstest	0,3 bis >52,3 MPNCU/1	JOHL et al. (1991)
enterale Viren	Rohwasser (Karstquelle)	MPN, MA104, BGM/RD	nicht durchgeführt	1,1 bis 4,8 MPNCU/ 101	TOUGIANIDOU und BOTZENHART (1993)

Fortsetzung Tab. 1:	Virusisolierung aus Luft	, Wasser und Klärschlamm
---------------------	--------------------------	--------------------------

Erreger	Proben- material	Methode	Typisierung der Isolate	Konzentration	Quelle
hum. Enteroviren	Grundwasser	BGM	(RT-PCR)	nur qualitativ	ABBASZADEGAN et al. (1999)
hum. Enteroviren Hepatitis A-Virus	verschiedene Wässer	RD AGMK	ssRNA-Sonden	nur qualitativ	SHIEH et al. (1991)
hum. Enteroviren	Oberflächenwasser	Plaquetest, BGM	nicht durchgeführt	0,1 bis 1,4 x 10 ⁴ PFU/ 101	VAN OLPHEN et al. (1991)
Rotavirus Hepatitis A-Virus	Oberflächenwasser	MA104 AGMK	IFT Hybridisierung	nur qualitativ	LEWIS und METCALF (1988)
hum. Enteroviren	Oberflächenwasser Klärschlamm	BGM, VERO	RT-PCR	nur qualitativ	KOPECKA et al. (1993)
hum. Enteroviren, Reoviren	Klärschlamm	BGM	RT-PCR	nur qualitativ	CARDUCCI et al. (2000)
hum. Enteroviren	Klärschlamm	MPN, BGM	nicht durchgeführt	10 bis 2242 MPNCU/ g	MIGNOTTE et al. (1999)
hum. Enteroviren	Klärschlamm	RD, BGM, HeLa	Neutralisationstest	nur qualitativ	HAMPARIAN et al. (1985)
Hepatitis A-Virus	Klärschlamm	FRhK-4	IFT	nur qualitativ	GRAFF et al. (1991)
hum. Enteroviren	Klärschlamm	MPN, BGM	(RT-PCR)	0,7 bis 67,9 MPN/ ml	STRAUB et al. (1994a)

Fortsetzung Ta	ab. 1:	Virusiso	lierung aus	Luft,	Wasser un	d Klärschlamm
----------------	--------	----------	-------------	-------	-----------	---------------

2.4.6 Molekularbiologische Methoden

Seit einiger Zeit werden auch molekularbiologische Verfahren angewandt, um Viren in Umweltproben nachzuweisen. Diese Verfahren umfassen vor allem den Einsatz von DNAund RNA-Genproben und die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Tabelle Tab. 2 zeigt eine Übersicht des molekularbiologischen Virusnachweises aus Klärschlamm und Wasser. Alle Studien beschäftigten sich dabei mit dem rein qualitativen Erregernachweis.

2.4.6.1 Hybridisierung

Bei der molekularen Hybridisierung (im Dot-Blot-Verfahren) macht man sich die Eigenschaft der DNA oder RNA zunutze, sich komplementär an Nukleinsäuren der gleichen Abfolge der Nukleotide anzulagern. Für den Nachweis werden Gensonden produziert und radioaktiv oder mit Digoxigenin markiert. Die aus dem Probenmaterial extrahierte Nukleinsäure wird anschließend an eine Nylonmembran gebunden, indem das Material filtriert wird. Die markierte Gensonde wird im Anschluss daran aufgetragen. Wenn die Genabschnitte aus der Umweltprobe und die der Gensonde zueinander passen, werden Doppelstrangsegmente gebildet, die auf der Membran verbleiben, während das nicht gebundene Material entfernt werden kann. Abschließend wird die Membran auf fixierte Doppelstrangsegmente hin untersucht. Die Problematik dieses Tests beruht darin, dass er nicht so sensitiv sein kann wie die Anzucht in der Zellkultur. Die molekulare Hybridisierung benötigt auch unter optimalen Bedingungen Konzentrationen von einigen 100 bis 1000 Viruspartikeln (WALTER, 2000). KOPECKA et al. (1993) verglichen in einer Studie die Sensitivität des Nachweises von humanen Enteroviren mit der Zellkultur, der Hybridisierung und der RT-PCR. Dabei zeigte sich, dass die Hybridisierung um fünf Zehnerpotenzen weniger sensitiv war als die Zellkultur, die sich wiederum um den Faktor 10 bis 1000 weniger empfindlich als die RT-PCR erwies. Eine weitere vergleichende Untersuchung wurde von TICEHURST et al. (1987) zur Detektion von Hepatitis A-Virus durchgeführt. Die Hybridisierung erwies sich als 10-mal empfindlicher als der Nachweis mittels der EM und des RIA. Mit einer Nachweisgrenze von 10^3 KID₅₀ war sie ebenfalls nicht sensitiver als die Zellkultur. LUCOTTE et al. (1994) zeigten, dass die nested-PCR zur Detektion von Hepatitis B-Virus um vier Zehnerpotenzen sensitiver ist als die Hybridisierung. ABBASZADEGAN et al. (1993) untersuchten konzentrierte Grundwasserproben neben der PCR auch mit der Hybridisierung auf das Vorhandensein von Hepatitis A-Virus. Dabei waren von 10 getesteten Proben zwei in der PCR positiv, mit der Hybridisierung hingegen nur eine Probe. BOSCH et al. (1991) konnten in drei von sechs untersuchten Abwasserproben Hepatitis A-Virus mittels der Hybridisierung nachweisen. Um die mangelnde Sensitivität der Hybridisierung, vor allem beim Virusnachweis aus Umweltmaterialien von Bedeutung, zu kompensieren, kann vor der Detektion der Erreger eine Virusvermehrung in der Zellkultur vorgeschaltet werden (SHIEH et al., 1991).

2.4.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der inzwischen viel verwendeten **Polymerase-Ketten-Reaktion** (PCR) wird die natürlicherweise in der Zelle stattfindende Multiplikation der Erbsubstanz in vitro nachgeahmt. Mit Hilfe eines Enzyms (Polymerase), Oligonukleotiden (Primern) als spezifische Reaktionsstarter und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine kann in aufeinander folgenden Reaktionszyklen die Nukleinsäure des gesuchten Virus so lange exponentiell vermehrt werden, bis die Menge zum Nachweis ausreicht. Während für ein positives Genproben-Signal 100 bis 1000 Viren vorliegen müssen, genügt für den Nachweis über die PCR theoretisch ein einzelnes Virusgenom. Zur Detektion von RNA-Viren muss die RNA vor der eigentlichen PCR in einem ersten Reaktionsschritt, der **reversen Transkription** (RT) in die so genannte "*copy*"-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies wird ebenfalls unter Verwendung eines Enzyms (Reverse Transkriptase), eines Primers und dNTPs durchgeführt. Im Gegensatz zur PCR findet in dieser Reaktion keine Vermehrung von Nukleinsäuren statt. Die PCR bzw. RT-PCR ist eine sehr sensible Technik, die von vielen Faktoren wie Zusammensetzung und Konzentration der Reaktionskomponenten, Reinheit und Menge der eingesetzten Ziel-DNA bzw. RNA, Temperaturprofil für die Amplifikation, Konzentration und Sequenz der verwendeten Primer und den verwendeten Enzymen beeinflusst wird. Alle diese Komponenten müssen jeweils optimal an die RT-PCR angepasst und anschließend konstant gehalten werden, um ein reibungsloses Ablaufen des Nachweises zu ermöglichen.

2.4.6.2.1 Nukleinsäureisolierung

Bevor der eigentliche Erregernachweis erfolgen kann, müssen die Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial isoliert werden. Dabei kommt es nicht nur zu einem Aufschluss der Zellen bzw. der Viruspartikel, sondern auch zu einer Konzentrierung und Reinigung der Nukleinsäuren. Besondere Bedeutung kommt dabei der Abtrennung von Inhibitoren zu, die die Effektivität der PCR-Reaktion herabsetzen (s. 2.4.6.2.2). Für die Extraktion von Virus-RNA wird die Guanidin-Thiocyanat-(GITC) Methode am häufigsten angewendet. Dabei erfolgt zuerst der Aufschluss mit GITC, danach wird die Probe meist mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt und anschließend die Nukleinsäuren mit Alkohol gefällt. GITC hemmt nicht nur im Probenmaterial vorhandene Nukleasen (LEISINGER und METZLER, 1997), sondern entfernt auch andere Inhibitoren (SHIEH et al., 1997). KÄMMERER et al. (1994) isolierten mit dieser Methode die Nukleinsäuren von verschiedenen Picornaviren aus Serum, Zellkulturüberstand, Stuhl und Rückenmarksflüssigkeit. Die erfolgreiche Extraktion von humanen Enteroviren aus Abwasser beschreiben GANTZER et al. (1997 und 1998) und den Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Schalentieren ARNAL et al. (1999). Den Aufschluss mit GITC und die Adsorption der Nukleinsäuren an Siliziumdioxid beschreiben PINA et al. (1998). Ihnen gelang es, Hepatitis A-Virus, humane Entero- und Adenoviren in Abwasser nachzuweisen. Neben GITC wird auch Proteinase K zum Aufschluss der Viruspartikel eingesetzt, so beispielsweise von ABBASZADEGAN et al. (1993) zum Nachweis von humanen Enteroviren aus Grundwasser, LeGUYADER et al. (1994) zur Detektion von humanen Enteroviren, Rota- und Hepatitis A-Virus aus Sediment und Schalentieren und von KOPECKA et al. (1993) zur Isolierung von humanen Enteroviren aus Klärschlamm und Oberflächenwasser. Aber auch zum Aufschluss von Hepatitis B-Viren in Serum (HEER-MANN et al., 1999; MAT-SUMOTO et al., 1997) und Hepatitis E-Virus in Abwasser (JOTHIKUMAR et al., 1993) wird Proteinase K eingesetzt. BEAULIEUX et al. (1997) empfehlen den Einsatz von Magnetpartikeln, die mit spezifischen Antikörpern markiert sind, zur Isolierung von Enterovirus-RNA. Die Methode lieferte die gleiche Sensitivität wie die GITC-Phenol-Chloroform Methode, wobei jedoch die Arbeitszeit um 50 % sinkt und auf toxische Substanzen verzichtet wird. Eine andere Variante der Partikelisolierung ist die "antigen-capture" PCR (AC-PCR). Dabei werden Reaktionsgefäße mit monoklonalen Antikörpern beschichtet. Anschließend wird die Probe hinzugegeben, durch Waschschritte Inhibitoren entfernt und die Partikel meist durch Erhitzen aufgeschlossen. Mit dieser Methode wurde Hepatitis A-Virus erfolgreich aus Klärschlamm (GRAFF et al., 1993), Abwasser (DIVIZIA et al., 1998), Kot (ROBERTSON, 1995) und verschiedenen anderen Umweltmaterialien (DENG et al., 1994) isoliert. PUIG et al. (1994) führten eine Studie zum molekularbiologischen Nachweis von humanen Entero- und Adenoviren aus Abwasser durch. Dabei überprüften sie drei verschiedene Extraktionsmethoden anhand von mit Virus versetzten Abwasserproben. Der Aufschluss erfolgte dabei mit GITC. Die Proben wurden anschließend entweder mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt oder die Adsorption der Nukleinsäuren an Glaspuder oder Siliziumpartikel durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Adsorption von DNA und RNA an Siliziumpartikel mit einer Wiederfindung von bis zu 118,9 % die effektivste Methode war. Bei geringen Erregermengen waren die Unterschiede besonders deutlich. HÄFLINGER et al. (1997) setzten kommerziell erhältliche Extraktionskits zur Isolierung von viraler RNA aus Kotproben ein, SELLWOOD et al. (1998) zur Extraktion von humanen Enteroviren aus Wasser (Leitungswasser, Abwasser, Flusswasser, Meer) und ARNAL et al. (1998) zur Isolierung von Hepatitis A-Virus aus künstlichem Meerwasser. KRAMVIS et al. (1996) verglichen zwei Extraktionskits (QIAamp, Gene-Releaser) mit der GITC-Phenol-Chloroform Methode zum Nachweis von Hepatitis B-Virus aus Serumproben. Die Extraktionskits zeichneten sich durch schnelle Durchführung und einfache Handhabung aus, wodurch das Risiko einer Kontamination herabgesetzt war. Die Verwendung des GeneReleaser führte in einigen Fällen zu falsch negativen Ergebnissen, das möglicherweise durch unzureichende Entfernungen von Inhibitoren oder durch die geringe Probenmenge von 5 µl bedingt war. Des Weiteren war die Effektivität der Extraktion vom eingesetzten Ausgangstiter abhängig, wobei die extrahierte Probenmenge keinen Einfluss auf die Sensitivität hatte. Bei hohem Virustiter war die GITC-Phenol-Chloroform Methode am effektivsten, wohingegen sich die drei Methoden bei geringer Viruskonzentration entsprachen. Es wird daher empfohlen, bei der Wahl der Extraktionsmethode die Vor- und Nachteile einer jeden Methode gegeneinander abzuwägen und auf die eigene Fragestellung abzustimmen.

2.4.6.2.2 Faktoren, die die RT-PCR beeinflussen

Das für die Amplifikation notwendige Temperaturprofil der PCR gliedert sich in drei verschiedene Reaktionsschritte, die zu einem Zyklus verbunden sind, der 20- bis 40-mal wiederholt wird. Der erste Schritt beinhaltet die Denaturierung der DNA. Die doppelsträngigen Moleküle werden durch Hitze in Einzelstränge getrennt. Hierfür werden Temperaturen von 92 bis 95 °C benötigt. In der Regel wird eine Temperatur von 94 °C gewählt, die bei Cytosin- und Guanin-reichen Templates erhöht werden muss. Zu beachten ist dabei jedoch, dass die Lebensdauer der Tag-DNA-Polymerase bei Temperaturen über 95 °C herabgesetzt wird (WILLIAMS, 1989). An die Denaturierung schließt sich die Hybridisierung oder Bindung (Annealing) der Primer an. Dabei lagern sich synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) bei entsprechender Hybridisierungstemperatur an die komplementären Sequenzbereiche der Einzelstränge an. Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Hybridisierung der Primer und kann in Abhängigkeit der Basenzusammensetzung und Länge der Primer nach verschiedenen Formeln¹⁷ berechnet werden. Ist die Hybridisierungstemperatur zu niedrig gewählt, lagern sich die Primer an falsche Stellen des DNA-Einzelstranges (Mispriming) an oder es werden Sequenzen amplifiziert, die nicht der Ziel-DNA entsprechen. Ist die Temperatur hingegen zu hoch, findet keine Amplifikation statt (BEJ et al., 1991). In einer Studie von DeLEON et al. (1990) zum Nachweis von enteritischen Viren aus Abwasser trat beim Nachweis von humanen Enteroviren bei einer Annealingtemperatur von 45 °C eine unspezifische Bande auf, wohingegen bei einer Temperatur von 49 °C keine weitere Bande beobachtet wurde. Ähnlich verhielt es sich bei der Detektion von Rotaviren. Auch hier war bei einer Hybridisierungstemperatur von 49 °C eine zusätzliche Bande sichtbar, die bei 55 °C ausblieb. Im Anschluss an die Hybridisierung werden die Einzelstränge durch die DNA-Polymerase durch Einbau freier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) aus der Lösung in Verlängerung des Primers am Matrizenstrang zu Doppelsträngen vervollständigt (Elongation). Das Temperaturoptimum für die häufig verwendete Taq-DNA-Polymerase liegt bei 72 °C. Nach Abschluss des letzten Zyklus erfolgt die vollständige Renaturierung der DNA bei 72 °C für 3 bis 7 min. Danach werden die Reaktionsansätze bis zur Auswertung auf 4 bis 8 °C abgekühlt. Die Dauer der einzelnen Reaktionen ist vor allem vom eingesetzten Thermocycler ("Block-control" oder "Tube-control") abhängig. Des weiteren wird sie beim Annealing von der Primerlänge, der Basenzusammensetztung und der

¹⁷ http://www. williamstone.com/primers/calculator/calculator.cgi

eingesetzten Konzentration beeinflusst, wohingegen die Dauer der Elongation vor allem mit der Produktlänge zusammenhängt (ANONYM f), 1999).

Das Temperaturprofil der RT-Reaktion besteht in der Regel aus drei Reaktionsschritten. In einer ersten Reaktion wird die RNA denaturiert (65 °C, 10 min.). Dies ist besonders bei dsRNA-Viren (z.B. Rotaviren) von Bedeutung, da die Bindung zwischen RNA-RNA im Vergleich zu DNA-DNA und DNA-RNA stärker ausgebildet ist. GOUVEA et al. (1990) führten hierzu eine Erhitzung von 5 min. bei 97 °C und HÄFLINGER et al. (1997) und GILGEN et al. (1997) bei 94 °C für 4 min. durch. An die Denaturierung schließt sich die cDNA-Synthese an. Für diesen Reaktionsschritt stehen verschiedene Enzyme (Reverse-Transkriptasen) mit unter-schiedlichen Temperaturoptima zur Verfügung. Für die Expand-Reverse-Transkriptase und für die AMV¹⁸ Reverse-Transkriptase liegt das Optimum beispielsweise bei 42°C, für die MMLV¹⁹ bei 37 °C und für die C.-therm-Polymerase zwischen 60 und 70 °C. Eine Auswertung der Literatur zeigt, dass die beiden Transkriptasen AMV und MMLV am häufigsten zum Nachweis von RNA-Viren eingesetzt werden. Entsprechend der Taq-DNA-Polymerase benötigt die Transkriptase neben dNTPs einen Primer an dem die Synthese des komplementären DNA-Stranges beginnen kann. Eine zusätzlich gewählte Annealingtemperatur entfällt bei der RT-Reaktion. Demnach ist das gewählte Enzym mit einem definierten Temperaturoptimum entscheidend für eine spezifische Hybridisierung des eingesetzten Primers. Nach einer Synthesedauer von 60 min. kann die cDNA in die PCR eingesetzt werden.

Die Wahl der für die PCR verwendeten Primer ist sowohl für die Sensitivität als auch die Spezifität der Reaktion von Bedeutung. Primer sind chemisch synthetisierte einzelsträngige Oligonukleotide, die normalerweise 15 bis 30 Basen lang und komplementär zu den 3`-Enden der Ziel-DNA sind. Da die DNA-Polymerase das 3'-Ende als Startpunkt für das Aufpolymerisieren des Einzelstranges zum Doppelstrang benötigt, ist es wichtig, dass die letzten fünf bis sechs Basen des 3'-Endes exakt dem der Ziel-DNA entsprechen. Bei der Auswahl der Primer ist darauf zu achten, dass sie keine Sekundärstrukturen ("Stem" und "Loop"-Strukturen) aufweisen, beide Primer die gleiche Schmelztemperatur bzw. Annealingtemperatur (optimalerweise zwischen 60 und 65 °C) besitzen und vor allem an ihren 3'-Enden nicht komplementär zueinander sind. Andernfalls können in der PCR künstliche Produkte entstehen (Primerdimere), wodurch die Effektivität der PCR abnimmt (BEJ et al., 1991). Eine Möglichkeit zur Reduktion von Primer-Artefakten, die bereits vor der eigentlichen PCR entstehen können, ist die "Hot-Start" PCR. Durch diese Methode wird vermieden, dass unspezifische Primer/Template oder Primer/Primer-Komplexe, die bei niedrigen Temperaturen während der ersten Aufheizphase von der Raumtemperatur zum Denaturierungsschritt entstanden sind, von der DNA-Polymerase verlängert werden. Dabei wird eine für die PCR essentielle Komponente, meist Mg²⁺ oder Polymerase, erst durch eine zusätzliche Erhitzung für die Reaktion freigegeben (ANONYM f), 1999). Die Primer werden in die PCR in einer Konzentration von 0,1 bis 1 µM eingesetzt (WILLIAMS, 1989). Die optimale Konzentration wird in Vorversuchen ermittelt, wodurch sich auch weit aus geringere Konzentrationen ergeben können (PUIG et al., 1994).

Die RT-Reaktion kann durch dreierlei verschiedenartige Primer initiiert werden. Der Oligo $(dT)_{12-18}$ Primer bindet am 3`-Ende der RNA innerhalb der poly $(A)^+$ Region bei Viren, die über eine solche Region verfügen, und wird hauptsächlich zur Synthese von "*full-length*"- cDNA verwendet. Den Einsatz eines Oligo $(dT)_{15}$ zur RT-Reaktion humaner Enterovirus-

¹⁸ avian myoplastosis virus

¹⁹ moloney murine leucaemia virus

RNA beschreiben GANTZER et al. (1997 und 1998) und KOPECKA et al. (1993). Weit häufiger ist der Einsatz eines Random Hexanukleotid Primers, der an jeder möglichen komplementären Stelle auf der RNA bindet. Er ist vorteilhaft bei Schwierigkeiten, die durch Sekundärstrukturen der RNA verursacht werden. In der Literatur werden Random Primer zum Nachweis von humanen Enteroviren aus Gewebeproben (ROMERO et al., 1995), Grundwasser (ABBASZADEGAN et al., 1993) und Abwasser (SHIEH et al., 1997) und zur Detektion von Hantaviren aus Gewebeproben (KIM et al., 1994) beschrieben. Die Detektion von Polio-, Rota- und Hepatitis A-Virus in Grundwasser beschreiben ABBASZADEGAN et al. (1999). Des Weiteren werden Random Primer zur Etablierung von "Multiplex"-RT-PCRs eingesetzt (TSAI et al., 1994; DeLEON et al., 1990). Die dritte Variante ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das komplementär zu einem Bereich aus der zu charakterisierenden RNA ist und daher spezifisch bindet. Hierzu wird meist der antisense Primer der PCR eingesetzt. Aufgrund der Spezifität werden Primer dieser Art am häufigsten zum Virusnachweis aus Umweltmaterialien verwendet. Zur cDNA-Synthese von Rotavirus dsRNA werden häufig sense und antisense Primer eingesetzt (WILDE et al., 1990; DeLEON et al., 1990). Die Primerkonzentration ist in den verschiedenen Publikationen sehr unterschiedlich gehalten und vom verwendeten Primertyp abhängig.

Neben der Ziel-DNA, den Primern und der DNA-Polymerase (1 bis 2,5 Einheiten) enthält ein Reaktionsansatz für die PCR (25 bis 100 µl) weitere Reaktionskomponenten. Der Standardreaktionspuffer besteht im Allgemeinen aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,3-9,0), 50 mM KCl, 0,001 oder 0,01 % (w/vol) Gelatine und 1,5 mM MgCl₂. Des Weiteren können Zusätze wie 0,1 % Triton-X-100 und/oder 2 µg/ml BSA enthalten sein (HÄFLINGER et al., 1997; PUIG et al., 1994; GILGEN et al., 1997). Die im Reaktionsansatz enthaltene Menge an Mg²⁺ ist für die Effektivität der PCR von großer Bedeutung und beträgt in der Regel 1,5 bis 4 mM. Mg²⁺ dient als Co-Faktor für die Polymerase und hat damit Einfluss auf die Enzymaktivität, beeinflusst das Anlagern der Primer und ist an der Bildung von Primerdimeren beteiligt (ANONYM f), 1999). Die optimale Mg²⁺-Konzentration muss demnach für jede PCR-Reaktion durch Versuche ermittelt werden. Desoxynukleotidtriphosphate bestehen aus gleichen Teilen von Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxycytidintriphosphat (dCTP) werden meist in einer Konzentration von 200 µM eingesetzt. Zu hohe Konzentrationen führen zu Mispriming und Schreibfehlern der Polymerase (ANONYM f), 1999). Neben diesen Grundkomponenten werden Zusätze verwendet, die die Denaturierung bei hohem Guanin-Cytosin-Gehalt der Ziel-DNA erleichtern. So war die Amplifizierung von Aujeszky-Virus nur in Anwesenheit von 20 % Glyzerol und einer ersten Denaturierung bei 96 °C möglich (BANKS, 1993).

Der Reaktionspuffer für die RT-Reaktion besteht im Allgemeinen aus 25 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ (Enzym-abhängig) und 2,5 % Tween 20. Der eingestellt pH-Wert ist vom eingesetzten Enzym abhängig. AMV und die Expand-Reverse-Trranskriptase arbeiten bei einem pH von 8,3, wohingegen MMLV bei einem Wert von 7,6 optimal arbeitet. Des Weiteren wird dem Reaktionsansatz DTT (10 mM) und RNase Inhibitor, der RNasen durch nicht-kovalente Bindung inaktiviert, zugesetzt. Entsprechend der Taq-DNA-Polymerase ist auch die Effektivität der Reversen-Transkriptase von der Mg²⁺-Konzentration abhängig. GOUVEA et al. (1990) setzten hierzu Optimierungsversuche im Bereich zwischen 0 und 6 mM an. Um die Denaturierung der dsRNA von Rotaviren zu verbessern erfolgt die Zugabe von DMSO. GOUVEA et al. (1990) setzten 7 %, GILGEN et al. (1997) und HÄFLINGER et al. (1997) 5 % DMSO hinzu. Desoxynukleotidtriphosphate werden meist in einer Konzentrationen zwischen 0,2 und 1 mM pipettiert.

Die Inhibition der RT-PCR-Reaktion durch unterschiedlichste Substanzen stellt eines der Hauptprobleme beim Erregernachweis aus biologischen Proben wie klinischem Material, Nahrungsmitteln und Umweltmaterialien dar. Durch die Anwesenheit von Hemmstoffen in der Probe sinkt die Empfindlichkeit des Testsystems oder macht einen Erregernachweis sogar unmöglich, wodurch es dann zu falsch negativen Befunden kommt. Die inhibitorische Wirkung der Stoffe kommt durch folgende Mechanismen zustande: Störung beim Aufschluss der Mikroorganismen, Inaktivierung oder Hemmung der Polymerase und Abbau der Nukleinsäuren (ABU AL-SOUD und RADSTRÖM, 1998; WILSON, 1997). Das Ausmaß einer Reaktionshemmung wird durch viele Faktoren beeinflusst, zum einen durch die Zusammensetzung des Probenmaterials selbst, zum anderen durch die Wahl der Probenaufarbeitung und durch die Nukleinsäureextraktion. WILSON (1997) liefert einen umfassenden Überblick über das Vorkommen von Hemmstoffen in unterschiedlichen Probenmaterialien und die Möglichkeiten der Abtrennung. ABBASZADEGAN et al. (1993) berichten von Huminsäuren, die den PCR-Nachweis von humanen Enteroviren aus Grundwasser stören. Die hemmende Wirkung erfolgt dabei durch Komplexierung der für die Polymerase essentiellen Magnesiumionen (TOUGIANIDOU und BOTZENHART, 1993). LeGUYADER et al. (1994) beschreiben die Wirkung von Salz beim Resuspendieren der RNA in Phosphatpuffer. Es wird Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser zum Lösen der Nukleinsäure empfohlen. SCHWAB et al. (1993) und SHIEH et al. (1997) schildern die inhibitorische Wirkung von Beef-Extrakt, wohingegen GANTZER et al. (1997) keine Hemmung beobachten konnten. Des Weiteren werden Proteinasen in Milch (POWELL et al., 1994), Harnstoff in Urin (KHAN et al., 1991) und Hämoglobin im Blut (AKANE et al., 1994) als Inhibitoren erwähnt. Untersuchungen von WILDE et al. (1990) zum Nachweis von Rotaviren aus Kotproben und ABBASZADEGAN et al. (1993) zur Detektion von humanen Enteroviren aus Grundwasser hatten gezeigt, dass sich bei der RT-PCR-Reaktion vor allem das Enzym für die RT-Reaktion empfindlich gegenüber Inhibitoren verhält. In einer Studie von ABBASZADEGAN et al. (1999) hatte sich gezeigt, dass 11,3 % der Grundwasserproben beim Nachweis von humanen Enteroviren, 7,3 % bei der Untersuchung auf Hepatitis A-Virus und 13,3 % aller auf Rotavirus getesteten Wasserproben inhibiert waren. Aus der Tatsache, dass nicht dieselbe Probe auf alle drei Systeme hemmend wirkte, folgerten die Untersucher, dass die Inhibition nicht nur das Enzym betrifft, sondern auch die Anlagerung der Primer beeinträchtigt. Beim Vergleich von neun verschiedenen DNA-Polymerasen stellten ABU AL-SOUD und RADSTRÖM (1998) fest, dass die in biologischem Material enthaltenen Hemmstoffe unterschiedlich auf die getesteten Enzyme wirkten. Demnach ist die Wahl des eingesetzten Enzyms von großer Bedeutung für die Sensitivität des Testsystems.

Eine Verminderung der Hemmstoffe kann durch Verdünnung der Probe erreicht werden (PINA et al., 1998), wobei jedoch auch die Ziel-DNA bzw. RNA ausverdünnt wird (WILDE et al., 1990), oder durch aufwendige Reinigung der Nukleinsäuren (WILDE et al., 1990). Sind die Substanzen an die Viruspartikel bzw. die DNA/RNA gebunden, werden sie bereits bei der Probenaufarbeitung mit konzentriert (GANTZER et al., 1998; KOPECKA et al., 1993; TOUGIANIDOU und BOTZENHART, 1993) und in weiteren Reinigungsschritten nicht entfernt. ALEXANDER und MORRIS (1991) konzentrierten unterschiedliche Mengen an mit Virus versetztem Flusswasser (ein, zwei, fünf und 10 l) auf. Die im Anschluss durchgeführte PCR ergab für die Konzentrate ein, zwei und 5 l abnehmende Sensitivitäten, wobei das Konzentrat der 10 l Probe die PCR vollständig inhibierte. Die Abtrennung von Inhibitoren aus Grundwasser (ABBASZADEGAN et al., 1993), Abwasser (DeLEON et al., 1990), Sediment (LeGUYADER et al., 1994), Klärschlamm und Bodenproben (STRAUB et al., 1994a und 1994b) mit Hilfe der Sephadex-Chromatographie wird von vielen Autoren empfohlen. Es zeigte sich jedoch in einer Studie von REYNOLDS et al. (1998), dass die Inhibitoren aus Abwasser hierdurch nicht vollständig entfernt werden konnten. Die Sensitivität der PCR war

um eine Zehnerpotenz herabgesetzt. LEISINGER und METZLER (1997) beobachteten beim PCR-Nachweis von humanen Enteroviren, Hepatitis A-Virus und Rotaviren aus gezielt kontaminierten Abwasserproben keine Hemmung der verwendeten Enzyme. Die Probenaufarbeitung war dabei durch Adsorption der Viruspartikel an Siliziumdioxid erfolgt. Die Inhibitoren wurden in der anschließenden Nukleinsäureextraktion durch Ethanol und Azeton aus der Probe gewaschen und die vorhandenen Nukleasen durch GITC gehemmt. PINA et al. (1998) berichten ebenfalls von der erfolgreichen Eliminierung von PCR-Inhibitoren aus Abwasser. Bei der Abtrennung von Hemmstoffen muss jedoch bedacht werden, dass zu viele Extraktionsschritte zu Verlusten von genetischem Material führen können und die Wahrscheinlichkeit der RNA-Schädigung steigt (LeGUYADER et al., 1994).

Die Problematik der Inhibition macht die Notwendigkeit von Positivkontrollen deutlich. In den meisten Untersuchungen wird ein Aliquot jeder Probe mit einer bekannten Menge des zu detektierenden Organismus versetzt und parallel zu den Proben inklusive der Nukleinsäureextraktion behandelt (ABBASZADEGAN et al., 1993; KOPECKA et al., 1993; LEISINGER und METZLER, 1997). POZO et al. (1998) hingegen verwenden eine interne Kontrolle beim Nachweis von humanen Enteroviren aus klinischen Proben. Vor der Nukleinsäureisolierung werden 100 Partikel eines geklonten und gereinigten DNA-Fragmentes des Aujeszky-Virus hinzugegeben. In der anschließenden PCR-Reaktion erfolgt dann die parallele Amplifikation als "*Duplex*"-PCR.

2.4.6.2.3 Identifizierung der PCR-Produkte

Als Basismethode zur Identifizierung der PCR-Produkte wird die **Gelelektrophorese** verwendet. Die Elektrophorese ist ein physiko-chemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld in einer festen Gelmatrix aus Agarose zu deren Trennung verwendet wird. Die Nukleinsäuren werden mit Ethidiumbromid, das unter UV-Licht orangefarbig fluoresziert, angefärbt. Die Methode weist eine Empfindlichkeit von 5 ng Nukleinsäure pro Bande auf (IBELGAUFTS, 1990). Die Auftrennung der DNA nach Fragmentgrößen wird mit der Wanderung von bekannten Segmenten (Markern) verglichen. Aus einem PCR-Produkt der zu erwarteten Größe kann jedoch nicht geschlossen werden, dass es tatsächlich das erwartete Amplifikat ist.

Daher und zur Steigerung der Sensitivität (DENG et al., 1994) wird zur Detektion von PCR-Produkten häufig die *Southern-Blot*-Hybridisierung bzw. die *Dot-Blot*-Hybridisierung verwendet. Die DNA-Fragmente werden dabei durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix nach ihrer Denaturierung auf eine Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Die fixierte Einzelstrang-DNA wird meist gegen radioaktiv-markierte Nukleinsäuren hybridisiert. In einer Untersuchung von ROBERTSON (1995) war die Hybridisierung um drei Zehnerpotenzen empfindlicher als der Nachweis der PCR-Produkte im Agarosegel. Mittels der Hybridisierungstechnik gelang beispielsweise der Nachweis von humanen Entero-, Rota- und Hepatitis A-Virus aus Grundwasser (ABBAS-ZADEGAN et al., 1999), humanen Enteroviren aus Klärschlamm (KOPECKA et al., 1993), die Detektion von Hepatitis A-Virus (DIVIZIA et al., 1998), Hepatitis E-Virus (JOTHI-KUMAR et al., 1993) und humanen Enteroviren (SHIEH et al., 1997) aus Abwasser. Des Weiteren wird der Nachweis von Hantaviren aus Geweben von Nagetieren beschrieben (ARTHUR et al., 1992).

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung des PCR-Produktes und zur Steigerung der Sensitivität ist die Bestätigung durch eine zweite PCR. Bei dieser zweiten Reaktion werden entweder nur ein (*seminested*-PCR) oder zwei (*nested*-PCR) neue Primer verwendet, wobei die Sequenz der neuen Primer so gewählt wird, dass sie innerhalb des in der ersten Reaktion

amplifizierten Fragmentes liegt. Die zweite PCR mit dem inneren Primer-Set funktioniert nur korrekt, wenn in der ersten PCR das richtige Fragment amplifiziert wurde. Die Detektion der Amplifikate erfolgt dabei meist im Agarosegel. Eine Detektion der PCR-Produkte der zweiten PCR mittels der Hybridisierung lieferte in einer Studie von ROBERTSON (1995) keine weitere Sensitivitätssteigerung. Die starke Vermehrung, die die zweite PCR so sensitiv macht, beinhaltet gleichzeitig das große Risiko, durch Kontaminationen mit amplifizierten DNA-Molekülen falsch positive Resultate zu erzielen. Daher sind mitgeführte Negativkontrollen bei der zweiten PCR von besonders großer Bedeutung. Um eine Kontamination der zu untersuchenden Proben auszuschließen, pipettierten PINA et al. (1998) und PUIG et al. (1994) nach jeder zweiten Probe eine Negativkontrolle, bestehend aus Reaktionsansatz ohne Zugabe von Nukleinsäure. Zur Vermeidung von Kontaminationen stehen zahlreiche Strategien zur Verfügung. PUIG et al. (1994) und GRABOW et al. (1999) berichten beispielsweise vom Einsatz des Enzyms Uracil-DNA-Glykosylase beim Virusnachweis aus Abwasser und SANKARY et al. (1994) beim Hepatitis B-Virus Nachweis aus Serumproben. Aufgrund ihrer Spezifität und Sensitivität findet die nested- bzw. seminested-PCR im Bereich der Virusdiagnostik aus Umweltmaterialien breite Anwendung. PUIG et al. (1994) untersuchten unter anderem Flusswasser auf das Vorhandensein von humanen Enteroviren. Dabei zeigte sich, dass in der ersten PCR alle neun untersuchten Proben negativ waren, wohingegen sie in der nested-PCR positive Ergebnisse lieferten. Um die Sensitivität des PCR-Nachweises von Hepatitis A-Virus aus Klärschlamm zu steigern, führten GRAFF et al. (1993) ebenfalls eine nested-PCR durch. Auch bei dieser Untersuchung waren nach der zweiten PCR zusätzliche Proben virus-positiv. Die von ROBERTSON (1995) eingesetzte nested-PCR zum Nachweis von Hepatitis A-Virus war um zwei Zehnerpotenzen sensitiver als die erste PCR. KARIWA et al. (1995) berichten sogar von einer Steigerung von vier Zehnerpotenzen beim Nachweis von Hantaviren. Eine seminested-PCR wurde zum Nachweis von humanen Enteroviren in Abwasser (REYNOLDS et al., 1998; GANTZER et al., 1997 und 1998), zur Detektion von humanen Enteroviren und Rotaviren in Abwasser und geklärtem Siedlungsabwasser (LEISINGER und METZLER, 1997) und zum Nachweis von humanen Enteroviren aus Oberflächenwasser und Klärschlamm (KOPECKA et al., 1993) eingesetzt. Der Erregernachweis mittels einer nested-PCR ist für Hepatitis B-Virus aus Serumproben (JURINKE et al., 1996) und Urin (KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN, 2000) beschrieben. DOUGLAS et al. (1993) und LO et al. (1993) entwickelten eine nested-PCR zum Nachweis von Hepatitis B-Virus, die um vier Zehnerpotenzen sensitiver war als die erste PCR. Die nested-PCR kann auch zur Typisierung von Erregern eingesetzt werden. GOUVEA et al. (1990) verwendeten sechs Serotyp-spezifische Primer, um Rotaviren aus Stuhlproben nach der ersten PCR näher zu charakterisieren. Die Methode lieferte dieselben Ergebnisse wie die serologische Typisierung. Zur Typisierung von Hepatitis B-Virus Amplifikaten nach der ersten PCR setzten REPP et al. (1993) fünf verschiedene Subtyp spezifische Primer ein. Die nested-PCR wurde als "Multiplex"-PCR etabliert.

Neben der *nested*-PCR kann eine nähere Typisierung der PCR-Produkte durch Sequenzieren oder Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgen. Beim **Sequenzieren** wird das Amplifikat von im Reaktionsansatz enthaltenen dNTPs, Primern und unspezifischen Amplifikaten gereinigt und anschließend die Basenabfolge in einer Sequenzierreaktion analysiert. Die Basenabfolge kann dann mit bekannten Sequenzen aus der Datenbank vergleichen werden. Die Sequenzierung von Amplifikaten aus Abwasser zum Nachweis humaner Enteroviren beschreiben SHIEH et al. (1997). Die PCR-Produkte erwiesen sich als Coxsackie A, B, Poliovirus, Echoviren und Enterovirus 70. Des Weiteren wird die Typisierung von Amplifikaten beim Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Umweltproben (DENG et al., 1994; PINA et al., 1998), von Hepatitis B-Virus aus Serum (HAWKINS et al., 1994) und Hantaviren aus klinischem Probenmaterial (HÖRLING et al., 1995) berichtet. **Restriktionsendonukleasen** sind bakteri-

elle Enzyme, die sehr spezifisch für bestimmte Basensequenzen sind. Sie werden zur Typisierung von PCR-Produkten verwendet, indem die Amplifikate durch Spaltung mit bestimmten Restriktionsenzymen in Bruchstücke zerlegt werden, die dann z.B. in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Den Einsatz solcher Enzyme zur Unterscheidung zwischen Poliovirus vom Wildtyp und Impfstämmen aus klinischen Proben und Umweltmaterialien beschreiben SCHWEIGER et al. (1994). In den Studien von XIAO et al. (1992) und ARTHUR et al. (1992) werden Restriktionsendonukleasen zur Differenzierung verschiedener Hantavirus-Serotypen eingesetzt. XIAO et al. (1991) etablierten eine RT-PCR zum Nachweis von Hantaviren aus Gewebeproben, wobei die Identifizierung der PCR-Produkte unter Verwendung von zwei Restriktionsenzymen erfolgte. Die Differenzierung von Rotavirus-Isolaten aus Flusswasser beschreiben GILGEN et al. (1997).

2.4.6.2.4 Quantifizierung von PCR-Produkten

Zur Quantifizierung von PCR-Produkten werden mehrere Möglichkeiten beschrieben. Die einfachste Methode ist die Verwendung von radioaktiv-markierten dNTPs oder Primern. Die Amplifikate werden nach der PCR elektrophoretisch aufgetrennt, die spezifische Bande ausgeschnitten und die Radioaktivität z.B. im Szintillator bestimmt. Eine semiquantitative Bestimmung von Hepatitis B-Virus in Serum anhand der Intensität der sichtbaren Banden im Agarosegel beschreiben LUCOTTE et al. (1994). Es werden dabei unter Verwendung einer Verdünnungsreihe mit geklonter Hepatitis B-Virus-DNA drei Intensitätsabstufungen (+ entsprach 50 bis 500 Kopien, ++ 500 bis 5000 und +++ mehr als 5000 Kopien) definiert. In einer Studie von MATSUMOTO et al. (1997) konnte Hepatitis B-Virus aus Blutproben quantifiziert werden, indem in Abhängigkeit von der Virusmenge im Agarosegel eine, zwei oder drei Banden auftraten. Bei einer DNA-Menge von weniger als 50 mol war eine Bande, zwischen 50 und 250 mol zwei Banden und bei einer Konzentration von mehr als 1250 mol waren drei Banden im Gel sichtbar. Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung ist die Endpunktverdünnung. Dabei wird von der Probe eine Verdünungsreihe hergestellt und in die PCR eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt anhand eines externen mitgeführten Standards. KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN (2000) verwendeten diese Methode zur Quantifizierung von Hepatitis A-Virus in Blut- und Urinproben. Die Verwendung von externen Standards lässt jedoch keine exakte Quantifizierung zu, da sich Unterschiede bei der Nukleinsäureextraktion und der Amplifikation ergeben (ZIMMERMANN und MANN-HALTER, 1996). Daher wird die competitive-PCR am häufigsten angewendet. Diese Methode basiert auf der competitiven gleichzeitigen Amplifikation der spezifischen Ziel-Sequenz und eines internen Standards mit bekannter Konzentration in einem Reaktionsansatz. Dabei müssen die verwendeten Primer sowohl an die Ziel-DNA als auch an die des Standards hybridisieren. Des Weiteren muss die Amplifizierung für beide Templates mit derselben Effizienz erfolgen und eine Differzierung der beiden PCR-Produkte möglich sein. Im einfachsten Fall geschieht dies durch unterschiedliche Fragmentgrößen (ZIMMERMANN und MANNHALTER, 1996). ARNAL et al. (1999) etablierten eine competitive-RT-PCR zur Ouantifizierung von Hepatitis A-Virus aus Schalentieren. Hierzu wurde eine Sequenz als internen Standard verwendet, die dem Wildtyp, mit Ausnahme einer Deletion, entsprach. Die Identifizierung der gebildeten PCR-Produkte erfolgte mittels der Hybridisierung und eines DNA-EIA. Neben der Quantifizierung der im Probenmaterial enthaltenen Viren erhielten die Autoren Informationen über die Effizienz der Nukleinsäureextraktion, die RT-Reaktion und das Ausmaß der Inhibition.

2.4.6.2.5 Varianten der PCR

Bei einer "*One-Step*" **RT-PCR** finden die RT-Reaktion und die PCR in einem Reaktionsansatz statt. Diese Art der RT-PCR ist Zeit sparend und vermindert das Risiko einer Kontamination. Im Gegensatz zur RT-PCR in zwei getrennten Reaktionsschritten weist die "One-*Step*"-RT-PCR eine geringere Sensitivität auf und bietet wenig Optimierungsmöglichkeiten (Primer, Enzym, Temperatur). Des Weiteren steht die cDNA nicht für weitere Versuche zur Verfügung. GRAFF et al. (1993) setzten sie zum Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Klärschlamm, GOUVEA et al. (1990) von Rotaviren aus Stuhlproben und POZO et al. (1998) zur Detektion von humanen Enteroviren aus klinischem Material ein. XIAO et al. (1991 und 1992) und HJELLE (1995) beschreiben ebenfalls eine "*One-Step*"-RT-PCR zum Nachweis von Hantaviren.

Bei der "*Multiplex*"-PCR werden in einem Reaktionsansatz mehrere Primerpaare pipettiert, wodurch die parallele Detektion von mehreren Erregern möglich ist. Sie stellt eine kostengünstigere und zeitsparende Variante der PCR dar. Eine erfolgreiche parallele Amplifikation setzt jedoch voraus, dass die eingesetzten Primer keine Dimere bilden und dieselbe Hybridisierungstemperatur haben und die PCR-Reaktionen für alle zu detektierenden Mikroorganismen nach einem Protokoll durchführbar sind (DeLEON et al., 1990). TSAI et al. (1994) etablierten eine "*Triplex*"-PCR mit der der Nachweis von Polio-, Rota- und Hepatitis A-Virus erfolgen kann. Die Methode wurde anhand mit Virus versetzter Meer- und Abwasserproben entwickelt. Dabei zeigte sich, dass zum Nachweis von Poliovirus die einfache PCR um eine Zehnerpotenz empfindlicher als die "*Triplex*"-PCR war, wohingegen sich für die Detektion von Rota- und Hepatitis A-Virus keine Sensitivitätsunterschiede ergaben. Der parallele Erregernachweis war bis zu einer Konzentration von 1 PFU möglich. DeLEON et al. (1990) beschreiben ebenfalls die erfolgreiche parallele Amplifikation von humanen Entero-, Rota- und Hepatitis A-Virus aus Wasserproben.

Eine weitere Variante des PCR-Nachweises ist die "*Solid-phase*"-PCR. Dabei werden die Mikroorganismen durch Filtration an eine Nitrocellulosemembran gebunden, die Partikel aufgeschlossen, die fixierten Nukleinsäuren in einer im Anschluss daran durchgeführten PCR amplifiziert und die gebildeten Produkte detektiert. TORANZOS et al. (1992) schlagen diese Methode zum direkten Nachweis von Viren aus Wasser und Luftproben vor.

Erreger	Probenmaterial	Methode	Nachweis der PCR Produkte	Befund (positive Proben)	Quelle
Hepatitis A-Virus	Abwasser	Hybridisierung		3 von 6 Proben	BOSCH et al. (1991)
Hepatitis A-Virus	Abwasser	AC-RT-PCR	Hybridisierung	8 von 10 Proben	DIVIZIA et al. (1998)
Hepatitis A-Virus	Abwasser Flusswasser Meer	RT-nested-PCR		4 von 18 Proben 10 von 23 Proben 3 von 9 Proben	
hum. Enteroviren	Abwasser Flusswasser Meer	RT-nested-PCR	Gelelektrophorese	6 von 18 Proben 5 von 23 Proben 4 von 9 Proben	PINA et al. (1998)
Adenoviren	Abwasser Flusswasser Meer	nested-PCR		16 von 18 Proben 15 von 23 Proben 7 von 9 Proben	
Hepatitis A-Virus Rotavirus Poliovirus	Abwasser	RT-PCR	Hybridisierung	1 von2 Proben1 von2 Proben1 von2 Proben	TSAI et al. (1994)
hum. Enteroviren Rotaviren	Abwasser	RT-seminested-PCR	Gelelektrophorese	7 von 8 Proben 7 von 7 Proben	LEISINGER und METZLER (1997)
hum. Enteroviren	Abwasser	RT-PCR	Hybridisierung	9 von 16 Proben	SHIEH et al. (1997)
hum. Enteroviren Rotaviren Hepatitis A-Virus	Grundwasser	RT-PCR	Hybridisierung	40 von 133 Proben 18 von 130 Proben 12 von 139 Proben	ABBASZADEGAN et al. (1999)
hum. Enteroviren Adenoviren	Flusswasser Abwasser Flusswasser Abwasser	RT-nested-PCR nested-PCR	Gelelektrophorese	9 von 9 Proben 12 von 16 Proben 9 von 9 Proben 16 von 16 Proben	PUIG et al. (1994)

Tab. 2: Molekularbiologischer Virusnachweis aus Wasser und Klärschlamm

Erreger	Probenmaterial	Methode	Nachweis der PCR Produkte	Befund (positive Proben)	Quelle
hum. Enteroviren	Abwasser	RT-seminested-PCR	Gelelektrophorese	28 von 48 Proben	GANTZER et al. (1998)
hum. Enteroviren	Abwasser	RT-seminested-PCR	Gelelektrophorese	18 von 25 Proben	GANTZER et al. (1997)
hum. Enteroviren	Grundwasser	Hybridisierung RT-PCR	Hybridisierung	1 von 10 Proben 2 von 10 Proben	ABBASZADEGAN et al. (1993)
hum. Enteroviren	Klärschlamm Oberflächenwasser	RT-PCR RT-seminested-PCR	Hybridisierung Gelelektrophorese	6 von 10 Proben 10 von 11 Proben	KOPECKA et al. (1993)
hum. Enteroviren Rotaviren	Flusswasser	RT-nested-PCR	Hybridisierung	6 von 6 Proben 6 von 6 Proben	GILGEN et al. (1997)
hum. Enteroviren Hepatitis A-Virus	Klärschlamm	RT-seminested-PCR RT-double-PCR	Gelelektrophorese	8 von 8 Proben 7 von 8 Proben	STRAUB et al. (1994a)
hum. Enteroviren	verschiedene Wässer	RT-nested-PCR	Gelelektrophorese	8 von 29 Proben	SELLWOOD et al. (1998)
hum. Enteroviren	Erde (gedüngt)	RT-seminested-PCR	Gelelektrophorese	21 von 24 Proben	STRAUB et al. (1995)

Fortsetzung Tab. 2: Molekularbiologischer Virusnachweis aus Wasser und Klärschlamm

2.4.6.2.6 Sensitivität der PCR

Bei genauer Betrachtung der Literatur (vergl. Tab. 4) fällt auf, dass die eigentliche Bestimmung der Sensitivität der etablierten PCR-Systeme in den wenigsten Studien in Bezug auf das zu untersuchende Probenmaterial erfolgt. Vielmehr wird die Untersuchung aus Virussuspensionen in relativ "reinem Zustand" (Zellkulturüberstand, Pufferlösungen, destilliertes Wasser, Leitungswasser, gereinigte Nukleinsäuren) vorgenommen. Als Bezugsgröße dienen Konzentrationsangaben, die mittels der Zellkulturtechnik ermittelt werden (KID₅₀, PFU, MPNCU und FFU). Hierzu wird ein Referenzvirus eingesetzt, das sich in der Zellkultur, idealer Weise mittels cpe, vermehren lässt. Über die Viruskonzentrationen können dann, anhand der in Tab. 3 dargestellten Zusammenhänge, Rückschlüsse auf die in der PCR noch nachweisbare Partikelmenge gezogen werden. Daneben lässt sich die Empfindlichkeit von PCR-Systemen auch anhand gereinigter Nukleinsäuren, deren Konzentration photo-metrisch bestimmt wird, ermitteln. GOUVEA et al. (1990) verwendeten beispielsweise im CsCl-Gradienten gereinigte Rotavirus-RNA. KOPECKA et al. (1994) setzten cRNA ein, die vom Plasmid pHK synthetisiert wurde. Weit häufiger wird die photometrische Konzentrationsbestimmung im Bereich der DNA eingesetzt.

Erreger	Verhältnis	Quelle
Picornaviren	1 PFU entspricht 1000 Partikel	RUECKERT (1990)
hum. Enteroviren	1 PFU entspricht 100-400 Partikel	SHIEH et al. (1997)
hum. Enteroviren	1 PFU entspricht 100-1000 Partikel	PUIG et al. (1994)
hum. Enteroviren	1 KID ₅₀ entspricht 100 Partikel	MULDERS et al. (1995) KOPECKA et al. (1993)
Coxsackievirus B3	0,01 KID ₅₀ / 100 µl entspricht 3 Partikel	BEAULIEUX et al. (1997)
Rotaviren	1 KID ₅₀ entspricht 50 Partikel	LeGUYADER et al. (1994)
Hepatitis A-Virus	1 KID ₅₀ entspricht 60 Partikel	JANSEN et al. (1985)
Hepatitis A-Virus	1 PFU entspricht 79 Partikel	DENG et al. (1994)

Tab. 3: Zusammenhang zwischen Partikeln und KID₅₀ bzw. PFU

Aufgrund der im Probenmaterial enthaltenen Inhibitoren fällt die Sensitivität im Probenmaterial geringer aus als der Nachweis aus "reinen" Materialien. Bei stark verschmutzten Abwasserproben sank die Empfindlichkeit des Nachweises von humanen Enteroviren um den Faktor 100 (SELLWOOD et al., 1998) bzw. 10 (REYNOLDS et al., 1998), ähnlich verhielt es sich beim Nachweis aus Oberflächenwasser (ALEXANDER und MORRIS, 1991). Um die Nachweisgrenze für die Detektion von Hepatitis A-Virus aus flüssigen Abfällen zu bestimmen, inkubierten DENG et al. (1994) verschiedene Mischproben (Abwasser und Gülle) über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer definierten Virusmenge. Aus den im Anschluss daran angefertigten Verdünnungen wurden die Nukleinsäuren extrahiert und in die RT-PCR eingesetzt. Der Virustiter wurde parallel zur PCR im Plaquetest ermittelt. GRAFF et al. (1993) verglichen die Sensitivität ihrer AC-RT-PCR zum Nachweis von Hepatitis A-Virus aus Klärschlamm und aus Kulturüberstand, indem sie eine Verdünnungsreihe einer Virusstocklösung in Zellkulturmedium und in Klärschlamm durchführten. In der nachfolgenden PCR konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Verdünnungsreihen festgestellt werden. Der Versuch zeigte zusätzlich, dass die in Klärschlamm enthaltenen Inhibitoren erfolgreich entfernt werden konnten. Ein ähnlicher Versuchsansatz wird von ABBAS-ZADEGAN et al. (1993) beschrieben. Dabei wurden die Sensitivitäten zum Nachweis von

humanen Enteroviren aus mit Virus versetztem Grundwasser und destilliertem Wasser verglichen. Auch hier gaben die Ergebnisse Auskunft über die Empfindlichkeit des PCR-Nachweises und die Effektivität der Probenaufarbeitung mittels Chromatographie. SHIEH et al. (1997) bestimmten die Sensitivität des Nachweises von humanen Enteroviren aus Abwasser, indem sie Abwasserproben mit Poliovirus versetzten und nicht nur die Nukleinsäureextraktion und die RT-PCR, sondern auch die Probenaufarbeitung mit in die Beurteilung einbezogen. Eine ähnliche Untersuchung führten GILGEN et al. (1997) durch. Auch hier wurde die Nachweisgrenze für verschiedene enteritische Viren aus 1 1 Wasser unter Berücksichtigung der Probenaufarbeitung definiert. Es gelang der Nachweis von 1 KID₅₀/ 1 Probe. LeGUYADER et al. (1994) versetzten ihr Probenmaterial (Schalentiere) mit definierten Virusmengen von Polio-, Rota- und Hepatitis A-Virus und ermittelten die Nachweisgrenzen für Extraktion und RT-seminested-PCR. Die Untersucher weisen darauf hin, dass bei der Kalkulation der Sensitivitäten davon ausgegangen wird, dass es während der Aufarbeitungsschritte zu keinem Verlust von Nukleinsäure kommt. Um die tatsächliche Nachweisgrenze ihres Testsystems zu bestimmen, kontaminierten STRAUB et al. (1995) Bodenproben mit Poliovirus und verzichteten bei ihren Angaben (PFU pro g Bodenprobe) bewusst auf Partikelzahl pro PCR-Ansatz. So wurde die tatsächlich im Probenmaterial nachweisbare Mindestmenge von 2000 PFU/ g Boden als Nachweisgrenze definiert.

Erreger	Probenmaterial	Methode	Sensitivität	Quelle
hum. Enteroviren	Zellkultur	AC-RT-RCR (Gelelektrophorese)	3 Partikel/ 100 μl	BEAULIEUX et al. (1997)
hum. Enteroviren	Elutionspuffer	RT- <i>seminested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	3 bis 0,3 MPNCU/ ml	GANTZER et al. (1997)
hum. Enteroviren	destilliertes Wasser Meerwasser	RT- <i>seminested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	0,1 PFU/ Ansatz 1 PFU/ Ansatz	REYNOLDS et al. (1998)
hum. Enteroviren	destilliertes Wasser Grundwasser	RT-PCR (Gelelektrophorese)	0,1 PFU/ Ansatz	ABBASZADEGAN et al. (1993)
hum. Enteroviren	Abwasser	RT-PCR (Hybridisierung)	3 bis 12 Partikel/ Ansatz	SHIEH et al. (1997)
hum. Enteroviren	Flusswasser, Meer	RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	0,1 PFU/ 100 ml	SELLWOOD et al. (1998)
hum. Enteroviren	gereinigte cRNA	RT-PCR (Hybridisierung)	1 fg bzw. 200 Partikel/ Ansatz	KOPECKA et al. (1993)
hum. Enteroviren	Boden	RT-PCR RT-seminested-PCR (Gelelektrophorese)	2000 PFU/ g 200 PFU/ g	STRAUB et al. (1995)
hum. Enteroviren	Klärschlamm	RT-seminested-PCR (Gelelektrophorese)	0,2 PFU/ ml	STRAUB et al. (1994 b)
hum. Enteroviren Hepatitis A-Virus Rotaviren	Leitungswasser	RT-seminested-PCR (Gelelektrophorese)	1 bis 10 KID ₅₀ / 1 l	LEISINGER und METZLER, (1997)
hum. Enteroviren Hepatitis A-Virus	Leitungswasser	RT- <i>nested</i> -PCR (Hybridisierung)	0,01 KID ₅₀ / Ansatz	GILGEN et al. (1997)
hum. Enteroviren Rotaviren Hepatitis A-Virus	Puffer	RT-PCR (Gelelektrophorese)	0,05 PFU/ 100 μl 0,1 PFU/ 100 μl 0,3 PFU/ 100 μl	SCHWAB et al. (1991)
hum. Enteroviren Rotaviren Hepatitis A-Virus	Schalentiere	RT-seminested-PCR (Hybridisierung)	2000 Partikel/ g 5000 Partikel/ g 1200 Partikel/ g	LeGUYADER et al. (1994)

 Tab. 4: Sensitivitäten des molekularbiologischen Nachweises

Erreger	Probenmaterial	Methode	Sensitivität	Quelle
hum. Enteroviren Rotaviren Hepatitis A-Virus	Abwasser	<i>Triplex</i> -RT-PCR (Hybridisierung)	1 PFU/ Ansatz	TSAI et al. (1994)
hum. Enteroviren Adenoviren	Zellkultur	RT-nested-PCR nested-PCR (Gelelektrophorese)	1 bis 10 Partikel/ Ansatz 1 Partikel	PUIG et al. (1994)
Rotaviren	gereinigte RNA Stuhl	RT-PCR (Hybridisierung)	500 Kopien bzw. 10 fg RNA/ Ansatz 1 pg RNA/ Ansatz	WILDE et al. (1990)
Rotaviren	gereinigte RNA	RT-PCR (Gelelektrophorese)	20 bis 100 pg/ Ansatz	GOUVEA et al. (1990)
Hepatitis A-Virus	Klärschlamm	AC-RT-PCR AC-RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	$10^{2,2} \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ $10^{-2,2} \text{ KID}_{50}/\text{ml}$	GRAFF et al. (1993)
Hepatitis A-Virus	künstliches Meerwasser	RT-PCR (Gelelektrophorese)	1 bis 10 KID ₅₀	ARNAL et al. (1998)
Hepatitis A-Virus	Gemisch (Abwasser, Gülle)	AC-RT-PCR RT-PCR (Hybridisierung)	0,053 PFU/ Ansatz 0,16 PFU/ Ansatz	DENG et al. (1994)
Hepatitis A-Virus	Zellkultur, Kot, Serum	Hybridisierung	10^{3} KID ₅₀	TICEHURST et al. (1987)
Hepatitis A-Virus	gereinigtes Virus	Hybridisierung	500-1000 KID ₅₀	SHIEH et al. (1991)
Hepatitis B-Virus	Serum	nested-PCR (Gelelektrophorese)	100 Partikel/ ml	JURINKE et al. (1996)
Hepatitis B-Virus	keine Angaben	PCR (Gelelektrophorese)	1 bis 10 Partikel	KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN (2000)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	<i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	3 Partikel/ ml	DOUGLAS et al. (1993)

Fortsetzung Tab. 4: Sensitivitäten des molekularbiologischen Nachweises

Erreger	Probenmaterial	Methode	Sensitivität	Quelle
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	nested-PCR double-nested-PCR (Gelelektrophorese)	10 bis 100 Partikel/ Ansatz 1-10 Partikel/ Ansatz	HAWKINS et al. (1994)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	nested-PCR (Gelelektrophorese)	10 Partikel/ Ansatz	LO et al. (1993)
Hepatitis B-Virus	Serum	PCR mit 99 Zyklen (Gelelektrophorese)	10 Partikel/ ml bzw. 1 Partikel/ Ansatz	VANDENVELDE et al. (1993)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA Serum	<i>nested</i> -PCR (Hybridisierung)	0,01 fg 0,4 fg/ ml bzw. 130 Partikel/ ml	ENRIQUEZ et al. (1994)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	<i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	3 Partikel/ Ansatz	KEUM et al. (1997)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	<i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	10 bis 1000 Partikel/ Ansatz	GOMES et al. (1996)
Hepatitis B-Virus	gereinigte DNA	<i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	10 ⁻⁵ pg/ Ansatz	KANEKO et al. (1989)
Hantaviren	Zellkultur Serum	RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	3,75 x 10 ⁻⁵ FFU/ ml 3,75 x 10 ⁻⁴ FFU/ ml	HÖRLING et al. (1995)
Hantaviren	Zellkultur	RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	16 infizierte Zellen	XIAO et al. (1991)
Hantavirus	Serum	RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	1 PFU	CHU et al. (1995)
Hantavirus	Zellkultur	RT-PCR RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	6 x 10 ³ FFU 0,6 FFU	KARIWA et al. (1995)

Fortsetzung Tab. 4: Sensitivitäten des molekularbiologischen Nachweises

2.4.7 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises

Die Auswertung der Literatur zeigt, dass sich vergleichende Studien zum Virusnachweis aus Umweltmaterialien vor allem mit den humanen Enteroviren beschäftigen. Aus Tabelle Tab.5 geht hervor, dass im Allgemeinen mit molekularbiologischen Methoden mehr positive Proben erhalten werden als mit der parallel durchgeführten Zellkulturtechnik. Dies ist hauptsächlich durch die bereits erwähnte hohe Sensitivität des PCR-Nachweises bedingt. Sie erwies sich um den Faktor 10 bis 10³ (KOPECKA et al., 1993), 10² bis 10³ (PUIG et al., 1994), 20 (DENG et al., 1994) bzw. den Faktor 10 (ABBASZADEGAN et al., 1993) empfindlicher als die Zellkultur. In der Untersuchung von SELLWOOD et al. (1998) zum Nachweis von humanen Enteroviren aus Wasser entsprachen sich die Sensitivitäten hingegen. Dies wurde auf eine mangelhafte Probenaufarbeitung zurückgeführt. Die Sensitivitäten der beiden Nachweissysteme lässt sich jedoch nur dann vergleichen, wenn mehrere Zellsysteme zur Isolierung verwendet werden (GANTZER et al., 1998). GRABOW et al. (1999) und POZO et al. (1998) setzten vier verschiedene Zelllinien zur Isolierung von humanen Enteroviren aus Wasser bzw. klinischem Probenmaterial ein. Des weiteren ist der Beobachtungszeitraum entscheidend, der in vielen Studien zu kurz gewählt ist, wodurch die Viren keine Möglichkeit haben sich an das Zellsystem anzupassen und langsam vermehrende Erreger meist nicht erfasst werden. PINA et al. (1998) und PUIG et al. (1994) inkubierten ihre konzentrierten Wasserproben beispielsweise nur über einen Zeitraum von fünf Tagen in der Zellkultur. ABBASZADEGAN et al. (1999) schätzen den meist über zwei Zellpassagen angesetzten Beobachtungszeitraum oft als zu gering ein.

Zellkulturen sind sehr zeit- und arbeitsintensiv, und nach der Virusvermehrung muss zusätzlich eine meist aufwendige Identifizierung erfolgen. Darin liegt, neben der Sensitivität, ein entscheidender Vorteil der PCR-Diagnostik. Mit dem kulturellen Virusnachweis können nur infektiöse und in der Zellkultur vermehrungsfähige Viren erfasst werden. Es werden vor allem die Viren detektiert, die an das verwendete Zellsystem angepasst sind oder sich schnell in Kultur vermehren. Dies hat zur Folge, dass sich langsam vermehrende Viren bei der Isolierung unterdrückt werden (PINA et al., 1998). Die PCR liefert hingegen keinerlei Information über die Infektiosität der nachgewiesenen Organismen. Vor allem in Umweltmaterialien ist der Anteil an nicht infektiösen Partikeln besonders hoch (PUIG et al., 1994). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass das Verhältnis zwischen 1:10⁴ und 1:10⁹ liegt (STRAUB et al., 1994a). Obwohl "nackte" RNA im Vergleich zu DNA in der Umwelt nicht stabil ist (PINA et al., 1998; KOPECKA et al., 1993; GANTZER et al., 1998), können keine Rückschlüsse auf die Infektiosität der detektierten RNA-Viren gezogen werden. Die RNA nicht infektiöser Viren kann, durch das Kapsid geschützt, ebenfalls zu positiven PCR-Ergebnissen führen (KOPECKA et al., 1993; GANTZER et al., 1998; MOHR, 1997). Eine Studie von ARNAL et al. (1998) zur Persistenz von infektiösem Hepatitis A-Virus und seinem Genom in künstlichem Meerwasser zeigte, dass mittels der PCR das Genom 232 Tage lang, das infektiöse Virus hingegen nur 35 Tage nachweisbar war.

Die im Probenmaterial häufig enthaltenen Hemmstoffe und zytotoxischen Substanzen stellen sowohl beim molekularbiologischen als auch kulturellen Erregernachweis ein Problem dar, das hauptsächlich von der eingesetzten Aufarbeitungs- bzw. Extraktionsmethode abhängig ist. Von toxischen Substanzen in Abwasser berichten PINA et al. (1998) beim Nachweis von humanen Enteroviren. Demnach war der kulturelle Nachweis in fünf von 18 Proben nicht möglich. Beim Virusnachweis aus Klärschlamm gelang KOPECKA et al. (1993) aus allen untersuchten Proben die kulturelle Virusisolierung, wohingegen bei der PCR vier von 10 Proben so stark inhibiert waren, dass keine Detektion erfolgen konnte. Neben der Inhibition limitiert das im Allgemeinen geringe, für die Untersuchung eingesetzte Probenvolumen den Erfolg der PCR, was vor allem bei Probenmaterialien mit geringem Virustiter von Bedeutung ist (REYNOLDS et al., 1998) und außerdem den Vergleich Kultur und PCR zusätzlich erschwert (STRAUB et al., 1994a). Demzufolge beschreiben ABBASZADEGAN et al. (1999) den Einsatz einer "*large volume*"-PCR. REYNOLDS et al. (1998) bevorzugen den kulturellen Nachweis aus Probenmaterialien mit geringem Virustiter und hohen Anteilen an Inhibitoren, die sich nicht ausreichend durch Reinigungsschritte entfernen lassen.

Aufgrund störender Inhibitoren und keiner Unterscheidung zwischen infektiösen und bereits inaktivierten Viren werden Zellkulturmethoden und molekularbiologische Methoden oft miteinander kombiniert. So inokuliert man Zellen mit der Umweltprobe und extrahiert nach einigen Tagen die Nukleinsäuren aus den infizierten Zellen und testet diese mit molekularbiologischen Methoden. Man kann hiermit auch dann positive Ergebnisse erreichen, wenn die Zellkultur keinen cpe zeigt. Da sich die Viren in den Zellen vermehrt haben, besteht die Berechtigung, die mit der kombinierten Nachweismethode detektierten Viren als infektiös einzustufen (WALTER, 2000). SHIEH et al. (1991) inokulierten konzentrierte Wasserproben in AGMK Zellen. Im Anschluss daran folgte die Detektion von humanen Enteroviren und Hepatitis A-Virus mit Hilfe der Hybridisierung. KOPECKA et al. (1993) wiesen infektiöse humane Enteroviren in Klärschlamm und Oberflächenwasser nach, indem die Proben vor der RT-seminested-PCR eine Woche in der Zellkultur inkubiert wurde. Zum Nachweis von Hantaviren aus Gewebe (Lunge, Niere) von Fledermäusen wurden die Proben in VERO-E6 über einen Zeitraum von zwei Wochen inkubiert, die RNA isoliert und anschließend in die RT-PCR eingesetzt (KIM et al., 1994). Die molekularbiologische Detektion der Virusvermehrung hat zwei weitere Vorteile. Zum einen werden Viren erfasst, die sich ohne sichtbaren cpe vermehren, und zum anderen werden die Isolate näher charakterisiert, wodurch auf z.B. aufwendige Neutralisationstests verzichtet werden kann. Eine Untersuchung von GRABOW et al. (1999) zum Nachweis von humanen Enteroviren aus verschiedenen Wässern hatte gezeigt, dass im Großteil der Proben infektiöse humane Enteroviren vorhanden waren, die jedoch in der Kultur ohne cpe blieben. Des Weiteren erwiesen sich beim Erregernachweis aus Abwasser viele cpe verursachende Isolate in der PCR als Enterovirus-negativ. Dabei kann es sich z.B. um Reoviren handeln, die in Umweltmaterialien in höheren Konzentrationen als humane Enteroviren vorkommen (PUIG et al., 1994). GRABOW et al. (1999) halten die kulturelle Virusisolierung unter Einsatz mehrerer Zellsysteme und Durchführung von Zellpassagen in Kombination mit der PCR für den Erregernachweis aus Wasser für sensitiver als eine der beiden Methoden alleine. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die vorgeschaltete Vermehrung in der Zellkultur dazu führt, dass bestimmte Viren, die sich nur langsam oder gar nicht in Kultur vermehren oder nur in sehr geringen Konzentrationen im Probenmaterial vorliegen, mit dieser Methode nicht erfasst werden (SHIEH et al., 1997).

Erreger	Probenmaterial	Methoden	Resultat	Quelle
hum. Enteroviren	Grundwasser	BGM, Zellpassage RT-PCR (Hybridisierung)	cpe in 13 von 149 Proben 40 von 133 Proben	ABBASZADEGAN et al. (1999)
hum. Enteroviren	Abwasser	BGM, Zellpassage RT- <i>seminested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 5 von 48 Proben 28 von 48 Proben	GANTZER et al. (1998)
hum. Enteroviren	Klärschlamm Oberflächenwasser	BGM, VERO RT-seminested-PCR (Hybridisierung) BGM, VERO RT-seminested-PCR (Hybridisierung)	10 von 10 Proben 6 von 10 Proben 2 von 5 Proben 5 von 5 Proben	KOPECKA et al. (1993)
hum. Enteroviren	Abwasser Flusswasser	BGM, keine Zellpassage RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese) BGM, keine Zellpassage RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 1 von 18 Proben 6 von 18 Proben cpe in 1 von 23 Proben 5 von 23 Proben	PINA et al. (1998)
hum. Enteroviren	Abwasser Flusswasser	BGM, keine Zellpassage RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese) BGM, keine Zellpassage RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 5 von 16 Proben 12 von 16 Proben cpe in 1 von 9 Proben 9 von 9 Proben	PUIG et al. (1994)
hum. Enteroviren	verschiedene Wässer	BGM RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 22 von 29 Proben 8 von 29 Proben	SELLWOOD et al. (1998)

 Tab. 5: Vergleich des molekularbiologischen und kulturellen Erregernachweises aus Umweltproben

Erreger	Probenmaterial	Methode	Resultat	Quelle
hum. Enteroviren	Abwasser	RD, Zellpassage RT-PCR (Hybridisierung)	cpe in 7 von 16 Proben 9 von 16 Proben	SHIEH et al. (1997)
hum. Enteroviren	Klärschlamm	BGM, keine Zellpassage RT-seminested-PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 6 von 8 Proben 8 von 8 Proben	STRAUB et al. (1994a)
hum. Enteroviren	Grundwasser	BGM, Zellpassage RT-PCR (Hybridisierung)	cpe in 2 von 10 Proben 2 von 10 Proben	ABBASZADEGAN et al. (1993)
hum. Enteroviren	Erde	BGM RT-seminested-PCR	cpe in 0 von 24 Proben 21 von 24 Proben	STRAUB et al. (1995)
hum. Enteroviren	klinisches Material	BGM, A549, RD, WI-38 Amplicor EV-Kit RT- <i>nested</i> -PCR (Gelelektrophorese)	cpe in 22 von 97 Proben 31 von 97 Proben 39 von 97 Proben	POZO et al. (1998)

Fortsetzung Tab. 5: Vergleich des molekularbiologischen und kulturellen Erregernachweises aus Umweltproben

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien

In Tab. 6 sind alle verwendeten Zelllinien, die Serumkonzentrationen, Zusätze im Kultivierungsmedium und die Zusammensetzung des jeweiligen Gefriermediums dargestellt.

Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen mit unterschiedlichem Fassungsvermögen eingesetzt. Die Zelldichte und Vitalität der Zellen wurde täglich mikroskopisch überprüft. War der Zellrasen am Flaschenboden dicht und geschlossen, wurden die Zellen mittels Feuchtpassage geerntet.

Für die Feuchtpassage (Trypsinieren) wurde folgendes benötigt:

Wasserbad (37 °C)

- Zentrifuge²⁰
- Mikroskop²¹
- Feuchtbrutschrank²²
- Nährmedium (DMEM, 37 °C)²³
- Foetales Kälberserum (FKS)²⁴
- Non-essential-amino-acids (NEA)²⁵
- Versen-Trypsin-Lösung (37 °C) (s. Anhang)
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)²⁶
- Zellkulturflaschen $(50 \text{ ml}/24^2)^{27}$ oder $(260 \text{ ml}/83 \text{ cm}^2)^{28}$

Der Zellkulturüberstand (ZKÜ) wurde abgenommen und verworfen. In die Flaschen wurden 4 ml (kleine Flasche) bzw. 5 ml (große Flasche) warme Versen-Trypsin-Lösung pipettiert, durch Schwenken gleichmäßig über den Flaschenboden verteilt und für ca. 5-8 min. im Brutschrank inkubiert.

Der nun gelöste Zellrasen wurde vollständig abgesaugt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Abstoppen der Trypsinwirkung wurden 500 μ l FKS zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 175 x g für 7 min. Die Versen-Trypsin-Lösung wurde vorsichtig abpipettiert und das Zell-Pellet in 5 ml DMEM resuspendiert. Abhängig von Zelllinie, Zellzahl, Flaschengröße, Zustand der Zellen und Absicht (Vermehrung, Erhalt der Zelllinie oder Ernten zur Virustiterbestimmung) wurde ein Teil der Zellsuspension in Zellkulturflaschen eingesät und mit DMEM und den jeweiligen FKS-Konzentrationen und Zusätzen (s. Tab. 6) auf das entsprechende Flaschenvolumen aufgefüllt.

²⁰ Minifuge T, Rotor 3360, Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz

²¹ Auflichtmikroskop Wilovet, Will Wetzlar

²² Haereus Sepatech, D-37250 Osterode am Harz

²³ Dulbecco's MEM, Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. FO 435

²⁴ FKS Seromed, Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. S 0115

²⁵ NEA Seromed, Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. K 0293

²⁶ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 294 718 826

²⁷ Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 163 371

²⁸ Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 147 589

Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C im CO₂-Inkubator bei 5 % CO₂-Gehalt mit leicht geöffnetem Flaschendeckel, um einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten.

Bezeichnung	Serumkonz. Zusätze	Gefriermedium
A-549 ²⁹	10 %	70 % Zellsuspension, 20 % FKS,
human lung carcinoma		10 % DMSO
BGM ³⁰	5 %	82,5 % Zellsuspension, 10 % FKS,
buffalo green monkey, kidney	5 70	7,5 % DMSO
VERO ³¹	5 0/	70 % Zellsuspension, 20 % FKS,
african green monkey, kidney	5 /0	10 % DMSO
BSC-1 ³²	10 %	70 % Zellsuspension, 20 % FKS,
african green monkey, kidney	1 % NEA	10 % DMSO
MA-104 ³³	10 %	82,5 % Zellsuspension, 10 % FKS,
rhesus monkey, kidney	1 % NEA	7,5 % DMSO
Vero-E6 ³⁴	5 %	70 % Zellsuspension, 20 % FKS,
african green monkey, kidney		10 % DMSO
CRFK ³⁵	8 %	82,5 % Zellsuspension, 10 % FKS,
felis catus, kidney cortex		7,5 % DMSO
PK 15 ³⁶	10 %	82,5 % Zellsuspension, 10 % FKS,
pig, kidney		7,5 % DMSO
RK 13 ³⁷	10.9/	82,5 % Zellsuspension, 10 % FKS,
rabbit, kidney	10 /0	7,5 % DMSO

Tab. 6: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

3.1.2 Gefrierkonservierung von Zellen

Es wurden nur Zellen eingefroren, die frei von Kontaminationen waren und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellzahl betrug dabei ca. 2 Mio. Zellen pro ml DMEM.

Für die Gefrierkonservierung wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

- Dimethylsulfoxid (DMSO)³⁸
- Kryoröhrchen (1,8 ml)³⁹
- Versen-Trypsin-Lösung (37 °C) (s. Anhang)
- DMEM (37 °C)
- FKS
- Neubauer Zählkammer (0,0025 mm², Tiefe:0,100 mm)

- ³¹ ECACC, Centre for Appl. Microbiol. & Reserch, Porton Down, Salisbury, SP 4 OJG, UK, Nr. 84113001
- ³² Fisher Scientific, D-69126 Heidelberg, Nr.CCl 26
- ³³ BFA, D-17498 Insel Riems, Nr. 142
- ³⁴ freundliches Geschenk des Bernhard-Nocht-Institutes, D-20395 Hamburg
- ³⁵ BFA, D-17498 Insel Riems, Nr. 115
- ³⁶ BFA, D-17498 Insel Riems, Nr. 5-1
- ³⁷ BFA, D-17498 Insel Riems, Nr. 109
- ³⁸ Fluka, Chemie, Ch-9470 Buchs, Art. Nr. 41640
- ³⁹ Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 375418

²⁹ DSMZ, D-38124 Braunschweig, Nr. ACC 107

³⁰ BFA, D-17498 Insel Riems, Nr. 136

- Zentrifugenröhrchen (50 ml)⁴⁰
- Styroporbox
- sterile Pasteurpipette
- steriles Röhrchen mit 4,5 ml DMEM

Der ZKÜ wurde abgenommen und verworfen. Der am Flaschenboden haftende Zellrasen wurde gelöst, indem die Feuchtpassage wie unter 3.1.1 beschrieben durchgeführt wurde. Für die Zentrifugation wurden die trypsinierten Zellen mehrerer Flaschen derselben Zelllinie in einem 50 ml Röhrchen vereint.

Das Zell-Pellet wurde in 5 ml DMEM resuspendiert. Davon wurden 500 μ l in das vorbereitete Röhrchen mit 4,5 ml DMEM überführt, um somit eine 1:10 Verdünnung zu erhalten, deren Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt werden konnte.

Berechnung der Zellzahl in der Zellsuspension: Zellzahl pro ml DMEM = Ausgezählte Zellzahl x Faktor der Zählkammer x Verdünnung

Die Zellsuspension wurde mit DMEM auf eine Zelldichte von 2 Mio. pro ml eingestellt. Die Zusammensetzung des Gefriermediums der jeweiligen Zelllinie ist Tab. 6 zu entnehmen. Nach der Zugabe von FKS zur Zellsuspension wurde das Gefrierschutzmittel DMSO tropfenweise hinzupipettiert. Die Suspension wurde sorgfältig durchmischt und mit jeweils 1,8 ml auf die beschrifteten Kryoröhrchen verteilt. Um eine gleichmäßige Temperatursenkung zu ermöglichen, wurden die verschraubten Ampullen in einer isolierenden Styroporbox bei -80 °C eingefroren. Nach einer Woche Lagerungszeit bei -80 °C wurde eine Ampulle entnommen, aufgetaut und eingesät. So konnte überprüft werden, ob eine Schädigung oder Kontamination der Zellen während des Einfriervorganges stattgefunden hatte.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

- sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml)
- DMEM (4°C)
- FKS, NEA (4 °C)
- Zellkulturflaschen (50 ml/24 cm²)

Die Gefrierampulle wurde solange vorsichtig im Wasserbad hin und her bewegt, bis der Eiskern im Inneren fast verschwunden war. Die Zellsuspension wurde in das mit 6 ml DMEM vorbereitete Zentrifugenröhrchen langsam überführt und ausverdünnt. Hieran schloss sich eine 7-minütige Zentrifugation bei 175 x g an.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml DMEM sehr vorsichtig resuspendiert. Die entstandenen 5 ml Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche überführt, mit den entsprechenden FKS-Konzentrationen und Zusätzen versetzt und der Zustand der Zellen im Mikroskop überprüft.

⁴⁰ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 294 722 726

3.2 Virus

3.2.1 Verwendete Viren und Vermehrung

In Tab. 7 sind alle verwendeten Viren, die empfänglichen Zelllinien und die im Zusammenhang mit einer Vermehrung stehenden Eigenschaften dargestellt.

Im Allgemeinen wurde für eine Virusvermehrung folgendes benötigt:

- DMEM (37 °C)
- FKS
- PBS (37 °C) (s. Anhang)
- Zellkulturschalen⁴¹ oder Zellkulturflaschen (260 ml/83 cm²)
- Zentrifugenröhrchen (50 ml)
- Zentrifuge⁴²

Zur Rotavirus-Vermehrung zusätzlich:

Trypsin-Stammlösung (10 000 units/ml) (s. Anhang)

Tab. 7: Zusammenfassung der verwendeten Viren

Bezeichnung	Zellkultur	Eigenschaften
humane Enteroviren Polio Sabin S ⁴³	BGM VERO A-549	deutlicher cpe nach 2-5 Tagen
Hepatitis A-Virus ⁴⁴	BSC-1	zellkulturadaptiert, cpe nach 10 Tagen, Feuchtpassage nach 5 Tagen
Rotavirus (Gruppe A) Human Wa ⁴⁵	MA-104	schleimiges Ablösen des Zellrasens nach 2 Tagen, Infektion ist Trypsin abhängig
Hantavirus Puumala ⁴⁶	VERO E6	deutlicher cpe nach 15 Tagen, kugeliges Ablösen der Zellen, Feuchtpassage alle 4 Tage
Felines-Herpesvirus FEHV ⁴⁷	CRFK	deutlicher cpe nach 2 Tagen
Equines-Rhinovirus ERV ⁴⁸	RK 13	deutlicher cpe nach Tagen
Aujeszky-Virus AKV ⁴⁹	PK 15	deutlicher cpe nach 2-3 Tagen

⁴¹ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 168381

 ⁴² Jouan Typ GR4-12, Jouan S.A. rue Bobby Sands, 44805 Saint-Herblain, France
 ⁴³ Poliomyelitis-Lebendimpfstoff (trivalent), SmithKline Beecham Pharma GmbH, D-80791 München, Art. Nr. S 2466 A

⁴⁴ ATCC, Rockville, Maryland, USA, Nr. VR-1420

⁴⁵ Freundliches Geschenk der Ruhr-Universität, D-44780 Bochum

⁴⁶ Freundliches Geschenk des Bernhard-Nocht-Institutes, D-20395 Hamburg

⁴⁷ Feldisolat, Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

⁴⁸ Feldisolat Typ I, A-Wien

⁴⁹ Stamm Phylaxia LY0301D, Bayer AG

a) Vermehrung (allgemein)

Die Virusvermehrung wurde in den entsprechenden Zellen, die hierfür in Zellkulturschalen kultiviert wurden, durchgeführt. Zuerst wurde das Kulturmedium des konfluenten (70-80 %) Zellrasens abgesaugt und verworfen. Nachdem der Zellrasen vorsichtig mit PBS (1mal mit ca. 5 ml) gewaschen wurde, wurde ca. 1 ml Virussuspension durch leichtes Schwenken auf der gesamten Zellkultur verteilt. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für 1 h, wobei die Kulturschale wiederholt vorsichtig geschwenkt wurde.

Im Anschluss daran wurde die Virussuspension abgezogen und der Zellrasen mit PBS, wie bereits erwähnt, gewaschen. Nach Zugabe von ca. 20 ml Erhaltungsmedium (DMEM mit 2 % FKS) wurden die Zellkulturschalen im Brutschrank bis zum Auftreten eines cytopathischer Effektes (cpe) inkubiert. Die Virusernte erfolgte, sobald 2/3 des Zellrasens zerstört war. Nach dreimaligem Gefrier-Tau-Zyklus bei -80 °C wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min. bei 1800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Da das Feline-Herpesvirus relativ empfindlich ist, wurde nur ein Gefrier-Tau-Zyklus angesetzt.

b) Hantavirus-Vermehrung

Der Serotyp Puumala wurde auf VERO E6 vermehrt. Hierzu wurden Zellen in eine Zellkulturflasche mit DMEM und 3 % FKS dünn eingesät. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml Virussuspension beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h, wobei die Kulturflasche zeitweise vorsichtig geschwenkt wurde. Anschließend wurden 15 ml Erhaltungsmedium (DMEM und 3 % FKS) hinzugegeben. Die Zellen wurden alle 4 Tage, wie unter 3.1.1 beschrieben, trypsiniert und die Hälfte der Zellen wieder in die Kulturflasche eingesät. Nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 15 Tagen wurden die Zellen nach dem Auftreten des cpe einem Gefrier-Tau-Zyklus bei –80 °C unterzogen und die Virusernte, wie unter a) beschrieben, durchgeführt.

c) Rotavirus-Vermehrung

Die Virusvermehrung erfolgte auf der Zelllinie MA-104 und wurde in Zellkulturflaschen durchgeführt. Bevor der dichte Zellrasen mit der Virussuspension beimpft wurde, wurden 3 ml Virussuspension mit 60 μ l Trypsin-Stammlösung in einer Endkonzentration von 200 units/ml versetzt und im Brutschrank 30 min. vorinkubiert.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die aktivierte Viruslösung durch vorsichtiges Schwenken auf dem Zellrasen verteilt. Die Inkubation betrug 1-2 h, wobei die Flasche ca. alle 15 min. leicht geschwenkt wurde. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen, verworfen und der Zellrasen 2mal mit ca. 5 ml DMEM gewaschen.

Es wurden 15 ml DMEM, ohne FKS mit 75 µl Trypsin-Stammlösung, in einer Endkonzentration von 50 units/ml, gemischt und als Erhaltungsmedium auf die Zellkultur pipettiert. Die Virusernte erfolgte am zweiten Tag. Nach einem Gefrier-Tau-Zyklus wurde der ZKÜ wie unter a) beschrieben zentrifugiert, aliquotiert und eingefroren.

d) Hepatitis A-Virus-Vermehrung

Das zellkulturadaptierte Hepatitis A-Virus wurde auf der Zelllinie BSC-1 in Zellkulturflaschen vermehrt. Hierzu wurde das Medium des konfluenten Zellrasens abgesaugt und der Zellrasen, wie bereits beschrieben, mit PBS gewaschen. Die Inkubation der Virussuspension (1 ml) erfolgte bei 35,5°C für 1 h, wobei die Flasche ca. alle 15 min. geschwenkt wurde. Abschließend wurde die Flasche mit 14 ml Medium (DMEM, 8 % FKS

und 1 % NEA) aufgefüllt. Die Kultivierungsdauer bei 35,5 °C betrug 10 Tage, wobei die Kultur nach 5 Tagen feuchtpassagiert wurde. Nach einem Gefrier-Tau-Zyklus wurde der ZKÜ, wie unter a) beschrieben, zentrifugiert, aliquotiert und eingefroren.

3.2.2 Virustitration und Titerberechnung

Für eine Titration nach der Endpunkverdünnungsmethode in Röhrchen wurden folgende Materialien benötigt:

- DMEM
- FKS
- Sterile Glasröhrchen mit Deckel
- 96-well-Mikrotiterplatte⁵⁰

Zur Titration von Rotaviren zusätzlich:

- Trypsin-Stammlösung
- Basal-Medium-Supplement (BMS)⁵¹

Die dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -8 oder -12) der zu titrierenden Virussuspension wurde in Glasröhrchen mit 1,8 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 2 % FKS, mit Ausnahme von Rotavirus) durchgeführt. Anschließend wurde die Virustitration in eine 96-well-Mikrotiterplatte transferiert, indem je 100 μ l jeder Verdünnungsstufe in jeweils vier Mikrotiterkavitäten eingefüllt wurden. In die erste Reihe der Platte wurden pro cup 100 μ l Verdünnungsmedium ohne Virus pipettiert. Sie diente bei der späteren Auswertung als Zell-kontrolle. Abschließend wurde auf die bestückte Mikrotiterplatte 50 μ l Zellsuspension pro Kavität aufgetropft. In der Zellsuspension waren so viele Zellen enthalten, dass sich direkt nach dem Absetzen der Zellen ein konfluenter Zellrasen ausbilden konnte (ca. 10⁵ Zellen/cup). Die Mikrotiterplatte wurde dann bei 37 °C im Feuchtbrutschrank inkubiert.

Besonderheit bei der Titration von Rotavirus

Vor der Titration wurden 1 ml Virussuspension mit 20 µl Trypsin-Stammlösung in einer Endkonzentration von 200 units/ml für 30 min. bei 37°C aktiviert. Das Titrationsmedium und das Medium der Zellsuspension enthielt folgende Zusammensetzung: DMEM, 10 % BMS und 50 units/ml Trypsin-Stammlösung.

Die Titrationen wurden täglich mikroskopisch ausgewertet. Als infiziert galt eine Vertiefung, wenn mindestens ein Herd cytopathisch veränderter Zellen erkennbar war. Die Endablesung erfolgte erst, wenn keine Veränderung des Zellrasens mehr zu erwarten war. Der Nachweis von Viren ohne oder mit schwachem cpe erfolgte immunenzymatisch, nachdem die Zellen auf der Mikrotiterplatte nach 2-8 Tagen Bebrütung fixiert (s. 3.2.3 a) wurden oder mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (s. 3.3.6.6.4).

Als Titer wird der positive dekadische Logarithmus derjenigen Verdünnung bezeichnet, bei welcher statistisch die Hälfte der Ansätze reagiert (KID_{50} /Testvolumen). Dieser Wert wurde nach dem Schätzverfahren von SPEARMAN (1908) und KAERBER (1931) auf 1 ml berechnet.

⁵⁰ Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 167 008

⁵¹ Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. S 5173

3.2.3 Enzymimmunologischer Nachweis von Rotavirus (EIA)

Nach einer Inkubation der Virustitration von 2 Tagen wurden die Zellen zuerst fixiert und anschließend gefärbt. Zur Durchführung wurde folgendes benötigt:

- Ethanol⁵² (80 %)
- PBS (s. Anhang)
- Meerettich-Peroxidase-konjugiertes Kaninchen Anti-Rota⁵³
- AEC-Substrat-Lösung (s. Anhang)

a) Ethanolfixierung

Nach der Inkubation der Mikrotiterplatte wurde das Medium von den Zellen abgekippt und die Platte vorsichtig auf Zellstoff abgeklopft. In jedes well wurden 200 μ l Ethanol pipettiert und für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Fixierlösung dekantiert und die Platte 30 min. bei RT getrocknet. Die Ethanolfixierung wurde unter der Sterilwerkbank durchgeführt.

b) Färbung

Die Arbeitsverdünnung des Antikörpers (1:100) wurde mit PBS angesetzt (pro Platte 7,3 ml Gesamtmenge). In jede Kavität wurden 75 μ l dieses Ansatzes gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung wieder entfernt und die Platte 3mal (200 μ l pro well) mit PBS gewaschen und abschließend kräftig auf Zellstoff ausgeklopft. Nun wurden die Zellen gefärbt, indem in jedes well 200 μ l AEC-Substrat-Lösung pipettiert wurden. Die AEC-Substrat-Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Nach einer Inkubation von 30 min. bei 37°C wurde das Substrat abgesaugt (Sonderabfall), die Platte mit Aqua bidest 3mal gewaschen und lichtmikroskopisch ausgewertet. Spezifischpositive Reaktionen waren als dunkelbraunrot angefärbte Herde zu erkennen. Der Virustiter wurde, wie bereits beschrieben, bestimmt.

3.2.4 Sensitivitätsvergleich des Ridascreen® Rotavirus und des EIA

Da sich Rotaviren meist nicht in Form eines cpe in der Zellkultur vermehren, musste zum kulturellen Virusnachweis aus den gesammelten Luftkeimproben im Zellsystem MA104 (vergl. 3.7.2) die Methode des Enzymimmunologischen Nachweises angewandt werden. Aufgrund der sehr zeitintensiven Methode des EIA (s. 3.2.3) wurde der Einsatz des kommerziell erhältlichen Ridascreen-Rotavirus-Kits⁵⁴ getestet. Beim Ridascreen-Rotavirus-Test handelt es sich ursprünglich um einen Enzymimmunoassay zum Antigennachweis von Rotaviren in humanen Stuhlproben. Im folgenden Versuchsansatz wurde die Sensitivität beider Tests miteinander verglichen.

Es wurde 1 ml Virussuspension wie unter 3.2.2 beschrieben mit Trypsin aktiviert und titriert (-1 bis -10). Die Verdünnungsreihe wurde sowohl im EIA als auch im Ridascreen untersucht. Die Überprüfung im Ridascreen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur ersten Inkubation (s. Testdurchführung 10.4 erste Inkubation) wurde die Verdünnungsreihe (unverdünnt bis -10) im Doppelansatz in die Kavitäten übertragen. Als Negativkontrolle wurde abweichend zum Protokoll 100 µl Verdünnungsmedium der Titration eingesetzt. Die

⁵² Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 9065.2

⁵³ Dako Diagnostika GmbH, D-22004 Hamburg, Art. Nr. PO 219

⁵⁴ Enzymimmunoassay zum Nachweis von Rotaviren, R-Biopharm, D-Darmstadt, Art. Nr. C 0901

photometrische Auswertung erfolgte mit dem Microplate-Reader⁵⁵ bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Der EIA wurde mit den Verdünnungen -1 bis -10 nach der unter 3.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Überstände der einzelnen Verdünnungen wurden jedoch vor dem Fixieren der Zellen nicht verworfen, sondern wie oben beschrieben im Ridascreen getestet.

3.2.5 Enzymimmunologischer Nachweis von Hantavirus (EIA)

Die Fixierung der Zellen wurde, wie bereits unter 3.2.3 a) beschrieben, nach 3 und 8 Tagen durchgeführt. Zusätzlich wurden für die Färbung folgende Antikörper benötigt:

- Humanserum (1:320)⁵⁶ (primärer Antikörper)
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)⁵⁷ (Konjugat)

Die Arbeitsverdünnung (1:100) des primären Antikörpers wurde mit PBS angesetzt (für eine Testplatte: 10 ml Gesamtmenge). In jede Kavität wurden 100 μ l dieses Ansatzes pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte 4mal (200 μ l pro cup) mit PBS gewaschen und abschließend kräftig ausgeklopft.

Als nächstes wurde die Gebrauchsverdünnung des Konjugates angesetzt, indem pro Testplatte 10 ml PBS mit 5 μ l sekundärem Antikörper (1:2000) sorgfältig gemischt wurden. Die Mikrotiterplatte wurde mit 100 μ l pro well belegt und 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte nochmals 4-5mal gewaschen.

Anschließend wurden 100 μ l pro well AEC-Lösung pipettiert und bei RT inkubiert. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte lichtmikroskopisch nach einer 20 bis 30-minütigen Reaktionszeit, die durch Absaugen der Farbstofflösung (Sonderabfall) und waschen (3mal) mit Aqua bidest beendet wurde.

Aufgrund der Ergebnisse nach der mikroskopischen Auswertung wurde der Versuch wiederholt, wobei das Medium des Viereransatzes einer jeden Verdünnung (10^0 bis 10^{-5}) und der Zellkontrolle nicht verworfen, sondern in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vereint und nach der Nukleinsäureextraktion in die RT-nested-PCR (s. 3.3.2 und 3.3.6.7) eingesetzt wurde.

3.2.6 Enzymimmunologischer Nachweis von Hepatitis A-Virus (EIA)

Die Virustitration wurde nach einer 9-tägigen Inkubation fixiert (3.2.3 a) und gefärbt. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

⁵⁵ Easy reader EAR 400 AT, SLT%-Laborinstruments, Austria

⁵⁶ mit Antikörpern gegen Serotyp Puumala und Hantaan, Bernhardt-Nocht-Institut, D-20395 Hamburg

⁵⁷ Dianova, D-20354 Hamburg, Art. Nr. 109-035-003

- Anti-HAV antibody from mouse, isotype IgG2A, Clone 7E7⁵⁸ (primärer Antikörper)
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG⁵⁹ (Konjugat)

Die Arbeitsverdünnung des primären Antikörpers betrug 1:1000 und 1:500 und wurde mit PBS angesetzt. Pro Kavität wurden 100 μ l pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nachdem die Mikrotiterplatte 4mal mit PBS gewaschen war, wurden 100 μ l Konjugat pro well hinzugegeben. Die Gebrauchsverdünnung des Konjugates (1:5000 und 1:500) wurde ebenfalls mit PBS angesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT und 5maligem waschen der Testplatte wurden die Zellen mit AEC-Substrat-Lösung gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

3.3 Molekularbiologischer Virusnachweis

Bevor der eigentliche Nachweis der Nukleinsäure erfolgen kann, muss die DNA bzw. RNA aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Zum Nachweis von RNA Viren muss als erstes eine Abschrift der RNA, die so genannte cDNA, in einer ersten Reaktion (reverse-Transkription) hergestellt werden. Darauf folgt die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion mit spezifischen Primerpaaren. Abschließend wird die amplifizierte Sequenz detektiert. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich RNAse und DNAse freie Einwegartikel verwendet. Alle Verdünnungen und Stammlösungen wurden in DEPC-Wasser angesetzt.

3.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im folgenden Abschnitt sind alle Reagenzien und Materialien, die zur Durchführung sowohl der Vorversuche als auch zum endgültigen Erregernachweis benötigt wurden, aufgelistet. Des Weiteren wird ein allgemeines Protokoll beschrieben, wobei die genauen Angaben den einzelnen Spezialprotokollen zu entnehmen ist.

Für die nested-PCR wurden folgende Reagenzien und Materialien benötigt:

- DEPC-Wasser
- Taq-DNA-Polymerase mit mitgeliefertem 10-fach konzentriertem (10 x) Reaktionspuffer⁶⁰ (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0)
- Ultrapure dNTP Set⁶¹
- $MgCl_2$ -Lösung (25 mM)⁶²
- DMSO
- HotWaxTM Mg²⁺ Beads (1,5 mM, pH 9,0)⁶³
- jeweilige Primerpaare und Hybridisierungssonden⁶⁴
- Thermocycler mit Deckelheizung und Tube-Control⁶⁵
- LightCyclerTM Instrument⁶⁶
- PCR-Hütchen (500 μl)⁶⁷
- Kühlblock

⁵⁸ Mediagnost, D-72072 Tübingen, Art. Nr. M40

⁵⁹ Dianova, D-20354 Hamburg, Art. Nr. 115-035-062

⁶⁰ Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art. Nr. 27-0799

⁶¹ Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art. Nr. 27-2035-01

⁶² Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 1699113

⁶³ Invitrogen, Art. Nr. W6000-019.0

⁶⁴ Molbiol, D-10829 Berlin

⁶⁵ Touch Down Temperature Cycling System, Hybaid-Ags, D-69123 Heidelberg

⁶⁶ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 2011468

⁶⁷ Corning Costar, D-55294 Bodenheim, Art. Nr. 6530
- LightCyclerTM Centrifuge-Adapters⁶⁸
- Kühlzentrifuge⁶⁹
- LightCyclerTM FastStart DNA Master SYBR® Green I⁷⁰
- LightCyclerTM- DNA Master SYBR® Green I⁷¹
- LightCyclerTM- DNA Master Hybridization Probes⁷²
- LightCyclerTM Capillaries⁷³

Die erste PCR wurde in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Mastermix (Prämix), bestehend aus Wasser, Reaktionspuffer, dNTPs, Primern, Polymerase und ggf. MgCl₂-Lösung und DMSO pipettiert, sorgfältig gevortext, anzentrifugiert und auf die im Kühlblock befindlichen PCR-Hütchen verteilt. Alle Reagenzien wurden gekühlt und mit Ausnahme der Polymerase vor Gebrauch gevortext. Anschließend wurde die cDNA bzw. DNA hinzugegeben und die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert. Die Proben wurden sofort in den Thermocycler überführt und die PCR mit dem entsprechenden Temperaturprofil gestartet.

Die zweite PCR wurde entweder ebenfalls im Thermocycler oder im LightCycler durchgeführt. Im Falle des Thermocyclers wurde entsprechend der ersten PCR verfahren. Als Template wurde dabei das Produkt der ersten PCR eingesetzt.

Der LightCycler ist ein Gerät, mit dem sowohl die qualitative als auch quantitative PCR anhand eines externen Standards durchgeführt werden kann. Das geringe Reaktionsvolumen (20 µl) und die Verwendung von Glaskapillaren als Reaktionsgefäß ermöglichen einen schnellen Ablauf des Temperaturprofils und damit der PCR Reaktion. Des Weiteren können die einzelnen Arbeitsschritte der Amplifikation und die Entstehung der PCR-Produkte "online" beobachtet werden Dies wird durch den im Mastermix enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I ermöglicht. Der Farbstoff bindet an die kleine Grube der dsDNA, wodurch die Fluoreszenz bei 530 nm erheblich gesteigert wird. Die Messung der Fluoreszenz findet jeweils nach Abschluss der Elongation statt. Die Intensität des Signals gibt Auskunft über die Menge der gebildeten PCR-Produkte. Bei der im Anschluss durchgeführten Schmelzkurvenanalyse werden die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte ermittelt, indem bei langsam steigender Temperatur das Abnehmen des Fluoreszenzsignals beobachtet wird. Anhand der Schmelztemperaturen lassen sich die spezifischen Produkte der PCR-Reaktion identifizieren. Neben dem Einsatz von SYBR Green I ermöglicht die Verwendung von Hybridisierungssonden die "online" Detektion von PCR-Produkten. Dabei werden zwei spezifische Sonden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die eine Sonde trägt den Farbstoff Fluorescin am 3'-Ende, die andere den Farbstoff LightCycler-Red-640 am 5'-Ende. Erst wenn beide Sonden gleichzeitig an die Ziel-DNA hybridisieren, wird ein Fluoreszenzsignal bei 640 nm detektiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgt demnach während des Annealings. Der Vorteil dieses Formates gegenüber der Verwendung von SYBR-Green-I besteht darin, dass keine unspezifischen Produkte in das Signal mit einfließen.

Bei Verwendung des LightCyclers wurde zuerst das Temperaturprofil (exemplarisch im Anhang dargestellt), die Probenzuordnung, Kontrollen und ggf. Standards in die Software⁷⁴

⁶⁸ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 1909312

⁶⁹ Hermle Z233 MK, Hermle Labortechnik GmbH, D-78564 Wehingen

⁷⁰ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 3003230

⁷¹ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 2158817

⁷² Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 2015102

⁷³ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 1909339

⁷⁴ LightCycler Version 3.0, Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim

eingegeben. Danach wurden die Kapillaren in die gekühlten Zentrifugenadapter eingesetzt und der Mastermix, bestehend aus Wasser, $MgCl_2$, Primern und SYBR-Green angesetzt. Nachdem der Ansatz sorgfältig gevortext und anzentrifugiert war, wurde er auf die einzelnen Kapillaren verteilt. Das Template wurde hinzupipettiert und die Kapillare mit einem Stopfen verschlossen. Die Kapillaren wurden bei 1000 x g und 4°C 1 min. zentrifugiert und anschließend in den Rotor überführt. Der PCR-Lauf wurde sofort gestartet.

Bei der Verwendung von Hybridisierungssonden wurden die Proben nach der RT-Reaktion direkt mit dem entsprechenden Prämix versetzt, in den LightCycler überführt und amplifiziert.

Die Auswertung der Amplifikate erfolgte entweder im UV-Licht anhand durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemachter Banden (s. 3.3.3) oder, im Falle des LightCyclers, mittels der installierten Software. Die Produkte des LightCyclers wurden teilweise im Agarosegel überprüft, indem sie aus den Kapillaren zentrifugiert wurden. Hierzu wurden diese geöffnet und mit der Öffnung nach unten in einem PCR-Hütchen kurz anzentrifugiert.

3.3.2 Reverse-Transkription (RT-Reaktion)

Die RT-Reaktion wurde für Equines-Rhinovirus (Inhibitionskontrolle), humane Enteroviren, Rotaviren, Hepatitis A-Virus und Hantavirus durchgeführt. Beim Erregernachweis aus den Luftkeimproben wurde, um ein wiederholtes Auftauen der extrahierten RNA zu vermeiden, jede Probe parallel in einem Thermocycler-Lauf auf alle 5 RNA-Viren untersucht.

Für die RT-Reaktion verwendete Geräte und Reagenzien:

- Thermocycler mit Deckelheizung und Tube-Control
- PCR-Hütchen (500 µl)
- Primer⁷⁵
- 5-fach (5 X) konzentrierter ExpandTM Reverse-Transkriptase-Puffer
- mitgelieferte Dithiothreitlösung (DTT) und
- ExpandTM Reverse-Transkriptase⁷⁶
- Ultrapure dNTP Set
- RNase-Inhibitor⁷⁷

Tab. 8: Für die RT-Reaktion verwendete Primersequenzen

Virus	Primer	Sequenz (5` - 3`)
Equines-Rhinovirus	Rhi-as	TCAGATGGGGAAGAATAAGGCA
humane Enteroviren	EV-as	ATTGTCACCATAAGCAGCCA
Rotaviren	RV-1	GTCACATCATACAATTCTAATCTAAG
Hepatitis A-Virus	HAV-4	ATTCTACCTGCTTCTCTAATC
Hantaviren	RT-Oligo	TAGTAGTAGACTCC

Es wurden jeweils 3,5 μ l der gewonnenen RNA-Lösung (s. 3.3.4) mit je 1 μ l der spezifischen Primer (1 μ M) in ein PCR-Hütchen gegeben und gemischt (pro Probe 5 Ansätze). Pro Thermocycler-Lauf wurde eine Negativkontrolle im "*multiplex*" Ansatz mitgeführt. Hierzu wurde je 1 μ l aller spezifischen Primerlösungen in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

⁷⁵ Molbiol, D-10829 Berlin

⁷⁶ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 1785826

⁷⁷ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 799017

Die Reaktionsansätze wurden 10 min. bei 65 °C im Thermocycler denaturiert und nach der Reaktion sofort auf Eis gestellt. Danach wurden 15,5 μ l des Mastermix (s. Tab. 9) zu jedem Ansatz hinzupipettiert, 1 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
5 X Expand [™] Reverse-Transkriptase-Puffer	4	1-fach
DTT	2	10 mM
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	8	1 mM
RNase-Inhibitor	0,5	20 Einheiten
Expand [™] Reverse-Transkriptase	1	50 Einheiten
Gesamtvolumen Mastermix	15,5	

Tab. 9: Pipettierschema für den Mastermix der RT-Reaktion

3.3.3 Gelelektrophorese

Zur Durchführung wurden folgende Geräte und Chemikalien benötigt:

- Gelkammer mit Gie
 ßstation und Netzger
 ät⁷⁸
- UV-Licht⁷⁹
- Agarose⁸⁰
- Ethidiumbromid-Lösung⁸¹ (10 mg in 1 ml TAE-Puffer (1-fach konzentriert) gelöst)
- Starterpuffer (s. Anhang)
- TAE-Puffer (1-fach konzentriert) (s. Anhang)
- 100 bp Ladder⁸² (Marker)

Im Allgemeinen wurde zur Detektion ein 1,5 % iges Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 1,5 % w/v Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Nachdem der Ansatz auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden 0,005 % v/v Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben, das Gel gegossen und nach dem Erstarren in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die Proben wurden mit 1/10 Starterpuffer versetzt und vorsichtig in die Geltaschen (slot) pipettiert. Als Standard wurden in jedem Gel 5 μ l Marker mitgeführt. Die Laufzeit betrug 10 min. bei 45 V und ca. 1,5 h bei 55 V. Die Auswertung erfolgte im UV-Licht.

3.3.4 Vorversuche zur DNA-und RNA-Extraktion

Zur Isolierung der Virusnukleinsäuren wurden 4 unterschiedliche Extraktionskits miteinander verglichen. Hierbei standen die Sensitivität, die Handhabung, die Gefahr einer Kontamination und der Preis im Vordergrund. Für die Versuche wurde Polio Sabin S als Referenzvirus für RNA-Viren und Aujeszky-Virus als Referenz für DNA-Viren eingesetzt. Zusätzlich wurde die, in der Literatur häufig zitierte, Phenol-Chloroform Methode zur Extraktion von RNA durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils 10⁴ KID₅₀/ml der beiden Referenzviren im Verhältnis 1:1 gemischt und für alle Extraktionen verwendet. Die isolierte Nukleinsäure wurde anschließend in DEPC-Wasser verdünnt. Zum Nachweis des Poliovirus wurde die Verdünnungsreihe in die

⁷⁹ Lluo Link, Bachhofer, D-Reutlingen

⁷⁸ Agagal Mini G 45/2, Biometra, D-37079 Göttingen, Art. Nr. G45/292002

⁸⁰ Biozym, D-31833 Oldendorf, Art.Nr. 96203

⁸¹ Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 7870

⁸² Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg, Art. Nr. 27-4001

unter 3.3.2 beschriebene RT-Reaktion eingesetzt und in die im Anschluss daran durchgeführte nested-PCR überführt. Die erste PCR wurde nach dem Protokoll unter 3.3.6.2.4 für 30 Zyklen gefahren. Für die zweite PCR wurden 3 μ l Amplifikat der ersten PCR nach dem gleichen Protokoll im Thermocycler amplifiziert. Der Nachweis des Aujeszky-Virus erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Alle Amplifikate wurden im 1,5 %igen Agarosegel detektiert (s. 3.3.3).

Sowohl das Protokoll als auch die Primer der PCR zum Nachweis von Aujeszky-Virus wurde von der BfA für Viruskrankheiten⁸³ bezogen. In die Reaktion wurden 5 μ l DNA Extraktions-lösung eingesetzt.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment länge [bp]
GB-01	GCGCATGCTCGGCGACGTGAT	1773-1793	202
GB-02	CGGCGAGCTCCTCGCGCGTG	2164-2145	592

Tab. 10: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Pseudorabies-virus (AF 257079)

 Tab. 11: Pipettierschema f
 ür die Aujeszky-Virus PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	28,5	
10 X Reaktionspuffer	5	1-fach
dNTP-Mix (je 25 mM)	1	0,5 mM
$MgCl_2(25 mM)$	3	3 mM*
GB-01 [10 μM]	1	0,2 μM
GB-02 [10 μM]	1	0,2 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,5	2,5 Einheiten
DMSO	5	10 %
Gesamtvolumen Mastermix	45	

* Konzentrationsangabe enthält auch die im 10 X Reaktionspuffer enthaltene Menge an MgCl₂

Tab. 12: Temperaturprogramm für die PCR

Schritt	1	2	3	4
Denaturieren	1` 94 °C	80" 94 °C		
Annealing		90" 54 °C		
Synthese		90" 72 °C	6` 72 °C	4 °C
Zyklen	1	35	1	

Zur Durchführung der Nukleinsäureisolierung mit den verschiedenen Extraktionskits wurden zusätzlich folgende Materialien benötigt:

⁸³ Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, D-72076 Tübingen

- DEPC-Wasser (s. Anhang)
- Carrier-RNA (Poly rA)⁸⁴
- Carrier Suspension (aus InViSorb Twin Prep DNA/RNA⁸⁵)
- Tischzentrifuge⁸⁶
- Eppendorf-Tubes (1,5 ml)⁸⁷
- Thermoblock⁸⁸

a) InViSorb Spin DNA Micro Kit III⁸⁹ (Protokoll IV)

Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei die Nukleinsäuren mit 100 μ l DEPC-Wasser anstatt des Elution-Buffer-D eluiert wurden.

b) InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Sonderprotokoll, Batchverfahren)

Nach Absprache mit dem Hersteller wurden 500 μ l Virussuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 1 ml Lysis-Buffer-D überführt, gevortext und für ca. 30 min. bei RT inkubiert. Danach wurden 15 μ l Carrier-Suspension hinzupipettiert, kurz gevortext und 5 min. bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert (9300 x g, 10 s), der Überstand verworfen und das Carrier-Pellet nach Zugabe von 800 μ l Wash-Buffer durch Vortexen resuspendiert. Nach kurzem Anzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde der Waschschritt wiederholt. Danach wurde nochmals anzentrifugiert und der Waschpuffer sorgfältig abpipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde bei geöffnetem Deckel im Thermoblock bei 60 °C für 2 min. inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l DEPC-Wasser (60 °C) und vollständigem Resuspendieren des Carrier-Pellets mittels Pipette wurde der Ansatz nochmals bei 60 °C für 5 min. inkubiert. Abschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 16100 x g 1 min. zentrifugiert und der nukleinsäurehaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt.

c) QIAamp DNA Mini Kit⁹⁰:

Die Nukleinsäureextraktion wurde in Anlehnung an das Protokoll Blood-and-Body-Fluid-Spin-Protokol (mitgeliefertes Handbuch) durchgeführt. Im ersten Reaktionsschritt wurden 200 μ l Probe zu 20 μ l Proteinase K pipettiert. Anschließend wurden 200 μ l AL-Puffer mit Carrier-RNA hinzugegeben und gevortext. Die folgenden Arbeitsschritte (4 bis 10) wurden wie im Handbuch beschrieben durchgeführt.

d) High Pure Viral Nucleic Acid Kit⁹¹:

Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

⁸⁴ Quiagen, D-40724 Hilden, Art. Nr. 1000606

⁸⁵ InViTek, D-13125 Berlin-Buchen, Art. Nr. 10703001

⁸⁶ Eppendof, Centrifuge 5415 D, D-22331 Hamburg

⁸⁷ Tab Top Microcentrifuge Tubes, Sorenson, 6507 South West Salt Lake City, Utah 84107 USA, Art. Nr. 16130

⁸⁸ Digi-Block, Laboratory Devices INC., Box 6402, Hollistone, Ma 01746-6402, USA

⁸⁹ InViTek, D-13125 Berlin-Buchen, Art. Nr. KNSP 4010025 III

⁹⁰ Quiagen, D-40724 Hilden, Art. Nr. 51399

⁹¹ Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Art. Nr. 1858874

e) Phenol-Chloroform RNA-Extraktion:

Reagenzien für die Phenol-Chloroform Extraktion von RNA:

- GITC-Extraktionspuffer (s. Anhang)
- Roti-Phenol/Chloroform⁹²
- Isopropanol⁹³
- Natriumacetat-Puffer (s. Anhang)
- Ethanol (70 % in DEPC-Wasser)

Es wurden 500 μ l GITC-Extraktionspuffer mit 200 μ l Virussuspension und 500 μ l Roti-Phenol/Chloroform in ein Eppendorf-Tube pipettiert, unter Schwenken 5 min. bei RT inkubiert und anschließend 10 min. auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation (5 min., 1080 x g) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Tube überführt. Die Fällung erfolgte, indem Natriumacetat-Puffer mit einer Endkonzentration von 0,3 M und 500 μ l Isopropanol hinzupipettiert wurde. Die Inkubation betrug mind. 1 h bei -20 °C. Danach wurde der Ansatz 20 min., bei 4 °C und 9660 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 μ l Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde zentrifugiert, (10 min., 11300 x g), der Überstand wieder dekantiert und das Pellet nach vollständigem Trocknen bei RT in 20 μ l DEPC-Wasser aufgenommen.

Nach Auswertung aller Vorversuche zur Extraktion wurde die Isolierung der Nukleinsäuren aller Luftkeimproben mit dem High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit durchgeführt. Um sowohl die Inhibition als auch die erfolgreiche Extraktion und RT-Reaktion in den Umweltproben zu überprüfen, wurde allen Proben vor der Extraktion ein Virusstandard zugefügt. Hierzu wurde die gesamte Probenmenge von 200 μ l in die bereits vorbereiteten Reaktionsgefäße mit jeweils 10 μ l Equinem-Rhinovirus (2 x 10⁴ KID₅₀) überführt und sorgfältig gevortext.

3.3.5 Vorversuch zum Einsatz von Hybridisierungssonden

In einem ersten Vorversuch wurde die Empfindlichkeit des molekularbiologischen Erregernachweises unter Verwendung von Hybridisierungssonden mit dem LightCycler-DNA-Master-Hybridization-Probes-Kit am Equinen-Rhinovirus exemplarisch untersucht. Die Primer und Hybridisierungssonden wurden mit dem Programm Vector NTI⁹⁴ ausgewählt und unter Verwendung der Datenbank (BLAST⁹⁵) auf ihre Spezifität getestet. Zusätzlich wurden alle Primer und Sonden auf die Bildung von Primerdimeren⁹⁶ überprüft.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment- länge [bp]
Rhi-se	CAAATGGATGTGTCGCTCAGTG	2660-2681	272
Rhi-as	TCAGATGGGGAAGAATAAGGCA	2931-2910	212
Rhi-LC	LC Red640-TGTGTGGGGATGTTGGCCTCAATTCT ph	2869-2893	
Rhi-FL	CGACGAAGCTATGGCATGCATTCAT X	2842-2862	

 Tab. 13: Sequenzen der verwendeten Primer und Hybridisierungssonden

^a Equines-Rhinovirus type 1 genomic sequence (X 96870)

⁹² Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. A 156.1

⁹³ Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 6752.2

⁹⁴ Vector NTI, Molecular Biology Software Version 5.0 for Windows 95, Infor Max, Inc., North Bethesda, MD 20852 USA

⁹⁵ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi

⁹⁶ http://www. williamstone.com/primers/calculator/calculator.cgi

Aus einer Virussuspension mit $10^{8,5}$ KID₅₀/ml wurde die RNA extrahiert und sofort in die RT-Reaktion eingesetzt. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-5}) angelegt, indem 90µl DEPC-Wasser vorgelegt wurden. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 µl cDNA zu nachfolgend beschriebenem Prämix hinzupipettiert und im LightCycler amplifiziert. Der Mastermix, ohne Zugabe von cDNA, wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und war wie folgt zusammengesetzt:

Primer (Rhi-se/Rhi-as)	je 0,5 μM
Hybridisierungssonden (Rhi-LC/Rhi-FL)	je 0,2 µM
MgCl ₂	4 mM
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes	1-fach konzentriert
Wasser	ad 20 µl

Die Amplifikation wurde entsprechend den im Kit vorgeschlagenen Konditionen (3.3 Experimental-Protocol) durchgeführt. Abweichend wurde im Programmteil 2 (Amplifikation) im Segment 3, in Abhängigkeit der Fragmentlänge, eine Inkubation von 11 sec. gewählt. Zur Kontrolle wurden die Amplifikate auf ein 1,5 %iges Agarosegel übertragen (s. 3.3.3).

3.3.6 Etablierung und Optimierung der nested-PCR

Im folgenden Abschnitt werden die Versuche, die zur Optimierung der Nachweissysteme durchgeführt wurden, beschrieben. Im Einzelnen betraf dies die Auswahl der Primer, die erste PCR im Thermocycler und die nested-PCR unter Anwendung der "*real-time PCR*" mit dem LightCycler. Außerdem wurde die Sensitivität der nested-PCR bestimmt. Abschließend wird das endgültig verwendete Protokoll zum Nachweis der verschiedenen Erreger aufgeführt.

3.3.6.1 Equines-Rhinovirus

Um Informationen über eine mögliche Inhibition des molekularbiologischen Nachweises aus den Umweltproben zu erhalten, wurden alle zu untersuchenden Proben mit einem RNA-Virus versetzt. Die Wahl fiel auf das Equine-Rhinovirus. Die Primer für die nested-PCR wurden mittels Vector NTI ausgewählt und gegen die Datenbank getestet. Des Weiteren wurden sie auf die Bildung von Primerdimeren überprüft.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment länge [bp]
Rhi-se	CAAATGGATGTGTCGCTCAGTG	2660-2681	272
Rhi-as	TCAGATGGGGAAGAATAAGGCA	2931-2910	212
N-Rhi-se	AATTGCATGGCACTTATGTGGC	2688-2709	212
N-Rhi-as	GAATGCAGAATTGAGGCCAACA	2899-2878	212

Tab. 14: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Equines-Rhinovirus type 1 genomic sequence (X 96870)

3.3.6.1.1 Optimierung der ersten PCR

Zur Optimierung der ersten PCR wurden unterschiedliche Annealingtemperaturen gewählt. Der Vorversuch wurde im 50 µl Ansatz durchgeführt, der folgendes enthielt:

Reaktionspuffer	1-fach konzentriert
dNTPs	je 200 µM
Primer (Rhi-se/Rhi-as)	je 0,5µM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten
DEPC-Wasser	ad 50 µl

Es wurden vier PCR-Hütchen mit je 47 μ l des oben beschriebenen Mastermixes vorbereitet. Anschließend wurden zu drei Ansätzen 3 μ l cDNA hinzupipettiert. Das vierte Hütchen enthielt nur den Prämix und diente als Negativkontrolle. Das Template wurde gewonnen, indem die Nukleinsäureextraktion aus einer Rhinovirussuspension mit 10⁴ KID₅₀/ml und anschließender RT-Reaktion durchgeführt wurde.

Die Reaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil gestartet:

a) 2 min. bei 94 °C Denaturierungsphase

b) 1 min. bei 94 °C Denaturierung

c) 1,5 min. bei 50 °C, 55 °C bzw. 60 °C Primerbindung (Annealing)

d) 1,5 min. bei 72 °C Polymerisierung (Elongation)

e) 5 min. bei 72 °C Endphase

f) Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme

Die Schritte b) bis d) wurden 30x wiederholt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 1,5 %igen Agarosegel (s. 3.3.3).

3.3.6.1.2 Virusnachweis und Bestimmung der Sensitivität mit SYBR Green I

Um die Sensitivität der nested-PCR unter Verwendung des LightCycler-DNA Master SYBR Green I Kits zu bestimmen, wurde aus vier Virussuspensionen mit den Titern 10^1 , 10^2 , 10^3 und 10^4 KID₅₀/ml die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die erste PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. 3.3.6.1.1.). Die zweite PCR wurde im LightCycler durchgeführt, indem 2 µl der ersten PCR in den nachfolgenden Prämix eingesetzt wurden. Als Negativ-kontrolle wurden 2 µl der Negativkontrolle aus der ersten PCR Reaktion pipettiert.

Zusammensetzung des Mastermixes:

Primer (N-Rhi-se/N-Rhi-as)	je 0,5 μM
MgCl ₂	4 mM
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	1-fach konzentriert
Wasser	ad 20µl

Die PCR-Bedingungen wurden in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll (3.3 Experimental-protocol) programmiert. Im Folgenden sind lediglich die Veränderungen dargestellt:

Programm 1: Denaturierung für 2 min. bei 95 °C

Programm 2: Amplifikation für 50 Zyklen, Segment 2 Inkubation für 10 sec.

Programm 3: Schmelzkurvenanalyse Segment 2 Inkubation für 10 sec.

Programm 4: Abkühlphase Segment 1 Inkubation für 1 min.

Zusätzlich wurden die Amplifikate der ersten und zweiten PCR im 1,5 %igen Gel detektiert (s. 3.3.3).

3.3.6.1.3 Optimierung der zweiten PCR

In einem Versuch sollte überprüft werden, ob die im Protokoll des Herstellers empfohlene MgCl₂-Konzentration von 4 mM geeignet ist, oder ob sie sich noch optimieren ließ. Es wurden 2 μ l der ersten PCR aus dem Vorversuch zur Annealingtemperatur bei 55 °C (s. 3.3.6.1.1) als Template eingesetzt. Die zweite PCR wurde entsprechend den Angaben im Vorversuch zum Nachweis mit SYBR-Green-I durchgeführt, mit Ausnahme der MgCl₂-Konzentrationen, die 2, 3 bis 8 mM betrugen. Die Negativkontrolle wurde mit 8 mM angesetzt. Die Produkte wurden im 1,5 %igen Agarosegel kontrolliert (s. 3.3.3).

3.3.6.1.4 Etablierung des Spikes und des Standards

Zur Etablierung des externen Standards wurden vier Ansätze hergestellt:

Ansatz 1: 200 μ l DMEM und 10 μ l Equines-Rhinovirus mit 2 x 10⁴ KID₅₀

Ansatz 2: 200 μ l DMEM und 10 μ l Equines-Rhinovirus mit 2 x 10³ KID₅₀

Ansatz 3: 200 μ l DMEM und 10 μ l Equines-Rhinovirus mit 2 x 10² KID₅₀

Ansatz 4: 200 μ l DMEM und 10 μ l Equines-Rhinovirus mit 2 x 10¹ KID₅₀

Aus den Ansätzen 1 bis 4 wurde die Nukleinsäure extrahiert und in die RT-Reaktion eingesetzt. Anschließend wurden sie in die erste PCR (Mastermix s. 3.3.6.1.1) eingesetzt, wobei das Temperaturprofil nach folgenden Angaben gestartet wurde:

a) 1 min. bei 94 °C Denaturierungsphase

b) 30 sec. bei 94 °C Denaturierung

c) 30 sec. bei 55 °C Annealing

d) 1,5 min. bei 72 °C Elongation

e) 5 min. bei 72 °C Endphase

f) Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme

Die Schritte b) bis d) wurden 20x wiederholt.

Die zweite PCR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (s. 3.3.6.1.2). Sowohl in der ersten als auch in der zweiten PCR wurde der Mastermix ohne Template als Negativkontrolle mitgeführt. Zur weiteren Optimierung wurden die Amplifikate der ersten PCR der Ansätze 1 bis 4 mit DEPC-Wasser 1:2 verdünnt. Die zweite PCR wurde mit 2 μ l Template und dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt nur Prämix.

Zusammensetzung des Mastermixes:

Primer (N-Rhi-se/N-Rhi-as)	je 0,5 µM
MgCl ₂	4 mM
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	1-fach konzentriert
Wasser	ad 20µl

Der PCR-Lauf der zweiten PCR wurde in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Profil programmiert. Im Folgenden sind nur die Änderungen aufgeführt:

Programm 1: Enzymaktivierung und Denaturierung für 10 min. bei 95 °C Programm 2: Amplifikation für 22 Zyklen, Segment 2 Inkubation für 10 sec. Programm 4: Abkühlphase Segment 1 Inkubation für 1 min.

Die 1:2 Verdünnungen der Amplifikate der ersten PCR der Ansätze 1 bis 3 wurden bei -20 °C gelagert und zur Überprüfung der Inhibition als externer Standard verwendet. Zum Spiken der Luftproben wurden 168 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 10 μ l Equinem-Rhinovirus (2 x 10⁴ KID₅₀) befüllt und bei -80°C zwischengelagert.

3.3.6.1.5 Endgültiges Protokoll der nested-PCR

Zur Untersuchung der Luftproben wurden 3 μ l der cDNA mit 47 μ l Mastermix (s. Tab. 15) gemischt und nach nachfolgendem Temperaturprogramm inkubiert. Alle Negativkontrollen der RT-Reaktion wurden ebenfalls als Prozesskontrollen mitgeführt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Amplifikate bei -20 °C gelagert.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	24	
5 X Reaktionspuffer	10	1-fach
dNTP-Mix [je 1,25 mM]	8	0,2 mM
Rhi-se [10 μM]	2,5	0,5 μΜ
Rhi-as [10 μM]	2,5	0,5 μΜ
Taq-DNA-Polymerase	0,5	2,5 Einheiten
Gesamtvolumen Mastermix	47	

Tab. 15: Pipettierschema f ür die ersten PCR

Tab. 16: Temperaturprogramm für die ersten PCR

Schritt	1	2	3	4
Denaturieren	1` 94 °C	30" 94 °C		
Annealing		30" 55 °C		
Synthese		90" 72 °C	5` 72 °C	4 °C
Zyklen	1	20	1	

Die zweite PCR wurde im LightCycler durchgeführt. Es wurden 2 μ l der Amplifikate aus der ersten PCR als Template eingesetzt. Außer den Prozesskontrollen wurde je Lauf eine Kapillare Mastermix als Negativkontrolle für die Reaktion im LightCycler mitgeführt. Für die Quantifizierung wurden pro Lauf drei Kapillaren mit je 2 μ l des hergestellten Standards 1-3 pipettiert (s. 3.3.6.1.4 Etablierung des Spikes und Standards). Die Zusammensetzung des Mastermixes (Tab. 17) und die Temperaturprogramme (Tab. 18 und 19) sind nachfolgend zu entnehmen. Um die nachfolgende Quantifizierung, anhand der unter den spezifischen Peaks befindlichen Flächen, vornehmen zu können, wurde das PCR Produkt einer zweiten Schmelzkurvenanalyse unterzogen. In dieser Darstellung können unspezifische Produkte ausgeblendet werden.

 Tab. 17: Pipettierschema f
 ür die zweite PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	11,6	
MgCl ₂ [25 mM]	2,4	4 mM
N-Rhi-se [10 μM]	1	0,5 µM
N-Rhi-as [10 μM]	1	0,5 µM
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2	1-fach
Gesamtvolumen Mastermix	18	

Enzymaktivierung und Denaturierung für 10 min bei 95 °C				
Amplifikation für 22	Zyklen, Typ Quantifizi	erung, Gains F1=5		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3	
Temperatur [°C]	95	55	72	
Inkubation [sec]	15	10	10	
Slope [°C/sec]	20	20	20	
Messung	keine	keine	einfach	
Schmelzkurvenanaly	se, Typ Schmelzkurve,	Gains F1=5		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3	
Temperatur [°C]	95	65	95	
Inkubation [sec]	0	15	0	
Slope [°C/sec]	20	20	0,1	
Messung	keine	keine	kontinuierlich	
Abkühlphase für 1 min bei 40 °C				

Tab. 18: Temperaturprogramm	für	die	zweite	PCR
-----------------------------	-----	-----	--------	-----

Tab.	19: Tem	peraturpro	ogramm fi	ir die	zweite	Schmel	zkurven	analyse
	1/1 10111	peratarpre	- <u>B</u>	AI 6410	2000100	Semie:		and joe

Schmelzkurvenanalyse, Typ Schmelzkurve, Gains F1=5					
	Segment 1	Segment 2	Segment 3		
Temperatur [°C]	95	80	95		
Inkubation [sec]	0	30	0		
Slope [°C/sec]	20	20	0,1		
Messung	keine	keine	kontinuierlich		
Abkühlphase für 1 min bei 40 °C					

3.3.6.2 Humane Enteroviren

Die Sequenzen der Primer für die erste PCR wurden aus der Veröffentlichung von SCHWEI-GER et al. (1994) entnommen. Zur Primerwahl für die zweite PCR wurden zahlreiche Sequenzen von unterschiedlichen humanen Enteroviren miteinander verglichen (AlignX⁹⁷), die Primer innerhalb der homologen Sequenzabschnitte mit Vector NTI ausgewählt und unter Verwendung der Datenbank auf ihre Spezifität getestet. Des Weiteren wurden alle Primer auf die Bildung von Primerdimern überprüft. Alle Vorversuche zur Optimierung der zweiten PCR wurden mit dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I durchgeführt.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment- länge [bp]
EV-L	CAAGCACTTCTGTTTCCCC	68-76	125
EV-R	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	502-483	455
EVI-1	GTGY*GAAGAGY*CTATTGAGC	319-338	1/12
EVI-2	GGACACCCAAAGTAGTCGG	461-443	145

Tab. 20: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Poliovirus (AF 065158)

^{*}degenerierte Basen: Y=C/T

⁹⁷ Multiple Sequenze Alignment, Molecular Biology Software Version 1.0 for Windows 95, Infor Max, Inc., North Bethesda, MD 20852 USA

3.3.6.2.1 Optimierung der ersten PCR

Hierzu wurden aus einer Virussuspension mit 10^4 KID₅₀/ml Polio Sabin S die Nukleinsäure extrahiert und in die RT-Reaktion eingesetzt. Der erste Versuch wurde durchgeführt, um die beste Annealingtemperatur für die erste PCR zum Nachweis von humanen Enteroviren zu ermitteln. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend dem Protokoll zur Optimierung der Annealingtemperatur der ersten PCR für das Equine-Rhinovirus durchgeführt (s. 3.3.6.1.1). Abweichungen betrafen nur die beiden eingesetzten Primer EV-L und EV-R.

Da in der Veröffentlichung von SCHWEIGER et al. (1994) keine MgCl₂-Konzentration für die PCR-Reaktion angegeben ist, musste sie in einem weiteren Vorversuch bestimmt werden. Es wurden 3 μ l cDNA in die erste PCR eingesetzt, wobei der Mastermix unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen enthielt, die durch Zugabe einer 25 mM MgCl₂-Stocklösung erreicht wurden. Es wurden die Endkonzentrationen 1,5, 2, 2,5 und 3 mM untersucht. Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 55 °C gefahren. Die restlichen Parameter der PCR entsprachen dem ersten Versuch. Die Detektion der Amplifikate erfolgte für beide Versuche im 1,5 %igen Agarosegel (s. 3.3.3).

3.3.6.2.2 Optimierung der zweiten PCR und Bestimmung der Sensitivität

Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration wurden zwei Versuche angesetzt. Für den ersten Versuch wurde aus einer Virussuspension mit 10³ KID₅₀/ml Polio Sabin S die RNA extrahiert. Nach der RT-Reaktion wurde die erste PCR mit dem Mastermix und dem Temperaturprofil der endgültigen Methode (s. 3.3.6.2.4), die sich nach der Auswertung der Vorversuche zur Optimierung ergab, durchgeführt.

Die zweite PCR erfolgte mit unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen nach dem folgenden Temperaturprogramm (abermals sind nur die Veränderungen aufgelistet):

Programm 1: Denaturierung 2 min. bei 95 °C

Programm 2: Amplifikation für 20 Zyklen, Segment 2 Inkubation für 10 sec. Programm 4: Abkühlphase Segment 1 Inkubation für 1 min.

Zusammensetzung des Mastermixes:

Primer (EVI-1/EVI-2)	je 0,5 μM
MgCl ₂	2, 3 bis 8 mM
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	1-fach konzentriert
Wasser	ad 20µl

Für den zweiten Versuch wurde die Nukleinsäure aus den Ansätzen 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 KID₅₀/ml isoliert und in die cDNA umgeschrieben. Nachdem die erste PCR nach dem Protokoll unter 3.3.6.2.4 abgeschlossen war, wurde die zweite PCR aller Ansätze mit den MgCl₂-Konzentrationen 2, 3 und 4 mM nach dem oben aufgeführten Temperaturprofil gefahren.

Nachdem die Vorversuche zur MgCl₂-Konzentration ausgewertet waren, wurden die Ansätze der ersten PCR erneut in die zweite PCR eingesetzt, wobei eine Annealingtemperatur von 50 °C gewählt wurde (Profilangaben s. Tab. 23). Dieser Versuch lieferte außerdem die Information über die Sensitivität des angewandten Testsystems zum Nachweis von humanen Enteroviren.

3.3.6.2.3 Etablierung des Standards

Zur Etablierung des externen Standards für die humanen Enteroviren wurde die RNA Extraktion und anschließende RT-Reaktion aus folgenden vier Virussuspensionen durchgeführt:

- Ansatz 1: 200 μ l Polio Sabin S mit 10⁵ KID₅₀/ml
- Ansatz 2: $200 \ \mu l$ Polio Sabin S mit $10^4 \ \text{KID}_{50}/\text{ml}$
- Ansatz 3: $200 \ \mu l$ Polio Sabin S mit $10^3 \ \text{KID}_{50}/\text{ml}$
- Ansatz 4: 200 μ l Polio Sabin S mit 10² KID₅₀/ml

Die nested-PCR folgte dem unter 3.3.6.2.4beschriebenen Protokoll. Die Amplifikate der ersten PCR wurden jedoch zuvor 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die Zyklenzahl der zweiten PCR betrug 30. Die Amplifikate der ersten PCR wurden bis zur weiteren Verwendung als externer Standard bei -20 °C gelagert.

3.3.6.2.4 Endgültiges Protokoll der nested-PCR

Es wurden 3 µl cDNA mit 47 µl des in Tab. 17 beschriebenen Prämixes, unter Verwendung der Primer EV-L und EV-R, gemischt. Die Negativkontrollen der RT-Reaktion wurden als Prozesskontrollen mitgeführt. Pro Thermocycler-Lauf wurde eine Positivkontrolle mit Polio Sabin S-cDNA eingesetzt. Die erste PCR wurde nach folgendem Profil in Tab. 21 gestartet:

Tab. 21: Temperaturprogramm für die erste PCR

Schritt	1	2	3	4
Denaturieren	1` 94 °C	60" 94 °C		
Annealing		60" 55 °C		
Synthese		90" 72 °C	5` 72 °C	4 °C
Zyklen	1	20	1	

Für die zweite PCR wurden 2 μ l Template der ersten PCR in nachfolgend beschriebenen Mastermix eingesetzt und im LightCycler amplifiziert. Neben den zu untersuchenden Proben, Prozess-, Positiv- und Negativkontrollen wurden pro Lauf die Ansätze 2-4 des hergestellten Standards (s. 3.3.6.2.3) pipettiert. Die im Anschluss an das erste Temperaturprogramm durchgeführte Schmelzkurvenanalyse wurde nach dem bereits beschriebenen Programm (s. Tab. 19) gefahren. Zur Kontrolle wurden alle im LightCycler positiv erscheinenden Amplifikate in ein 1,5 %iges Agarosegel eingesetzt (s. 3.3.3).

 Tab. 22: Pipettierschema f
 ür die zweite PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	13,2	
MgCl ₂ [25 mM]	0,8	2 mM
EVI-1 [10 μM]	1	0,5 µM
EVI-2 [10 μM]	1	0,5 µM
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2	1-fach
Gesamtvolumen Mastermix	18	

Enzymaktivierung und Denaturierung für 10 min bei 95 °C					
Amplifikation für 26	Zyklen, Typ Quantifizio	erung, Gains F1=5			
	Segment 1	Segment 2	Segment 3		
Temperatur [°C]	95	50	72		
Inkubation [sec]	15	10	7		
Slope [°C/sec]	20	20	20		
Messung	keine	keine	einfach		
Schmelzkurvenanaly	se, Typ Schmelzkurve,	Gains F1=5			
	Segment 1	Segment 2	Segment 3		
Temperatur [°C]	95	55	95		
Inkubation [sec]	0	15	0		
Slope [°C/sec]	20	20	0,1		
Messung	keine	keine	kontinuierlich		
Abkühlphase für 1 mi	in bei 40 °C				

Tab. 23: Temperaturprogramm	für	die	zweite	PCR
-----------------------------	-----	-----	--------	-----

3.3.6.3 Protokoll der Poliovirus nested-PCR

Der spezifische Nachweis von Poliovirus wurde im Zusammenhang einer anderen Fragestellung in Vorversuchen optimiert und weist eine rechnerische Sensitivität von 10^{-2} Äq. KID₅₀/ml auf. Die hierzu verwendeten Primersequenzen wurden aus der Publikation von SCHWEIGER et al. (1994) entnommen und sind in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Sequenzen der verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment länge [bp]	
EV-L	CAAGCACTTCTGTTTCCCC	68-76	125	
EV-R	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	502-483	433	
EVI-3	TGTTGTATAGACTGCTTGCGT	92-112	282	
EVI-4	TTAGCCGCATTCAGGGGCCGGAGGA	373-349	282	

^a Poliovirus (AF 065158)

Die erste Amplifikation erfolgte nach dem unter 3.3.6.2.4 Protokoll. Neben den Proben wurden pro Thermocycler-Lauf eine Positivkontrolle (Polio Sabin S-cDNA) und eine Negativkontrolle (Mastermix) pipettiert. Für die zweite PCR wurden 2 μ l der ersten Reaktion in den in Tab. 27 beschriebenen Mastermix eingesetzt. Abweichend wurden die Primer EVI-3 und RVI-4 verwendet. Die Reaktion wurde nach dem in Tab. 23 aufgeführten Protokoll im LightCycler durchgeführt. Alle Amplifikate wurden anschließend zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.3.3). Eine Quantifizierung der PCR-Produkte wurde nicht durchgeführt.

^{*}degenerierte Basen: Y=C/T

3.3.6.4 Hepatitis A-Virus

Für den Nachweis von Hepatitis A-Virus wurden sowohl die Sequenzen der Primer als auch die Annealingtemperatur (55 °C) und MgCl₂-Konzentration (3 mM) für die erste PCR aus der Veröffentlichung von GILGEN et al. (1997) entnommen.

Tab.	25:	Sequenzen	der	verwendeten	Primer
------	-----	-----------	-----	-------------	--------

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment länge [bp]	
HAV-1	TTTGGTTGGATGAAAATGGTT	6305-6325	412	
HAV-4	ATTCTACCTGCTTCTCTAATC	6716-6696	412	
HAV-2	CAACCTGTCCAAAAGATGAAT	6416-6436	222	
HAV-3	ACCAACATCTCCGAATCTTA	6648-6629	233	

^a Hepatitis A-Virus (M 59808)

Für die beiden durchgeführten Vorversuche wurde die Konzentration der eingesetzten Virussuspension am Max von Pettenkofer Institut⁹⁸ durch serielle Verdünnungen und anschließende nested-PCR bestimmt. Es ergab sich dabei ein Titer von etwa 5 x 10^7 bis 5 x 10^8 Genkopien/ml.

3.3.6.4.1 Optimierung der zweiten PCR

Die MgCl₂-Konzentration für die zweite PCR musste für den Nachweis im LightCycler angepasst werden. Aus der Virussuspension wurde die Nukleinsäure extrahiert und in die cDNA umgeschrieben. Die im Anschluss daran durchgeführte erste PCR erfolgte nach dem für Equines-Rhinovirus angewandten Temperaturprofil (s. Tab. 16).

1-fach konzentriert
je 200 µM
je 0,5µM
2,5 Einheiten
ad 50 µl

Die zweite PCR wurde für 40 Zyklen nach dem Programm s. Tab. 18 und den verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen mit nachfolgendem Prämix gestartet:

Primer (HAV-2/HAV-3) MgCl₂ LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Wasser je 0,5 μM 2, 3 bis 8 mM 1-fach konzentriert ad 20μl

3.3.6.4.2 Bestimmung der Sensitivität

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Testsystems wurde aus der cDNA des vorangegangenen Versuchs eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -6) angelegt, indem 9 µl DEPC-Wasser vorgelegt wurden. Die nested-PCR wurde nach der endgültig verwendeten Methode durchgeführt (s. 3.3.6.4.3).

⁹⁸ Max von Pettenkofer Institut, Lehrstuhl Virologie, D-80336 München

3.3.6.4.3 Endgültiges Protokoll der nested-PCR

Für den Nachweis von Hepatitis A-Virus wurden 3 µl cDNA in die erste PCR eingesetzt, deren Mastermix nachfolgend dargestellt ist. Das Temperaturprofil entsprach dem zum Nachweis der Inhibitionskontrolle (s. Tab. 16). Außer den Proben wurden wieder die Prozesskontrollen und eine Positivkontrolle pipettiert.

1 ab. 20. I ipetiteisenema fui die eiste i eist	Tab.	26:	Pipettiers	schema	für	die	erste	PCR
--	------	-----	------------	--------	-----	-----	-------	-----

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	21	
5 X Reaktionspuffer	10	1-fach
MgCl ₂ [25 mM]	3	3 mM*
dNTP-Mix [je 1,25 mM]	8	0,2 mM
HAV-1 [10 μM]	2,5	0,5 µM
HAV-4 [10µM]	2,5	0,5 μΜ
Taq-DNA-Polymerase	0,5	2,5 Einheiten
Gesamtvolumen Mastermix	47	

* Konzentrationsangabe enthält auch die im 10X Reaktionspuffer enthaltene Menge an MgCl₂

In den LightCycler wurden 2 μ l aller Amplifikate der ersten PCR eingesetzt und nach dem Temperaturprogramm zum Nachweis des Equinen-Rhinovirus (s. Tab. 18) für 27 Zyklen amplifiziert. Ein Standard entfiel bei diesem Erregernachweis.

Tab. 27: Pipettierschema f
 ür die zweite PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	12,4	
MgCl ₂ [25 mM]	1,6	3 mM
HAV-2 [10 μM]	1	0,5 µM
HAV-3 [10 μM]	1	0,5 µM
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2	1-fach
Gesamtvolumen Mastermix	18	

3.3.6.5 Hepatitis B-Virus

Die Primer für die nested-PCR wurden entsprechend der Publikation von KANEKO et al. (1989) gewählt. Die erste PCR wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von DOUGLAS et al. (1993) durchgeführt und ist im Abschnitt der endgültigen Methode (s. 3.3.6.5.3) dargestellt.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment länge [bp]	
1763	GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA	1765-1794	270	
2032-R	CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT	2034-2005	270	
1778	GACGAATTCCATTGACCCGTATAAAGAATT	1771-1800	259	
2017-R	ATGGGATCCCTGGATGCTGGGTCTTCCAAA	2028-1999	238	

 Tab. 28: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Hepatitis B-Virus (NC 001707)

Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration der zweiten PCR und zur Bestimmung der Sensitivität des Testsystems wurde der Eurohep Standard No 1, Genotype A (adw2)⁹⁹ mit einer Konzentration von 2,7 x 10⁹ Moleküle/ml verwendet. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -9) des Standardserums angelegt, indem mit 900 μ l DEPC-Wasser vorgelegt wurde. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurde jede Verdünnung für 15 min. bei 4 °C über Kopf geschwenkt. Im Anschluss daran wurde die DNA extrahiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.6.5.1 Optimierung der zweiten PCR

Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration für die Amplifikation im LightCycler wurde mit der DNA der Verdünnung -5 gearbeitet. Nachdem die erste PCR, wie unter 3.3.6.5.3 beschrieben, durchgeführt war, wurde die zweite PCR mit den unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen angesetzt und für 20 Zyklen nach dem Temperaturprofil unter 3.3.6.5.3 amplifiziert.

Primer (1778-1/2017-R) MgCl₂ LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Wasser je 0,5 μM 2, 3 bis 8 mM 1-fach konzentriert ad 20μl

3.3.6.5.2 Bestimmung der Sensitivität

Die nested-PCR wurde mit der DNA der Verdünnungen -3 bis -8 des Eurohep Standards nach dem endgültig verwendeten Protokoll zum Nachweis von Hepatitis B-Virus (s. 3.3.6.5.3) durchgeführt. Die Amplifikate der zweiten PCR wurden zusätzlich im 1,5 %igen Agarosegel überprüft (s. 3.3.3).

3.3.6.5.3 Endgültiges Protokoll der nested-PCR

Zum Nachweis des Hepatitis B-Virus wurden 5 μ l der isolierten Nukleinsäure mit 45 μ l Prämix gemischt und im Thermocycler, wie bereits für die humanen Enteroviren beschrieben (s. 3.3.6.2.4), amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde etwa 1 Kopie/PCR Ansatz Eurohep Standard mitgeführt.

⁹⁹ Georg-August-Universität Göttingen, Medizinische Mikrobiologie, D-37075 Göttingen

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	20,5	
5 X Reaktionspuffer	10	1-fach
dNTP-Mix [je 1,25 mM]	8	0,2 mM
MgCl ₂ [25 mM]	1,5	2,5 mM*
1763	2,5	0,5 µM
2032-R	2,5	0,5 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,5	2,5 Einheiten
Gesamtvolumen Mastermix	45	

Tab. 29: Pipettierschema f
 ür die erste PCR

* Konzentrationsangabe enthält auch die im 10 X Reaktionspuffer enthaltene Menge an MgCl₂

Die zweite PCR wurde mit allen Amplifikaten der ersten PCR durchgeführt, wobei der Mastermix entsprechend dem Protokoll zum Nachweis von Hepatitis A-Virus (s. Tab. 27) mit einer MgCl₂-Konzentration von 3 mM vorbereitet wurde. Bei diesem Nachweis wurde kein Standard pipettiert. Die Software des LightCyclers wurde entsprechend dem Profil in Tab. 18 programmiert, wobei die Amplifikation 30 Zyklen und im Segment 3 die Inkubation 15 sec. betrug.

3.3.6.6 Rotaviren

Zur Etablierung des Nachweises von humanen Rotaviren der Gruppe A wurden zahlreiche Primer verwendet. Die Sequenzen der Primer RV-1 bis RV-4 wurden einer Veröffentlichung von GILGEN et al. (1997) entnommen. Die restlichen Primer wurden nach einem Sequenzvergleich der VP7 Region unterschiedlicher Rotaviren in den homologen Bereichen gewählt. Alle Sondenpaare wurden in Hinsicht möglicher Dimerenbildung getestet. Ebenfalls erfolgte die Überprüfung der Spezifität unter Verwendung der Datenbank.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a
RV-2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	3-27
RVA-1	GGTATTGAATATACCACAATTC	55-76
RVA-3	AATGTATGGTATTGAATATACC	48-69
RV-3	TGTATGGTATTGAATATACCAC	50-71
RVI-1	TGAR*TGGTTATGY*AAY*CCM*ATGGA	531-554
RV-1	GTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1061-1036
RVA-2	Y*AAY*GATCTY*GATCTTTTGGAC	999-978
RVI-2	GCCACCAY*Y*TTTTCCAR*TTCAC	928-907
RV-4	ACTGATCCTGTTGGCCAW*CC	395-376

Tab. 30: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Human WA Rotavirus (K 02033)

*degenerierte Basen: W=A/T Y=C/T M=A/C R=A/G

Im folgenden Abschnitt sind die Vorversuche, die zur Etablierung des Testsystems durchgeführt wurden, beschrieben. In einer ersten Versuchsreihe wurden die von GILGEN et al. (1997) veröffentlichen Primer und PCR Bedingungen angewandt. In einer zweiten Reihe wurden die restlichen Sonden überprüft. Abschließend wurden alle Primerkombinationen miteinander verglichen und die PCR mit den besten Sondenpaaren optimiert.

3.3.6.6.1 Optimierung der PCR aus der Literatur und Bestimmung der Sensitivität

Im folgenden wurde die Sensitivität des Nachweises mit den von GILGEN et al. (1997) veröffentlichten Primern (RV-1 bis RV-4) überprüft, Versuche zur Optimierung durchgeführt und die zweite Amplifikation auf die Reaktion im LightCycler angepasst.

3.3.6.6.1.1 Optimierung der ersten PCR

Die Sensitivität der ersten PCR wurde untersucht, indem die Nukleinsäuren der Virussuspensionen 10^4 , $10^{5,5}$, $10^{6,5}$ und $10^{7,5}$ KID₅₀/ml isoliert und nach der RT-Reaktion mit dem Primer RV-1 in den nachfolgenden Prämix eingesetzt wurden.

1-fach konzentriert
je 200 µM
je 0,5µM
2,5 Einheiten
ad 50 µl

Das Temperaturprofil wurde entsprechend der Veröffentlichung programmiert:

a) 1 min. bei 94 °C Denaturierungsphase

b) 30 sec. bei 94 °C Denaturierung

c) 30 sec. bei 55 °C Annealing

d) 1 min. bei 72 °C Elongation

e) 5 min. bei 72 °C Endphase

f) Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme

Die Schritte b) bis d) wurden 25x wiederholt.

Im Anschluss daran wurden Versuche zur Optimierung des Temperaturprogramms durchgeführt. Dazu wurde der Versuch wiederholt, wobei eine Annealingtemperatur von 50 °C gewählt wurde. In einer weiteren Wiederholung wurde das

Temperaturprofil mit 55 °C und Zeitverlängerung während der Elongation ("*timeincrement*") gefahren:

a) 1 min. bei 94 °C Denaturierungsphase

b) 1 min. bei 94 °C Denaturierung

c) 1,5 min. bei 55 °C Annealing

d) 1,5 min. bei 72 °C Elongation, pro Zyklus zusätzlich 10 sec.

e) Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme

Die Schritte b) bis d) wurden 30x wiederholt.

Aufgrund der Ergebnisse bei der elektrophoretischen Auftrennung der Produkte der ersten PCR wurden die Amplifikate der ersten PCR (Temperaturprogramm mit "*timeincrement*") in den LightCycler mit dem LightCycler-DNA Master SYBR Green I eingesetzt. Der Mastermix war mit den Primern RV-3 und RV-4, wie unter 3.3.6.1.2, beschrieben zusammengesetzt. Die Software wurde entsprechend den vorgeschlagenen Angaben (3.3 Experimental-Protocol) programmiert. Abweichend war eine Inkubation von 14 sec. während der Amplifikation in

Segment 3. Die Amplifikate aller Versuche wurden im 1,5 %igen Agarosegel detektiert (s. 3.3.3).

3.3.6.6.1.2 Optimierung der zweiten PCR

Die Anpassung der zweiten PCR auf den LightCycler erfolgte, indem die MgCl₂-Konzentration optimiert wurde. Die RNA wurde aus den Ansätzen 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 KID₅₀/ml extrahiert und mit dem Primer RV-1 in die cDNA transkribiert.

In einem ersten Versuch wurde die cDNA des Ansatzes 10^4 KID₅₀/ml in der erste PCR mit dem Sondenpaar RV-1/RV-2 nach dem PCR-Protokoll zum Nachweis des Equinen-Rhinovirus (s. 3.3.6.1.5) amplifiziert. Die zweite PCR wurde mit den verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt 8 mM. Der verwendete Mastermix war wie folgt zusammengesetzt.

Primer (RV-3/RV-4)	je 0,5 μM
MgCl ₂	2, 3 bis 8 mM
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	1-fach konzentriert
Wasser	ad 20µ1

In einem zweiten Versuch wurde die erste PCR mit den Ansätzen 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 KID₅₀/ml wie im ersten Versuch durchgeführt. Für die zweite PCR wurde eine MgCl₂-Konzentration von 7 mM gewählt.

Das Temperaturprofil der beiden Versuche folgte, mit Ausnahme der Inkubation von 14 sec. während der Amplifikation (50 Zyklen) in Segment 3, den Herstellerangaben (3.3 Experimental-Protocol).

Aufgrund der Ergebnisse wurde ein dritter Versuch durchgeführt. Die Ansätze 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 KID₅₀/ml wurden unter Verwendung einer "*hot-start*"-PCR amplifiziert. Hierzu wurden 2 µl cDNA zu dem nachfolgend beschriebenen Mastermix pipettiert. Zu jedem Reaktionsansatz wurde eine Wachskugel gegeben und ohne Deckelheizung im Thermocycler nach dem Temperaturprogramm zum Nachweis von Enteroviren (s. Tab. 21) amplifiziert. Die Reaktion wurde jedoch mit einer ersten Inkubation bei 94 °C für 2 min. gestartet. Mastermix für die "*hot-start*"-PCR:

Mg ²⁺ freier PCR-Puffer	1-fach konzentrier
dNTPs	je 200 µM
Primer (RV-1/RV-2)	je 0,5µM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten
DEPC-Wasser	ad 50 µl

Die zweite PCR wurde, wie bereits oben beschrieben, mit den MgCl₂-Konzentrationen 4 und 7 mM gestartet.

Die Produkte der ersten PCR ("*hot-start*"-Prinzip) wurden in einem vierten Versuch unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I im LightCycler amplifiziert. Der Mastermix wurde mit den Sonden RV-3 und RV-4 nach den Angaben in Tab. 17 angesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit 65 Zyklen nach den Angaben des Herstellers (3.3 Experimental-Protocol). Die Amplifikate der Versuche drei und vier wurden zusätzlich im 1,5 %igen Agarosegel überprüft (s. 3.3.3).

3.3.6.6.2 Optimierung der PCR mit neuen Primern und Bestimmung der Sensitivität

Aufgrund der Sensitivität der RT-nested-PCR, unter Anwendung der in der Literatur beschriebenen Primer, wurden weitere Sondenpaare (RVA-1/RVA-2 und RVI-1/RVI-2) ausgewählt und zum molekularbiologischen Nachweis eingesetzt.

3.3.6.6.2.1 Optimierung der ersten PCR

Zur Optimierung der ersten PCR wurden verschiedene Annealingtemperaturen (50, 55 und 60°C) gewählt. Aus den Virussuspensionen 10^2 , 10^3 und 10^4 KID₅₀/ml wurde die Nukleinsäure isoliert und mit dem Primer RVA-2 in die RT-Reaktion eingesetzt. Die erste PCR wurde mit allen Verdünnungen durchgeführt und nach dem Temperaturprotokoll zum Nachweis von Enteroviren (s. Tab. 21) amplifiziert. Des Weiteren wurden zwei Läufe gefahren, bei denen die Annealingtemperatur 50 bzw. 60 °C betrug.

Zusammensetzung des Mastermix:

1-fach konzentriert
je 200 µM
je 0,5µM
2,5 Einheiten
ad 50 µl

Anschließend wurden die Amplifikate der ersten Läufe in die zweite PCR eingesetzt. Es wurde der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit mit den Primern RVI-1 und RVI-2 verwendet. Die PCR wurde nach dem Protokoll unter 3.3.6.1.5 durchgeführt. Abweichend war eine Elongation von 20 sec. und eine Zyklenzahl von 50 bzw. 40.

3.3.6.6.2.2 Optimierung der zweiten PCR

In einem ersten Versuch wurden für die Amplifikation von 40 Zyklen im LightCycler die Annealingtemperaturen 50, 55 und 60 °C und eine Elongation von 20 sec. gewählt. Die restlichen Angaben wurden wie bereits beschrieben (s. 3.3.6.1.5) übernommen. Als Template wurden die Amplifikate des Vorversuchs zur Annealingtemperatur der ersten PCR mit den Primern RVA-1 und RVA-2 (10^2 , 10^3 und 10^4 KID₅₀/ml, Annealing bei 60°C) in den Mastermix (s. Tab. 17) eingesetzt.

In einem zweiten Versuch wurde die MgCl₂-Konzentration zur Amplifikation im LightCycler bestimmt. Als Template wurde die erste PCR des Vorversuches zur Annealingtemperatur der ersten PCR mit den Primern RVA-1/RVA-2 verwendet (Ansatz 10^4 KID₅₀/ml, Annealing 50 °C). Der Mastermix wurde unter Verwendung der Sonden RVI-1/RVI-2 nach den Angaben zur MgCl₂-Konzentration der zweiten PCR mit den Primern RV-3 und RV-4 (3.3.6.6.1.2) angesetzt. Die Amplifikation im LightCycler folgte mit einer Elongation von 20 sec. und 30 Zyklen dem Profil in Tab. 18.

3.3.6.6.3 Auswahl neuer Primerkombinationen und Optimierung der PCR

Nach der Auswertung aller bisher durchgeführten Versuche zum Nachweis von Rotaviren wurden die verschiedenen Primer, die für eine erste PCR zur Verfügung standen, in unterschiedlichen Kombinationen untersucht. Die eingesetzte Templatemenge wurde entsprechend hoch gewählt, um eine Detektion im Agarosegel zu ermöglichen. Die Produkte der ersten PCR der effektivsten Sondenpaare wurden in einer zweiten Versuchsreihe in der zweiten PCR überprüft. Dabei wurden ebenfalls unterschiedliche Primerkombinationen zur Amplifikation eingesetzt. Die Empfindlichkeit des Nachweises mit den neuen Primerpaaren wurde bestimmt und abschließend einige Versuche zur Sensitivitätssteigerung durchgeführt.

3.3.6.6.3.1 Primerkombinationen für die erste PCR

Aus einer Virussuspension mit $10^{8,5}$ KID₅₀/ml wurde die RNA isoliert und anschließend eine log 10 Verdünnungsreihe (-1 bis -4) angelegt, indem mit 180 µl DEPC-Wasser vorgelegt wurde. Die RT-Reaktion wurde mit der Verdünnung -4 und dem Primer RV-1 angesetzt. Danach wurde die erste PCR mit 3 µl cDNA unter Verwendung der folgenden Sondenkombinationen durchgeführt. In Klammern ist die Länge des jeweiligen Amplifikates dargestellt:

Ansatz 1: RV-2 und RV-1	(1059 bp)
Ansatz 2: RV-2 und RVA-2	(997 bp)
Ansatz 3: RVA-1 und RV-1	(1007 bp)
Ansatz 4: RVA-1 und RVA-2	(945 bp)
Ansatz 5: RVA-3 und RV-1	(1014 bp)
Ansatz 6: RVA-3 und RVA-2	(952 bp)

Die PCR wurde mit dem unter 3.3.6.1.5 beschriebenen Mastermix und dem Temperaturprofil unter 3.3.6.2.4 für 30 Zyklen gefahren. Die Negativkontrolle enthielt den Prämix mit den Primern RV-2 und RV-1. Die Detektion der Amplifikate erfolgte im 1,5 %igen Gel (s. 3.3.3).

3.3.6.6.3.2 Primerkombinationen für die zweite PCR

Für die zweite PCR wurden PCR Produkte aus dem vorhergehenden Versuch verwendet. Das Protokoll der Reaktion entsprach dem ersten Versuch, wobei nur 2 μ l Template eingesetzt wurden. Folgende Primerkombinationen wurden überprüft. Für die Ansätze 1 bis 9 wurde Template der ersten PCR des Ansatzes 1 und für die beiden restlichen je 2 μ l der ersten PCR des Ansatzes 5. Die Negativkontrolle enthielt die beiden Primer RVA-3 und RV-4 und 2 μ l der Negativkontrolle der ersten PCR. Die Amplifikate wurden im 1,5 %igen Agarosegel ausgewertet (s. 3.3.3).

Ansatz 1:	RVA-1 und RV-4	(341 bp)
Ansatz 2:	RVA-3 und RV-4	(348 bp)
Ansatz 3:	RV-3 und RV-4	(346 bp)
Ansatz 4:	RVA-1 und RVI-2	(874 bp)
Ansatz 5:	RVA-3 und RVI-2	(881 bp)
Ansatz 6:	RV-3 und RVI-2	(879 bp)
Ansatz 7:	RVA-1 und RVA-2	(945 bp)
Ansatz 8:	RVA-3 und RVA-2	(952 bp)
Ansatz 9:	RV-3 und RVA-2	(950 bp)
Ansatz 10:	RVI-1 und RVI-2	(398 bp)
Ansatz 11:	RVI-1 und RVA-2	(469 bp)

Nach der Auswertung des Versuches wurden die in Frage kommenden Primerkombinationen in das LightCycler System eingesetzt. Hierzu wurde die erste PCR des Ansatzes 1 mit DEPC-Wasser verdünnt, indem 90 μ l vorgelegt wurden. Es ergaben sich die Verdünnungen A (1:10), B (1:100) und C (1:1000). Im Anschluss daran wurden die Verdünnungen A bis C mit allen drei Primerkombinationen in die zweite PCR eingesetzt. Das Pipettierschema und Temperaturprogramm folgte den Angaben unter 3.3.6.1.5 Abweichend lief die Reaktion in Segment 3 für 20 Zyklen ab, wobei die Inkubation während der Amplifikation 35 sec. betrug.

Ansatz 1:	RVA-1	und	RVI-2

- Ansatz 2: RVA-3 und RVI-2
- Ansatz 3: RV-3 und RVI-2

3.3.6.6.3.3 Bestimmung der Sensitivität

Die Empfindlichkeit des molekularbiologischen Erregernachweises mit den Sondenpaaren (RV-1/RV-2 und RVA-1/RVI-2) wurde überprüft, indem die RNA aus einer Virussuspension mit $10^{8,5}$ KID₅₀/ml isoliert und anschließend in DEPC-Wasser in einer dekadischen Verdünnungsreihe (-1 bis -6) verdünnt wurde. Es wurden 180 µl Wasser vorgelegt. Die einzelnen Verdünnungen wurden portioniert und bei -80 °C, bis zur weiteren Verwendung für alle nachfolgenden Vorversuche, gelagert.

Die RT-Reaktion der RNA-Verdünnungen -1 bis -6 wurde mit dem Primer RV-1 angesetzt. Für die erste PCR wurden 3 μ l cDNA mit dem Prämix (s. 3.3.6.6.1.1) gemischt und nach dem endgültigen Temperaturprofil amplifiziert (s. Tab. 32). Die im Anschluss daran durchgeführte zweite PCR erfolgte mit den Primern RVA-1/RVI-2 und einer MgCl₂-Konzentration von 4 mM entsprechend dem Nachweis vom Equinen-Rhinovirus (s. Tab. 17). Die Amplifikation wurde für 40 Zyklen nach dem endgültigen Temperaturprogramm gefahren (s. Tab. 33). Die PCR-Produkte der ersten PCR wurden zusätzlich im 1,5 %igen Agarosegel detektiert (s. 3.3.3). Alle nachfolgenden Versuche wurden durchgeführt, um eine mögliche Steigerung der Sensitivität zu erreichen.

3.3.6.6.3.4 Optimierung der zweiten PCR

Für den Versuch zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration und Annealingtemperatur wurde die erste PCR (Verdünnung -5 und -6) aus dem vorherigen Versuch als Template verwendet.

Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration wurde die Verdünnung -5, wie bereits beschrieben (3.3.6.6.1.2), zum Mastermix mit den unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert. Im zwei ten Versuch wurden die Verdünnungen -5 und -6 in die PCR mit 4 mM MgCl₂ (s. Tab. 17) eingesetzt. Die beiden Versuche wurden nach dem Temperaturprofil in Tab. 33 gefahren.

3.3.6.6.3.5 Erhöhung der eingesetzten Menge an Template bei der nested-PCR

In einem ersten Versuch wurde die erste PCR mit 5 μ l cDNA nach dem endgültig verwendeten Protokoll zum Nachweis von Rotaviren angesetzt (s. 3.3.6.6.4), wobei die Menge an Wasser im Prämix entsprechend verringert wurde. Als Template wurden die Verdünnungen -3 bis -6 aus dem Versuch zur Bestimmung der Sensitivität verwendet. Die im Anschluss daran durchgeführte zweite PCR folgte ebenfalls dem endgültigen PCR-Protokoll unter 3.3.6.6.4 Der Versuch wurde mit der Verdünnung -4 wiederholt, wobei die erste PCR sowohl mit 3, als auch mit 5 μ l cDNA pipettiert wurde.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die eingesetzte Templatemenge der zweiten PCR um 2 μ l auf 4 μ l erhöht. Es wurde mit den Verdünnungen -4 bis -6 der ersten PCR gearbeitet, die nach dem Protokoll der endgültigen Methode amplifiziert wurden. Die zweite PCR wurde ebenfalls nach der endgültigen Methode durchgeführt, wobei beim Ansatz mit 4 μ l Template die Menge an Wasser auf 9,6 μ l reduziert wurde. Der Versuch wurde zur Absicherung des Ergebnisses ein zweites mal wiederholt.

3.3.6.6.4 Endgültiges Protokoll der nested-PCR

Zum Nachweis von Rotaviren der Gruppe A wurden 5 μ l cDNA in nachfolgend beschriebenen Mastermix eingesetzt und entsprechend dem Temperaturprofil amplifiziert. Es wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt, die Prozesskontrollen entfielen.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	22	
5 X Reaktionspuffer	10	1-fach
dNTP-Mix [je 1,25 mM]	8	0,2 mM
RV-1 [10μM]	2,5	0,5 μΜ
RV-2 [10µM]	2,5	0,5 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,5	2,5 Einheiten
Gesamtvolumen Mastermix	45	

Tab. 31: Pipettierschema f ür die erste PCR

Tab. 32: Temperaturprofil für die erste PCR

Schritt	1	2	3	4
Denaturieren	2`94 °C	60" 94 °C		
Annealing		60" 55 °C		
Synthese		90" 72 °C	5` 72 °C	4 °C
Zyklen	1	30	1	

Die zweite PCR wurde im LightCycler durchgeführt, wobei 2 µl aller Ansätze der ersten PCR eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle für die Reaktion im LightCycler pipettiert. Ein Standard wurde nicht mitgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes war entsprechend dem Nachweis des Equinen-Rhinovirus (s. Tab. 15), wobei die beiden Primer RVA-1 und RVI-2 eingesetzt wurden. Das programmierte Temperaturprofil ist nachfolgend dargestellt. Einige Amplifikate wurden zur Kontrolle in ein 1,5 %iges Agarosegel übertragen (s. 3.3.3).

Enzymaktivierung und Denaturierung für 10 min bei 95 °C			
Amplifikation für 30	Zyklen, Typ Quantifizi	erung, Gains F1=5	
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Temperatur [°C]	95	55	72
Inkubation [sec]	15	10	35
Slope [°C/sec]	20	20	20
Messung	keine	keine	einfach
Schmelzkurvenanaly	se, Typ Schmelzkurve,	Gains F1=5	
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Temperatur [°C]	95	65	95
Inkubation [sec]	0	15	0
Slope [°C/sec]	20	20	0,1
Messung	keine	keine	kontinuierlich
Abkühlphase für 1 min bei 40°C			

3.3.6.7 Hantavirus (Puumala und Hantaan)

Das Protokoll zum molekularbiologischen Nachweis von Hantaviren wurde nicht optimiert, sondern nach den am Bernhard-Nocht-Institut etablierten Angaben durchgeführt (s. 3.3.6.7.2).

3.3.6.7.1 Bestimmung der Sensitivität

Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde bestimmt, indem aus einer Virussuspension mit 10^5 KID₅₀/ml eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -10) in DMEM angelegt, die RNA der einzelnen Verdünnungen isoliert und transkribiert wurde. Anschließend folgte die Amplifikation in der nested-PCR. Als Positivkontrolle wurde 1 µl Plasmid (s. 3.3.6.7.2) mitgeführt. Die Auswertung fand im 1,5 %igen Agarosegel statt (s. 3.3.3).

3.3.6.7.2 Protokoll der nested-PCR

Der molekularbiologische Nachweis von Hantaviren wurde mittels einer am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin¹⁰⁰ etablierten PCR durchgeführt.

Primer	Sequenz (5` - 3`)	Position ^a	Fragment- Länge [bp]
HSA-1	CATGAAAGCTGAAGARM*TTACACCTGG	603-629	673
HSA-2	CCTTAGCTCAGGATCCATGTCATC	1275-1252	075
HSI-1	GCACCAGACCGTTGTCCACCAACATG	985-1010	203
HSI-2	TGGCCTAGTTGTATCCCCATTGATTG	1187-1162	203

Tab. 34: Sequenzen der verwendeten Primer

^a Puumala-Virus (M 32750) * Abkürzungen für degenerierte Basen: R=A/G, M=A/C

In einer ersten PCR wurden 5 μ l cDNA Template mit 45 μ l des in Tab. 35 beschriebenen Mastermixes gemischt und nach folgendem Temperaturprogramm in Tab. 37 inkubiert. Die im Anschluss daran durchgeführte zweite PCR wurde mit 1 μ l Template der ersten PCR und in Tab. 36 dargestellten Mastermix angesetzt. Als Positivkontrolle für die nested-PCR wurden 1 μ l eines Plasmids¹⁰¹ (1 μ g/ml) eingesetzt. Der Mastermix diente als Negativkontrolle. Die Detektion aller Amplifikate erfolgte im Agarosegel (s. 3.3.3).

Tab. 35: Pipettierschema für die erste PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	35,8	
10 X Reaktionspuffer	5	1-fach
dNTP-Mix [je 2,5 mM]	1	0,05 mM
MgCl ₂ [25 mM]	1	2 mM*
HSA-1 [10 μM]	1	0,2 µM
HSA-2 [10 μM]	1	0,2 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,2	1 Einheit
Gesamtvolumen Mastermix	45	

* Konzentrationsangabe enthält auch die im 10 X Reaktionspuffer enthaltene Menge an MgCl₂

¹⁰⁰ Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, D-Hamburg

¹⁰¹ Plasmid enthält codierende DNA-Sequenz des Hantaan Nucleocapsid-Proteins, freundliches Geschenk des Bernhard-Nocht-Instituts

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Wasser	37,8	
10 X Reaktionspuffer	5	1-fach
dNTP-Mix [je 2,5 mM]	1	0,05 mM
MgCl ₂ [25 mM]	3	3 mM*
HSI-1 [10 μM]	1	0,2 μM
HSI-2 [10 µM]	1	0,2 μΜ
Taq-DNA-Polymerase	0,2	1 Einheit
Gesamtvolumen Mastermix	49	

Tab. 36: Pipettierschema f
 ür die zweite PCR

* Konzentrationsangabe enthält auch die im 10 X Reaktionspuffer enthaltene Menge an MgCl₂

Tab. 37: Temperaturprogramm für die nested-PCR

Schritt	1	2	3	4	5	6
Denaturieren	5` 94 °C	45" 94 °C	45" 94 °C	45" 94 °C		
Annealing		45" 62 °C	45" 58 °C	45" 50 °C		
Synthese		90" 72 °C	90" 72 °C	90" 72 °C	10`72 °C	4 °C
Zyklen	1	5	5	25	1	

3.3.7 Quantifizierung der PCR-Produkte

Bevor der eigentliche Erregernachweis mittels den etablierten PCR-Systemen erfolgte, wurde in einer ersten RT-nested-PCR das zugesetzte Equine-Rhinovirus in den Proben amplifiziert. Hierdurch sollte die Nukleinsäureextraktion überprüft und anhand des mitgeführten Standards die Inhibition in den einzelnen Proben bestimmt werden. Die Beurteilung der Inhibition wurde anhand im LightCycler ermittelter Peakflächen vorgenommen. Systematische Schwankungen des RT-nested-PCR-Testsystems von einer Zehnerpotenz wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Eine Probe galt somit als nicht inhibiert ("-"), wenn die ermittelte Peakfläche der Probe größer bzw. gleich der des ermittelten Standards 2 war und als inhibiert ("+"), wenn die Peakfläche größer bzw. gleich des Standards 1 war. Lag die Peakfläche der Probe unter dem Wert des Standards 1, so wurde sie als stark inhibiert ("++") betrachtet.

Für die Quantifizierung der humanen Enteroviren wurde in Absprache mit einen Mathematiker aus den im LightCycler berechneten Flächen unter dem spezifischen Peak und den zugehörigen Viruskonzentrationen der drei Standard 1 bis 3 über eine Regression eine Modellgleichung (s. Anhang) aufgestellt, über die dann den Peakflächen der Proben eine bestimmt Erregerkonzentration zugeordnet werden konnte. Die Viruskonzentrationen wurden dabei als äquivalent zu KID₅₀ (Äq. KID₅₀) definiert.

3.4 Verwendete Sammelgeräte

• Spezial-Impinger nach Prof. W. Müller¹⁰² (Loch-Impinger)

Der Spezial-Impinger besteht aus einem Edelstahlzylinder mit einem Innendurchmesser von 100 mm und einer Höhe von 400 mm. Die Luft wird durch eine Pumpe¹⁰³ mit zwischengeschaltetem Rotameter¹⁰⁴ (Luftmengen-Durchflussmessgerät) durch ein Rohr (Innendurchmesser 20 mm), das sich am Ende trichterförmig erweitert und durch eine Siebplatte nach unten abgeschlossen ist, in die Sammelflüssigkeit geleitet. Der Abstand zwischen Siebplatte (16800 Bohrungen) und Zylinderboden beträgt 30 mm. Um den Austrag von Flüssigkeit zu vermindern, ist der Innendurchmesser des Zylinders im unteren Drittel auf 150 mm erweitert, und im oberen Drittel ist eine Abfangvorrichtung für Flüssigkeitströpfchen installiert. Der Sammler wurde mit 1 I Sammelflüssigkeit bestückt und für 30 min. mit einer Durchflussmenge von 30 l/min betrieben.



- 1: Einlasssystem
- 2: erweitertes Einlassrohr
- 3: Siebplatte
- 4: Zylinder mit Sammelflüssigkeit

Abb. 1: Spezial-Impinger nach Prof. W. Müller

• Spezial-Impinger nach Bruker Franzen¹⁰⁵ (Sieb-Impinger)

Dieses Gerät entspricht in der Bauweise dem Impinger nach Müller, nur dass dessen Sieblochplatte durch ein Siebgitter ersetzt ist. Abweichend ist auch das Einlasssystem des Sammlers. Während dieses beim Müller-Gerät aus einem senkrecht nach oben gerichteten Rohr besteht, zieht die Bruker-Franzen-Variante die Luft im 360°-Winkel horizontal durch einen Schlitz. Der Sammler wurde ebenfalls mit einer Unterdruckpumpe (30 l/min) betrieben und mit 1 l Sammelflüssigkeit bestückt. Die Sammelzeit betrug 30 min.

¹⁰² Entwickelt von Prof. Dr. W. Müller, FU Berlin, Institut f
ür Tier- und Umwelthygiene, D-10117 Berlin

¹⁰³ Ilmvac, Saskia Hochvakuumtechnik GmbH, D-98693 Ilmenau, Art. Nr. 4000391

¹⁰⁴ Vögtlin Typ V100, Labortechnik Grießinger, D-73230 Kirchheim/Teck

¹⁰⁵ Leihgabe des Wehrwissenschaftlichen Institutes, D-29633 Munster



- 1: Einlasssystem
- 2: Zylinder mit
- Sammelflüssigkeit
- 3: Probenablauf
- 4: Rotameter
- 5: Unterdruckpumpe

Abb. 2: Spezial-Impinger nach Bruker Franzen

Personenbezogenes Gefahrstoff-Probenahmesystem (PGP-GSP-System)

Der PGP-Sammler unter Verwendung des Gesamtstaubkopfes ist ein Gerät, das speziell für den Einsatz an der Person im Rahmen von Messungen der Staubbelastung, die dem Arbeitsschutz dienen, konzipiert worden ist. Der Sammelkopf wird mit Filtern von 37 mm Durchmesser bestückt und ist für einen Volumenstrom von 3,5 l/min ausgelegt. Die dazugehörige akkubetriebene Pumpe¹⁰⁶ ist auf Fördermengen von 0,75-4,5 l/min einstellbar. Im Rahmen der personenbezogenen Luftkeimmessung für die virologischen Untersuchungen wurden ausschließlich Langzeitmessungen (mindestens 1 h) durchgeführt. Der Sammelkopf wurde mit Gelatinefiltern¹⁰⁷ oder an besonders feuchten Standorten mit Polycarbonatfilter¹⁰⁸ bestückt. Die Filter wurden im Anschluss an die Sammlung sofort in wässrige Lösung gebracht.

MD 8 Sammler¹⁰⁹

Der Sartorius MD-8 Sammler funktioniert im Prinzip wie ein Staubsauger. Dabei wird Luft durch ein Gelatine-Filter¹¹⁰ gesaugt, auf dem sich dann die in der Luft enthaltenen Partikel absetzen. Die Luftdurchflussmenge und die Messdauer sind einstellbar. In der Praxis hat es sich jedoch bewährt, den Sammelkopf des MD 8-Sammlers alleine zu verwenden und die Luft über eine separate Vakuumpumpe mit dazwischen geschaltetem Rotameter anzusaugen. Die Luftdurchsatzmenge wurde auf 30 l/min eingestellt. Die Messdauer betrug in der Regel 30 min. Die Filter wurden nach der Sammlung sofort in Lösung gebracht.

Virtueller Impaktor mit Impinger XM2¹¹¹

Das Gerät arbeitet voll automatisch mit einem Luftdurchsatz von 905 l/min. Der vorgeschaltete Impaktor konzentriert und fraktioniert im Partikelbereich von 2-10 µm. Die nachge-

- ¹⁰⁹ Sartorius A.G., D-37070 Göttingen, Typ SM 16743
- ¹¹⁰ Sartorius A.G., D-37070 Göttingen, Art. Nr. 17528-80-ACD
- ¹¹¹ Environmental and Process Division, Bendix Corporation, USA

¹⁰⁶ PP5 Modell HFS-513A, Gilian Instrument Corp., W-Caldwell, New York, USA, Art. Nr. 850053

¹⁰⁷ Sartorius A.G., D-37070 Göttingen, Art. Nr. 12602-37-ALK

¹⁰⁸ Infiltec GmbH, D-67346 Speyer, Art. Nr. PC-12050

schaltete Impingerstufe scheidet aus dem konzentrierten Volumenstrom, der mit 15 l/min. fließt, in die Sammelflüssigkeit ab. Hierfür werden zwei eigens für das Gerät angefertigte Sammelgefäße aus Kunststoff mit 50 ml Sammelflüssigkeit bestückt und in den Sammler eingesetzt. Die Proben werden während der 30-minütigen Sammlung automatisch auf 5 °C gekühlt.



- 1: Einlasssystem mit Impaktor
- 2: Schlitten für Sammelbecher
- 3: Steuerungseinheit
- 4: Sammelbecher

Abb. 3: Virtueller Impaktor mit Impinger XM2

Horizontal Zyklonsammler¹¹² (HZ)

Das Gerät besteht aus einem die Luft horizontal ansaugenden Zyklon und einem nachgeschalteten System aus mehreren Rotationspumpen zum dosierten Flüssigkeitstransport. Es arbeitet mit einem Luftdurchsatz von 690 l/min. Über die Pumpe I wird die Sammelflüssigkeit mit der angesaugten Luft im Zyklon verwirbelt. Dadurch werden Teilchen aus der Luft mit dem Sammelmedium vermischt. Pumpe II führt die gesammelte Probe in ein Sammelgefäß ab. Die Pumpen können mit variablen Durchflussraten betrieben werden. Die Sammelzeit betrug auch hier 30 min.

¹¹² CBD, Porton Down, UK



- 1: Einlasssystem
- 2: Vorratsgefäß
- 3: Pumpe I
- 4: Zyklon
- 5: Pumpe II
- 6: Probengefäß

Abb. 4: Horizontal Zyklonsammler

3.5 Aufarbeitung der Proben zum Virusnachweis

Die Wahl der Methode zur Aufkonzentrierung und Reinigung der Viruspartikel war hauptsächlich von der Beschaffenheit der Probe abhängig und musste somit für jeden Probentyp optimiert werden. Im Einzelnen werden die hierzu durchgeführten Vorversuche beschrieben. Abschließend folgt die endgültig angewandte Methode. Sämtliche Vorversuche wurden mit kontaminierten Sammelflüssigkeiten bzw. Lösungsmedien durchgeführt. Als Referenzviren wurden hierzu Polio Sabin S (unbehüllt) und Felines-Herpesvirus (behüllt) eingesetzt. Die Sammelflüssigkeiten der Spezial-Impinger wurden mit den Referenzviren versetzt und anschließend in den Sammlern für 30 min. betrieben.

3.5.1 Vorversuch zur Vorfiltration

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Abtrennung grober Schmutzpartikel mittels Filtration zu einer Virustiterreduktion führt. Es wurden Sammelflüssigkeiten der Spezial-Impinger mit je einem der beiden Referenzviren versetzt (Titer 10³ bis 10⁶ KID₅₀/ml) und für ca. 30 min. im Sammler betrieben. Daraufhin wurden die Proben filtriert. In einem weiteren Versuch wurde eine Abwasserprobe mit Polio Sabin S kontaminiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Probe ebenfalls filtriert.

Hierzu wurde folgendes benötigt:

- Wasserstrahlpumpe
- Pyrex-Filterhalter¹¹³ mit Flasche (1 l)
- Membranfilter (47 mm Durchmesser, 12 μm Porengröße)¹¹⁴

Das Membranfilter wurde in die Filtrationseinheit eingespannt, die Probe aufgetragen und an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Der Virustiter wurde sowohl in der Ausgangsflüssigkeit als auch im Filtrat und Retentat bestimmt (s. 3.2.2).

3.5.2 Vorversuch zur Ultrafiltration

Mit dieser Methode sollten alle Sammelmedien (1 l) der Spezial-Impinger aufgearbeitet werden. Daher wurden entsprechende Lösungen angesetzt, mit je einem der Referenzviren versetzt (Titer $10^{2,25}$ bis 10^6 KID₅₀/ml), für 30 min. im Spezial-Impinger betrieben und wie nachfolgend beschrieben ultrafiltriert. Der Virustiter wurde vor und nach der Vorfiltration, im Retentat und im Filtrat bei jedem Versuchsansatz, wie unter 3.2.2 beschrieben, bestimmt. Außerdem sollte die Menge und Beschaffenheit des zurückbleibenden Retentates ermittelt werden.

Verwendete Geräte:

- Ultrafiltrationsmodul groß(100 kD)¹¹⁵
- Ultrafiltrationsmodul klein (100 kD)¹¹⁶
- Durchflussmanometer (2 Stück)¹¹⁷
- Schlauchpumpe groß¹¹⁸
- Schlauchpumpe klein¹¹⁹
- flexible Schlauchverbindungen¹²⁰ mit verstellbarer Schlauchklemme
- steriles Reinstwasser
- NaOH¹²¹ (1 N, 50°C)
- $HCl^{122} (0,01 \text{ N})$

Die Ansätze wurden ultrafiltriert, indem die Pumpe langsam bei geöffneter Schlauchklemme auf eine Durchflußrate von 450 ml/min (max. Leistung der Pumpe) eingestellt wurde. Danach wurde durch vorsichtiges Schließen der Schlauchklemme ein Eingangsdruck von 5 psig (= 345 mbar) eingestellt.

Das Modul wurde gereinigt und desinfiziert, indem zuerst mit sterilem Reinstwasser (1 l) gespült wurde. Hierbei wurde Filtrat und Retentat verworfen. Als nächstes wurde 50°C warme Natronlauge (0,5 l) für ca. 1-2 h rezirkuliert und anschließend noch einmal mit sterilem Reinstwasser (1 l) gespült. Danach wurde die Salzsäure (0,5 l) für 1-2 h rezirkuliert und abschließend noch einmal mit sterilem Reinstwasser gewaschen.

¹¹³ Millipore, D-6236 Eschborn, Art. Nr.1004700

¹¹⁴ Cellulosenitratfilter AE 100, Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel, Art. Nr. 400012

¹¹⁵ UFP-100-E-4A, Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel, Art. Nr. 479121

¹¹⁶ UFP-100-C-MB01, Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel, Art. Nr.479008

¹¹⁷ KPC-NPT 30T, Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel, Art. Nr. 19479950

¹¹⁸ Pericor Typ SF 240, Heraeus Sepatech, D-37250 Osterode am Harz, Art. Nr. 51012331

¹¹⁹ Pharmacia LKB Pumpe P1, Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg

¹²⁰ Rotilabo-Silikonschlauch, Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 9562.1

¹²¹ Riedel-deHaën, D-Seelzen, Art. Nr. 06203

¹²² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.09911

Des Weiteren wurde in Vorversuchen untersucht, ob sich durch eine Ultraschallbehandlung¹²³ des Retentats nach der Ultrafiltration eine Virustitererhöhung durch Zerschlagung sich möglicherweise gebildeter Konglomerate erzielen lässt. Hierzu wurden 7 Retentate aus den Vorversuchen zur Ultrafiltration im Eiswasser einer 5-minütigen Beschallung unterzogen. Anschließend wurde der Virustiter ermittelt (s. 3.2.2).

3.5.3 Vorversuch zur Ultrazentrifugation mit Stufengradienten

Die folgenden Vorversuche dienten der Brechung der Ölemulsion (Retentat nach der Ultrafiltration) und weiteren Aufkonzentrierung der Viruspartikel. Es wurden die Trennmedien Saccharose und Percoll eingesetzt.

Folgende Geräte und Materialien wurden hierzu verwendet:

- Ultrazentrifuge¹²⁴
- Ausschwingrotor¹²⁵
- Zentrifugenröhrchen¹²⁶
- sterile Einmalspritzen (5 ml) mit Kanülen (0,90x40 mm)
- eisgekühlte Gradienten: 10 % (w/v) Saccharose¹²⁷ in PBS

60 % (w/v) Saccharose in PBS mit Phenolrot¹²⁸ angefärbt Percoll¹²⁹

Die eisgekühlten Gradienten und das Retentat aus den Vorversuchen zur Ultrafiltration (3.5.2) wurden vorsichtig übereinander geschichtet und zwar in der Reihenfolge: 60 % Saccharose bzw. Percoll (4 ml), 10 % Saccharose (die Saccharosemenge ergab sich aus dem Gesamt-volumen von 39 ml des Zentrifugenröhrchens abzüglich des ersten Gradienten (4 ml) und der Menge des Retentats) und Retentat. Die Zentrifugenröhrchen wurden sorgfältig mit PBS austariert und bei 140 000 g und 4 °C für 6 h zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens von außen entnommen. Der Virustiter wurde in allen Gradienten, wie unter 3.2.2 beschrieben, bestimmt.

3.5.4 Vorversuch zum Gelatineverdau

Bevor die MD 8-Gelatinefilter aufgearbeitet werden konnten, musste die Gelatine zur vollständigen Verflüssigung der Lösung verdaut werden. Daher wurden zwei Vorversuche zur Wirkung von Trypsin durchgeführt. Es wurden zwei Ansätze pipettiert: 5 ml DMEM, 5 ml PBS, 1 ml Virussuspension (FEHV 10^6 KID₅₀/ml bzw. Polio Sabin S), 1 MD 8-Gelatinefilter und 2,75 ml Versen-Trypsin-Lösung (s. Anhang). Die Ansätze wurden bei 37 °C 60 min. lang inkubiert. Nach 0, 5, 10, 30 und 60 min. wurden Aliquots genommen und der Virustiter bestimmt (s. 3.2.2).

3.5.5 Vorversuche mit Zentrifugenkonzentratoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zentrifugenkonzentratoren zur Aufkonzentrierung der gesammelten Proben eingesetzt. Die Vorversuche wurden zur Klärung unterschiedlicher Fragestellungen durchgeführt.

¹²³ Sonorex RK 510, Bandelin Electronic KB, D-Berlin

¹²⁴ Modell L7, Beckman Instruments, D-München

¹²⁵ SW. 28, Beckman Instruments, D-München

¹²⁶ Ultra Clear Centrifuge Tubes (25 X 89 mm), Beckman Instruments, D-München, Art. Nr. 344058

¹²⁷ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 7654

¹²⁸ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr.7241

¹²⁹ Pharmacia Biotech, D-79021 Freiburg, Art. Nr. 17-0891-01

3.5.5.1 Centriprep-500¹³⁰ (500 kD):

Ein MD 8-Gelatinefilter wurde, wie unter 3.6 d) beschrieben, gelöst und mit 1 ml Polio Sabin S (10^4 - 10^6 KID₅₀/ml) versetzt. Anschließend wurden 2,75 ml Versen-Trypsin-Lösung hinzupipettiert und bei 37 °C ca. 10 min. inkubiert. Danach wurde der Ansatz in den Konzentrator überführt und bei 500 x g nach den Angaben des Herstellers in mehreren Stufen bei 20 °C zentrifugiert. Der Virustiter wurde in der Ausgangslösung, im Filtrat und Retentat bestimmt. Der Konzentrator wurde, wie nachfolgend beschrieben, nach jeder Probe desinfiziert.

3.5.5.2 JumboSep^{тм 131} (100 und 300 kD):

In den Vorversuchen zur Verwendung des JumboSep wurden Membranscheiben mit 100 und 300 kD eingesetzt. In einer ersten Versuchsreihe wurde folgender Probenansatz mit unterschiedlichen Polio Sabin S Konzentrationen pipettiert: 5 ml DMEM, 5 ml PBS 1 MD 8-Gelatinefilter und 1 ml Polio Sabin S $(10^4, 10^6 \text{ und } 10^7 \text{ KID}_{50}/\text{ml})$. Die Proben wurden mit 2,75 ml Versen-Trypsin-Lösung versetzt und für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in ein JumboSep System mit 100 kD gegeben und bei 3000 x g und 20 °C für 1h zentrifugiert. Der Virustiter wurde im Ansatz, im Filtrat und Retentat ermittelt (s. 3.2.2). Zwischen den Zentrifugationen wurden die Becher und Membranscheiben desinfiziert.

Als nächstes wurden neue 100 und 300 kD Membranen miteinander verglichen, indem 50 ml DMEM, 50 ml PBS und 1 ml Polio Sabin S (10^5 KID₅₀/ml) gemischt, auf zwei XM-2 Sammelgefäße verteilt und jede Probe für 30 min. im Gerät betrieben wurde. Nach der "Sammlung" wurde den Proben die entsprechende Menge BSA und Antibiotika zugesetzt (s. 3.6). Der Virustiter wurde vor und nach dem Betrieb des Sammlers bestimmt. Danach wurde ein Ansatz mit 100 kD, der andere mit 300 kD für 30 min. bei 4 °C, wie bereits beschrieben, zentrifugiert. Es folgte die Titration der Filtrate und Retentate.

Nachdem bereits ein Teil der HZ- und XM-2-Proben mit der 300 kD Membran aufgearbeitet waren, wurden 6 mehrfach benutzte und desinfizierte Membranen anhand kontaminierter Proben (Polio Sabin S 10^5 KID₅₀/ml) auf ihre Tauglichkeit hin überprüft. Es wurden je 30 ml einer Virussuspension (90 ml DMEM, 90 ml PBS und 1 ml Virus) mit den Membranen 1 bis 6 zentrifugiert. Anschließend wurde der Virustiter in allen Filtraten und Retentaten ermittelt.

3.5.5.3 Desinfektion des JumboSep und Centriprep-500:

Nach einer Inkubation (1 h) der Membranen mit Versen-Trypsin-Lösung bei 37 °C wurden sie mit sterilem Reinstwasser gespült und die gesamte Zentrifugeneinheit bei RT über Nacht in NaOH (1 N) eingelegt. Danach wurde alles nochmals mit sterilem Reinstwasser gewaschen und 1-2 h in HCl (1 N) bei RT inkubiert. Abschließend wurde mit sterilem Reinstwasser gründlich gespült. Die Lagerung der Membranen erfolgte in NaOH (0,1 N).

3.5.5.4 Ultrafree-15 (100 kD)¹³²:

Im Folgenden wurde die weitere Aufarbeitung der nach der Ultrazentrifugation vorliegenden Zuckerlösung überprüft. Hierzu wurde folgender Probenansatz pipettiert: 4 ml 10 % Saccharose, 1 ml 60 % Saccharose und 1 ml Polio Sabin S (Titer ca. 10^{5} - 10^{6} KID₅₀/ml). Der Ansatz wurde mit 9 ml DMEM auf ein Endvolumen von 15 ml aufgefüllt, sorgfältig gemischt und in ein Ultrafree-15 System überführt. Nach einer Zentrifugation von 0,5-3,5 h bei

¹³⁰ Millipore, D-65760 Eschborn, Art. Nr. 4326

¹³¹ PallFiltron, D-63303 Dreieich, Art. Nr. FD100K65

¹³² Millipore, D-6236 Eschborn, Art. Nr.1004700, Art. Nr. UFV2BTK40

2000 x g und 4 °C wurde der Virustiter des im System verbleibenden Retentats, des Filtrats und des Ansatzes vor der Zentrifugation bestimmt (s. 3.2.2). Diese Versuche sollten zeigen, ob es zu Virusverlusten bei der Aufarbeitung kam.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden 4 ml 10 % Saccharose, 1 ml 60 % Saccharose und 9 ml DMEM gemischt und nach der Zentrifugation das verbleibende Retentat (150-300 μ l) mit DMEM auf 1, 3 und 4 ml aufgefüllt, titriert und auf VERO aufgetragen (s. 3.2.2). Die Zellen wurden täglich auf toxische Effekte überprüft.

3.5.6 Vorversuche zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter

Der folgende Vorversuch sollte klären, ob die Gelatine der Filter nach der Isolierung der Nukleinsäure eine hemmende Wirkung auf die RT-PCR hat. Hierzu wurden zwei Ansätze vorbereitet. Ansatz 1 enthielt 4 ml PBS, 1 ml Virussuspension (10⁴ KID₅₀/ml Polio Sabin S/ Aujeszky-Virus) und 1 Gelatinefilter. Ansatz 2 entsprach mit Ausnahme des Gelatinefilters der Zusammensetzung des Ansatzes 1. Beide Ansätze wurden mit 1,3 ml Versen-Trypsin-Lösung versetzt und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in je ein Ultrafree-15 System überführt und wie unter 3.5.5 beschrieben zentrifugiert. Aus dem verbleibenden Retentat wurden daraufhin die Nukleinsäuren extrahiert (s. 3.3.4 d) und zum Nachweis des Polio Virus mit dem Primer EV-as in die RT-Reaktion eingesetzt (s. 3.3.2). Die cDNA wurde in DEPC-Wasser verdünnt (1:10 und 1:100) und in der nested-PCR, entsprechend den Vorversuchen zur DNA-und RNA-Extraktion (s. 3.3.4), amplifiziert. Der Nachweis von Aujeszky-Virus erfolgte direkt aus der isolierten Nukleinsäure, die zuvor ebenfalls in DEPC-Wasser verdünnt wurde, nach dem Protokoll unter 3.3.4 Die überprüften Verdünnungen waren 1:200, 1:400, 1: 800 und 1:1000.

3.5.7 Endgültig angewandte Methoden zur Aufarbeitung

Im Folgenden sind die angewandten Methoden zur Probenaufarbeitung dargestellt. Nach den einzelnen Aufarbeitungen wurden alle Proben mit DMEM auf ein Endvolumen von 4 ml aufgefüllt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Pro Probe waren dies im einzelnen 6 Portionen zu je 500 µl (kultureller Virusnachweis), 1 Gefäß mit 200 µl (molekularbiologischer Nachweis) und eine Portion zu 800 µl für eventuelle Wiederholungen.

3.5.7.1 Proben der beiden Spezial-Impinger

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und wie unter 3.5.1 beschrieben vorfiltriert. Anschließend wurden sie unter Verwendung des großen Ultrafiltrationsmoduls aufkonzentriert (s. 3.5.2). Danach wurde das gekühlte Retentat auf einen Saccharosegradienten (s. 3.5.3) pipettiert und zentrifugiert. Durch Anstechen des Zentrifugenröhrchenbodens wurden die gesamte 60 %ige (4 ml) und ein Teil der 10 %igen Zuckerlösung (ca. 1 ml) entnommen und mit 10 ml DMEM (4 °C) sorgfältig resuspendiert. Abschließend wurde der Ansatz in ein Ultrafree-15 System überführt, 0,5-3,5 h zentrifugiert (s. 3.5.5), das Retentat mit DMEM auf 4 ml aufgefüllt und aliquotiert.

3.5.7.2 Proben der "*high-volume*"-Sammler

Die Proben des HZ und XM-2 wurden ebenfalls im Wasserbad aufgetaut und vorfiltriert (s. 3.5.1). Alle gesammelten Luftproben, mit Ausnahme der Proben 94 bis 97 und 117 bis 122 wurden mit dem Zentrifugenkonzentrator JumboSep (300 kD) aufgearbeitet. Hierzu wurden die Proben in den Konzentrator überführt und bei 3000 x g und 4 °C für 30 min. zentrifugiert. Das Retentat wurde abschließend entsprechend mit DMEM versetzt und portioniert und der Konzentrator desinfiziert.

Die Proben 94 bis 97 und 117 bis 122 wurden unter Verwendung des kleinen Ultrafiltrationsmoduls und der kleinen Schlauchpumpe aufkonzentriert. Das kleine Modul wurde ebenfalls bei maximaler Pumpenleistung betrieben, wobei das Verhältnis Filtrat zu Retentat 1:10 betrug. Das Retentat wurde mit DMEM auf ein Endvolumen von 15 ml ergänzt und im Ultrafree-15 weiter aufgearbeitet (s. 3.5.5). Das zurückbleibende Retentat wurde auf 4 ml aufgefüllt und aliquotiert. Die Ultrafiltrationseinheit wurde, wie bereits beschrieben, nach jeder Aufkonzentrierung gereinigt und desinfiziert.

3.5.7.3 Proben des MD-8 Sammlers

Die Aufarbeitung der Gelatinefilter des MD 8-Sammlers erfolgte mit dem Zentrifugenkonzentrator Centriprep-500, indem die Probe nach dem Auftauen im Wasserbad (37 °C) mit Versen-Trypsin-Lösung (2,75 ml) bei 37 °C für 30 min. inkubiert wurde. Danach wurde der Ansatz in den Konzentrator überführt und bei 500 x g nach den Angaben des Herstellers bei 20 °C zentrifugiert. Das Retentat wurde mit DMEM auf das Endvolumen 4 ml aufgefüllt. Abschließend folgte die Desinfektion des Konzentrators.

3.5.7.4 Proben des PGP-GSP-Systems

Die Aufarbeitung der Proben der personenbezogenen Messungen wurden mit dem Ultrafree-15 Konzentrator durchgeführt. Hierzu wurden die in Lösung befindlichen Polycarbonatfilter am Tag der Sammlung im Eisbad 5 min ultrabeschallt. Die Probensuspension wurde anschließend im Ultrafree-15, wie bereits beschrieben, zentrifugiert. Die Aufarbeitung der gelösten Gelatinefilter des PGP-GSP-Systems erfolgte, indem die Probe nach dem Auftauen mit 1,3 ml Versen-Trypsin-Lösung versetzt und für 30 min. bei 37 °C inkubiert wurde. Danach wurde der Ansatz entsprechend zentrifugiert. Die Retentate wurden nicht mit DMEM auf 4 ml aufgefüllt, da kein kultureller Virusnachweis erfolgte.

3.5.7.5 Substratproben

Nachdem die Abwasser- und Sickerwasserproben aufgetaut und vorfiltriert waren, wurde ein Aliquot von 15 ml in ein Ultrafree-15 pipettiert und für 30 min. bis zu 3,5 h zentrifugiert. Abschließend wurde das Retentat mit DMEM auf 4 ml ergänzt und in Portionen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6 Probenahme bei Außenmessungen und Beschreibung der Standorte

Die Luftprobename wurde mit den Spezial-Impingern, dem MD 8-Sammelkopf, PGP-GSP-System, dem XM-2 und dem HZ durchgeführt. Die Sammelflüssigkeiten und Medien zum Lösen der Filter wurden vor jedem Probenahmetermin frisch in sterilen Gefäßen angesetzt und gekühlt zwischengelagert.

Die relative Luftfeuchte, die Umgebungstemperatur¹³³ und Standortbesonderheiten wurden während jeder Messeinheit ermittelt und notiert. Daneben wurde unter Verwendung einer Nebelmaschine¹³⁴ die Windverhältnisse bzw. die Ausbreitung von Aerosolen beobachtet und die Position Sammler gegebenenfalls geändert.

¹³³ Feuchtemessgerät, Testo GmbH & Co, D-79853 Leuzkirch, Art. Nr. 0560.6010.106

¹³⁴ F...T10, F.N. Light, Art. Nr. 625020

Es wurde folgendes benötigt:

- PBS (s. Anhang)
- DMEM
- Bovines-serum-albumin (BSA)¹³⁵
- Olivenöl
- Penicillin G¹³⁶-Stammlösung (15 g in 250 ml Aqua dest gelöst, 100 000 units/ml)
- Amphotericin B^{137} (250 µg/ml)
- Streptomycin¹³⁸-Stammlösung (1,28 g in 5 ml PBS gelöst, 195 000 units/ml)
- sterile Kunststoffgefäße (1 l, 50 ml, 15 ml)

Da die Messungen sowohl dem Nachweis luftgetragener Mikroorganismen (Bakterien, Sporen, Pilze) als auch dem von Viren dienten, wurden die Sammelflüssigkeiten ohne Antibiotikazusatz angesetzt. Im Einzelnen waren dies:

a) Spezial-Impinger

1 1 PBS, 0,3 % (w/v) BSA als Schutzsubstanz, 0,1 % Olivenöl als Schaumhemmer

b) XM-2

25 ml PBS, 25 ml DMEM

- c) Horizontal-Zyklon 250 ml PBS, 250 ml DMEM
- d) MD 8-Sammler (nur Virusnachweis)

5 ml PBS, 5 ml DMEM, Penicillin G (400 units/ml), Streptomycin (780 units/ml) und Amphotericin B (2 µg/ml)

e) PGP-Gelatine- bzw. Polycarbonatfilter (nur Virusnachweis)

5 ml PBS, Penicillin G (400 units/ml), Streptomycin (780 units/ml) und Amphotericin B (2 µg/ml)

Nach Beendigung der Sammlung wurde aus den Sammelmedien a) bis c) ein Aliquot (10 bis 11 ml) für den mikrobiologischen Nachweis in sterile 15 ml Gefäße pipettiert. Der Rest der Probe wurde mit Penicillin G (400 units/ml), Streptomycin (780 units/ml) und Amphotericin B (2µg/ml) versetzt. Die Sammelmedien b) und c) erhielten zusätzlich 0,3 % (w/v) BSA. Die Gelatine- bzw. Polycarbonatfilter wurden nach der Sammlung sofort in Lösung gebracht.

Alle Proben wurden gekühlt ins Labor transportiert. Die Aufarbeitung der mikrobiologischen Proben erfolgte max. 24 h nach der Probenahme. Die Flüssigkeiten zum Virusnachweis wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei –80 °C eingefroren.

Im Zeitraum März 1998 bis September 1999 wurden sowohl standort-, als auch personenbezogene Messungen in Bereichen von Kläranlagen, Kanalisation, Mülldeponien, und einer Müllverbrennungsanlage durchgeführt. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen des Projektes beprobten Standorte.

¹³⁵ Serva, D-69115 Heidelberg, Art. Nr. 11930

¹³⁶ Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. A 321-42

¹³⁷ Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. A 2612

¹³⁸ Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. A 331-27
Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental

Bei diesem Standort handelte es sich um einen natürlichen Bach, in den kommunale Abwässer der Umgebung eingeleitet werden. Die Aufgabe der hier beschäftigten Männer bestand darin, den Wasserlauf auszubaggern und mittels Betonbauelementen einzuhausen. Es wurden drei Messtermine angesetzt (24.03., 06.04. und 24.04.98), an denen unterschiedliche Standpunkte für die Messgeräte gewählt wurden. Sie befanden sich im Bereich des Betonschachtes, unterhalb dessen das Abwasser verlief und direkt am Wasserlauf.

Kreismülldeponie Bruchsal

In Bruchsal handelte es sich um eine Kreismülldeponie in die sowohl Haus-, als auch Industriemüll eingearbeitet wird. Die Messungen fanden auf dem Deponiekörper im Arbeitsbereich der Müllabkippung (Fahrverkehr) und Mülleinarbeitung (Radlader- und Verdichtertätigkeiten) statt.

Klärwerk München

Die Untersuchungen wurden außerhalb der Kläranlage in der Nähe des Nachklärbeckens und des Vorfluters durchgeführt. Hier war ein Bautrupp, bestehend aus Schachtarbeiter und Kraneinweiser, mit dem Aushub eines Schachtes beschäftigt.

Mülldeponie Gelnhausen-Haller

In der Mülldeponie wurden ausschließlich Sanierungsarbeiten durchgeführt. Im einzelnen waren dies Verdichten, Umschichten und Zumischen von altem Müll, der zum Teil älter als 10 Jahre ist. Es wurde während Radladertätigkeiten gemessen.

Kläranlage Stuttgart Mühlhausen

Im Hauptklärwerk Mühlhausen der Landeshauptstadt Stuttgart werden kommunale, gewerbliche und industrielle Abwässer behandelt und in den Neckar eingeleitet. In einer groß angelegten Baustelle wurden zahlreiche Bereiche der Anlage saniert und neu gebaut. Die Luftkeimmessungen wurden in der Nähe der Nachklärbecken, Vorklärbecken und der Belebungsbecken angesetzt.

Müllverbrennungsanlage Stuttgart

In der Müllverbrennungsanlage werden Haus- und Gewerbemüll angeliefert und dem Müllbunker übergeben. Die Abfälle werden von dort mit Hilfe eines Krans in die im Müllbunker befindlichen Schredder verladen und zerkleinert. Daraufhin gelangen sie über Förderbänder zur Verbrennung in das Kesselhaus. Die Messungen erfolgten im Bereich des Müllbunkers, der keinen Dauerarbeitsplatz darstellt.

Abbruchgelände Augsburg

Dieser Standort war das Abbruchgelände einer ehemaligen Textilfabrik. In diesem Bereich wurde die Anlage demontiert und die Gebäude abgerissen. Die Proben wurden in einer der Arbeitshallen genommen. Die dort Beschäftigten waren mit Reinigungsarbeiten der zu demontierenden Anlagenteile beauftragt.

Kanalisation Stuttgart

Im Bereich der Kanalreinigungsarbeiten unter tage wurden aus technischen Gründen nur personenbezogene Luftkeimmessungen durchgeführt. Das Reinigungspersonal beförderte den sich am Fuße des Abwasserlaufs abgesetzten Unrat unter Verwendung einer Seilwinde aus den Kanalschächten.

Kläranlage Stuttgart Plieningen

In der Kläranlage Plieningen werden Schmutzwasser aus Haushalten, Industrie- und Gewerbe- und Oberflächenwasser des Flughafens behandelt. Nach der Reinigung wird das Abwasser in die Körsch eingeleitet. Die Probenahme fanden am Rand der Belebungsbecken statt.

Mülldeponie Stetten

Auf dieser Anlage wurden im ganzen Deponiebereich neue Gasbrunnen in den Müllkörper eingelassen. Mit einem Spezialgerät wurde ein Loch gebohrt und mit Metallhülsen stabilisiert, wobei der Aushub direkt neben dem Bohrloch abgesetzt wurde. Dieser sollte zu einem späteren Zeitpunkt abtransportiert werden. Die Sammler wurden in unmittelbarer Nähe des Aushubs platziert.

3.7 Kultureller Virusnachweis

Die Virusisolierung erfolgte in 24-well-Mikrotiterplatten, indem die zuvor aufgearbeiteten Proben auf einem konfluenten Zellrasen der entsprechenden Zelllinie inokuliert wurden. Die isolierten Viren wurden anschließend vermehrt, titriert und plaquegereinigt.

Für die kulturelle Virusisolierung wurde folgendes benötigt:

- Versen-Trypsin-Lösung
- Nährmedium allgemein: DMEM mit 2 % FKS, Penicillin G (400 units/ml) Streptomycin (780 units/ml), Amphotericin B (2µg/ml) und Gentamycin¹³⁹ (0,2 mg/ml)
- Nährmedium Rotaviren: DMEM, Penicillin G (400 units/ml), Streptomycin (780 units/ml), Amphotericin B (2 µg/ml), Gentamycin (0,2 mg/ml) und Trypsinstammlösung (50 units/ml)
- BMS
- Ridascreen Rotavirus
- Sterile Glasröhrchen mit Deckel
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)
- 24-well-Mikrotiterplatten¹⁴⁰
- 6-well-Mikrotiterplatten¹⁴¹
- Zellkulturflaschen (50 ml/24²)
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße

¹³⁹ Gentamycin sulfate, BioWhittaker, B-4800 Verviers, Art. Nr. Z 1793

¹⁴⁰ Nunclon Surface, Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 143 982

¹⁴¹ Nunclon Surface, Nunc, D-6200 Wiesbaden-Biebrich, Art. Nr. 152 795

3.7.1 Isolierung von cytopathogenen Viren

Die Isolierung von cytopathogenen Viren erfolgte nacheinander auf den Zelllinien VERO, BGM und A549. Einen Tag vor dem Inokulieren der Proben wurden die entsprechenden Zellen (1 ml Zellsuspension pro Kavität) in 24-well-Platten eingesät, wobei 2 cups als Zell-kontrolle dienten. Die dekadischen Verdünnungsreihen (bis –3) der zu untersuchenden Proben wurden in Glasröhrchen mit 900 μ l Nährmedium durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Erhaltungsmedium der Mikrotiterplatten abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die Originalproben und die drei Verdünnungen mit je 200 μ l im Doppelansatz in die 24-well-Platte überführt. In die Vertiefungen der Zellkontrolle wurden 200 μ l Nährmedium pipettiert. Darauf folgte eine Inkubation bei 37 °C im Feuchtbrutschrank für 1 h, wobei die Platten alle 15 min. vorsichtig geschwenkt wurden. Anschließend wurden täglich lichtmikroskopisch ausgewertet.

Beim Auftreten eines cpe wurden die einzelnen positiven wells abgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Dabei wurde ein Ansatz in eine kleine Zellkulturflasche pipettiert und mit 5 ml der entsprechenden Zellsuspension im Brutschrank bis zum Erscheinen eines cpe inokuliert und entsprechend der Virusvermehrung unter 3.2.1 a) weiterbehandelt. Die Isolate wurden später titriert und plaquegereinigt. Die restlichen Portionen wurden bei -80 °C eingefroren.

Nach einer Inokulation von 5 bis 6 Tagen wurden die Zellen beider cups der ersten negativen Verdünnung bzw. die Originalprobe mit 1 ml Versen-Trypsin-Lösung entsprechend 3.1.1 feuchtpassagiert. Hierbei wurden die beiden Kulturüberstände der 24-well-Platte in ein gemeinsames cup einer 6-well-Platte überführt. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Nährmedium resuspendiert und zum ZKÜ in die 6-well-Platte pipettiert. Bei BGM wurden jedoch nur 3 ml überführt. Der Rest wurde verworfen. Es folgte nochmals eine Inkubation bei 37 °C für 6 Tage. Beim Auftreten eines cpe wurden die Proben in Zentrifugenröhrchen bei -80 °C tiefgefroren.

3.7.2 Isolierung von humanen Rotaviren

Zum kulturellen Nachweis humaner Rotaviren wurden die Proben (500 μ l) mit 10 μ l Trypsinstammlösung im Brutschrank 30 min. vorinkubiert. Danach wurden dekadische Verdünnungsreihen (bis –3) in Glasröhrchen mit 900 μ l Nährmedium angelegt und je 200 μ l der Originalprobe und Verdünnungen im Doppelansatz in 24-well-Platten überführt. Als Zellkontrolle wurden 200 μ l Nährmedium pipettiert. Anschließend wurden je well 1 ml der vorbereiteten BSC-1 Zellsuspension (Nährmedium und 10 % BMS) aufgetropft. Die Mikrotiterplatten wurden täglich lichtmikroskopisch ausgewertet.

Beim Auftreten eines cpe wurden die positiven Überstände, wie unter 3.7.1 beschrieben, entnommen und vermehrt. Die Passage der ersten Verdünnung bzw. Originalprobe ohne sichtbaren cytopathischen Effekt erfolgte nach 5 bis 6 Tagen (s. 3.7.1). Dabei wurde das Nährmedium für Rotaviren verwendet. Die Endablesung der Testplatten erfolgte nach ca. einer Woche.

Das Vorhandensein von Rotaviren wurde mit dem Enzymimmunoassay Ridascreen-Rotavirus überprüft, indem 100 μ l aller Zellkulturüberstände vor der Passage und nach der Endablesung nach Angaben des Herstellers getestet wurden. Als negative Kontrolle wurden 100 μ l der Zellkontrolle eingesetzt. Die im Ridascreen positiven Überstände wurden zusätzlich im Zellelisa überprüft (3.2.3).

3.7.3 Titration und Plaquereinigung der Virusisolate

Folgende Materialien wurden benötigt:

- Nährmedium (s. 3.7)
- Overlaymedium (s. Anhang)

Vor der Sequenzierung der einzelnen Virusisolate war eine Plaquereinigung notwendig. Dazu wurde eine Titration in dem jeweiligen Nährmedium (-1 bis –8) nach der Endpunkt-verdünnungsmethode, wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, durchgeführt und der Titer berechnet. Abweichend wurden jedoch von jeder Verdünnungsstufe 8 Kavitäten angelegt und 100 μ l Zellsuspension pro well aufgetragen. Nach einer Inkubation von 2 h im Brutschrank wurden abschließend 100 μ l/well Overlaymedium pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wurde täglich auf die Ausbildung von Plaques überprüft. Aus der höchsten Verdünnungsstufe wurde nach ca. 5 bis 6 Tagen das Medium eines cups, in dem sich nur ein einzelner Plaque befand, in eine Zellkulturflaschen (50 ml/ 24^2) mit der entsprechenden Zelllinie überführt. Nach erneutem Auftreten eines cpe erfolgten die weiteren Schritte der Virusvermehrung (3.2.1). Die gereinigten Isolate wurden aliquotiert (1 ml) und bei -80 °C gelagert.

Einige der gereinigten Isolate wurden sequenziert¹⁴², gegen die Datenbank getestet und im Vector NTI miteinander verglichen.

¹⁴² Virologisches Institut der Medizinischen Hochschule Hannover

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zum EIA von Hantaviren, Hepatitis A-Virus und Rotavirus

Der EIA zum Nachweis von Hantaviren wurde, wie unter 3.2.5 beschrieben, durchgeführt, wobei die Inkubation der Mikrotiterplatte vor der Fixierung der Zellen drei bzw. acht Tage betrug. In beiden Fällen konnte mit der angewandten Methode keine Färbung erzielt werden. Eine Verlängerung der Inkubation der AEC-Substrat-Lösung um weitere 30 min. hatte eine unspezifische Rotfärbung aller Verdünnungen und der Zellkontrolle zur Folge. Eine längere Inkubation der Zellen in der Mikrotiterplatte war aufgrund der Zelldichte nicht möglich. Aufgrund der Ergebnisse wurde der Versuch wiederholt, wobei die Überstände der einzelnen Verdünnungen nach acht Tagen in der RT-nested-PCR überprüft wurden. Die gelelektrophoretische Auswertung ist in Abb. 5 dargestellt. Die Ansätze zwei bis sechs hatten bei 200 bp die spezifische Bande. Die PCR der Zellkontrolle und der Verdünnung -5 waren negativ. Für die Virussuspension ergab sich ein Titer von 10⁵ KID₅₀/ml.



ZK: neg. Kontrolle

Abb. 5: Amplifikate der zweiten PCR der Hantavirus-Zellkulturüberstände nach acht Tagen Inkubation

Der Nachweis von Hepatitis A-Virus im EIA folgte den Angaben unter 3.2.6. Die Versuche wurden mit verschiedenen Arbeitsverdünnungen des primären Antikörpers (1:1000 und 1:500) und des Konjugates (1:5000 und 1:500) durchgeführt. Die Inkubation der Zellen vor der Fixierung betrug neun Tage. Bei der mikroskopischen Auswertung konnte in keinem der durchgeführten Versuche eine dunkelbraunrote Färbung detektiert werden. Die Virussuspension wurde daher zur Bestimmung des Virustiters an das Virologische-Max-von-Pettenkofer-Institut gesandt. Durch serielle Verdünnungen und anschließende nested-PCR wurde dort eine Konzentration von 5 x 10^7 bis 5 x 10^8 Genkopien/ml ermittelt.

Um den kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassay Ridascreen-Rotavirus als Alternative zum zeitintensiven EIA zu verwenden, wurden die Sensitivitäten der beiden Testsysteme, wie unter 3.2.4 beschrieben, miteinander verglichen. Die Verdünnungsreihe (0 bis -10) der Virussuspension ergab im Ridascreen-Kit bis zur Verdünnung -2 eine Extinktion von größer bzw. gleich 0,15 und damit ein positives Ergebnis. Der vergleichsweise durchgeführte EIA zeigte bei der mikroskopischen Auswertung bis zur Verdünnung -7 die spezifische Farbreaktion. Die Kulturüberstände der einzelnen Verdünnungen wurden vor dem Fixieren der Zellen nicht verworfen, sondern nochmals im Ridascreen getestet. Die gemessene Extinktion war bis zur Verdünnung -7 größer 0,15 und entsprach somit dem Ergebnis des EIA. Der Titer der Virussuspension betrug 10^{8,5} KID₅₀/ml. Die Versuche zeigten, dass mit dem Ridascreen der

Virustiter aus einer Virussuspension nicht adäquat bestimmt werden konnte, wohingegen er zur Detektion von Rotaviren in Kulturüberständen geeignet war.

4.2 Vorversuche zur RNA- und DNA-Extraktion

Die Effektivität unterschiedlicher, kommerziell erhältlicher Extraktionskits für Nukleinsäuren wurde anhand einer definierten Virusmenge (10^4 KID₅₀/ml) überprüft. Dabei wurde Polio Sabin S als Referenz für RNA und Aujeszky-Virus für DNA eingesetzt. Die Extraktion erfolgte wie unter 3.3.4 beschrieben. Die anschließenden Verdünnungen wurden in DEPC-Wasser durchgeführt. Der Nachweis des Poliovirus fand in einer RT-nested-PCR, der Nachweis des Aujeszky-Virus in einer ersten PCR statt. Die Detektion der Amplifikate erfolgte im Agarosegel.

a) InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Protokoll IV):

Die Extraktion erfolgte aus 200 μ l Virussuspension. Der Ansatz musste in zwei Arbeitsschritten auf die Säule aufgetragen werden. Die Nukleinsäuren wurden abschließend in 100 μ l aufgenommen. Folglich waren rein theoretisch in den 3,5 μ l, die in die anschließende RTnested-PCR eingesetzt wurden, 70 KID₅₀ enthalten. Wie aus der nachfolgenden Tab. 38 hervorgeht, ergab sich für RNA-Viren eine Sensitivität von 7 Äq. KID₅₀. Zum Nachweis der DNA wurden 5 μ l in die PCR eingesetzt. Dem zufolge ergab sich eine Empfindlichkeit von 0,125 Äq. KID₅₀.

RNA- bzw. DNA- Verdünnungen	Polio Sabin S (RT-nested-PCR)	Aujeszky-Virus (PCR)
unverdünnt	+	+
1: 10	+	+
1:100	-	+
1:200	-	+
1:400	-	+
1: 600	-	+
1: 800	-	-
Negativkontrolle	-	-
+: Signal im Agarosegel	-: kein Signal im Agarosegel	

Tab. 38: Ergebnisse der gleichzeitigen Extraktion von Polio Sabin S und Aujeszky-Virus mit dem InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Protokoll IV)

b) InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Sonderprotokoll, Batchverfahren):

Es handelt sich dabei um eine sehr preisgünstige Variante der Nukleinsäureextraktion. Die Nukleinsäuren wurden aus 500 μ l extrahiert und in 50 μ l eluiert. Das Pellet des Trägermaterials ließ sich nur sehr schwer resuspendieren. Im Zusammenhang mit den in der nachfolgenden Tab. 39 dargestellten Ergebnissen ergab sich für die Extraktion von DNA eine Sensitivität von 0,064 Äq. KID₅₀ und für RNA 35 Äq. KID₅₀

Tab. 39:	Ergebnisse	der gleichzeitigen	Extraktion vor	n Polio Sabin	S und Aujeszky-V	irus mit
	dem InViSo	orb Spin DNA Mic	ero Kit III (Bate	chfahren)		

RNA- bzw. DNA- Verdünnungen	Polio Sabin S (RT-nested-PCR)	Aujeszky-Virus (PCR)
unverdünnt	+	+
1: 10	+	+
1:100	-	+
1:200	-	+
1: 1000	-	+
1:2000	-	+
1:4000	-	+
1: 6000	-	+
1: 8000	-	-
Negativkontrolle	-	-

+: Signal im Agarosegel

-: kein Signal im Agarosegel

c) QIAamp DNA Mini Kit:

Zur Durchführung der Extraktion wurden 200 μ l Virussuspension eingesetzt und ebenfalls in 200 μ l eluiert. Es fand demnach keine Aufkonzentrierung der Nukleinsäuren statt. Es ergab sich für die Extraktion von RNA eine Empfindlichkeit von 3,5 Äq. KID₅₀ und für DNA 0,031 Äq. KID₅₀ (s. Tab. 40).

 Tab. 40: Ergebnisse der gleichzeitigen Extraktion von Polio Sabin S und Aujeszky-Virus mit dem QIAamp DNA Mini Kit

RNA- bzw. DNA- Verdünnungen	Polio Sabin S (RT-nested-PCR)	Aujeszky-Virus (PCR)
unverdünnt	+	+
1: 10	+	+
1:100	-	+
1:200	-	+
1:400	-	+
1:600	-	+
1:800	-	+
Negativkontrolle	-	-

+: Signal im Agarosegel -: kein Signal im Agarosegel

d) High Pure Viral Nucleic Acid Kit:

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte aus 200 μ l Virussuspension. Abschließend wurde sie in 50 μ l Puffer eluiert. Die Tab. 41 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese. Es ergab sich eine Sensitivität von 0,125 Äq. KID₅₀ für DNA-Viren und 1,4 Äq. KID₅₀ für RNA-Viren.

RNA- bzw. DNA- Verdünnungen	Polio Sabin S (RT-nested-PCR)	Aujeszky-Virus (PCR)
unverdünnt	+	+
1: 10	+	+
1:100	-	+
1:200	-	+
1:400	-	+
1: 600	-	+
1:800	-	+
Negativkontrolle	-	-

 Tab. 41: Ergebnisse der gleichzeitigen Extraktion von Polio Sabin S und Aujeszky-Virus mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit

+: Signal im Agarosegel -: kein Signal im Agarosegel

e) Phenol-Chloroform Extraktion

Zur RNA-Isolierung wurden 200 μ l Virussuspension eingesetzt. Das Pellet wurde abschließend in 20 μ l DEPC-Wasser resuspendiert. Demnach fand eine Aufkonzentrierung um den Faktor 10 statt, aus dem unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Tab. 42 eine Sensitivität von 35 Äq. KID₅₀ resultierte. Die Extraktion war sehr zeitaufwendig und durch das Abnehmen einer Phase schwierig zu standardisieren. Die Reaktionsgefäße waren durch den Zusatz von Roti-Phenol/Chloroform teilweise undicht. Außerdem mussten die Tubes während der Aufarbeitung häufig geöffnet und geschlossen werden.

Tab. 42: Ergebnisse der Extraktion von Polio Sabin S mit der Phenol-Chloroform-Methode

RNA-Verdünnungen	Polio Sabin S (RT-nested-PCR)
unverdünnt	+
1: 10	+
Negativkontrolle	-

+: Signal im Agarosegel -: kein Signal im Agarosegel

Zusammenfassend zeigte sich, dass zur Extraktion von DNA das Extraktionskit QIAamp DNA Mini Kit und zur Extraktion von RNA das High Pure Viral Nucleic Acid Kit die empfindlichsten Ergebnisse lieferte.

4.3 Vorversuch zum Einsatz von Hybridisierungssonden

In einem ersten Versuch wurde die Verwendung von Hybridisierungssonden im LightCycler exemplarisch mit dem Equinen-Rhinovirus überprüft (s. 3.3.5). Hierzu wurde aus einer Virussuspension von $10^{8,5}$ KID₅₀/ml die RNA extrahiert und nach der RT-Reaktion die verdünnte cDNA in die Reaktion eingesetzt. Die nachfolgende Abb. 6 zeigt das Ergebnis. Die Amplifikate wurden zusätzlich in ein Agarosegel übertragen. Sowohl im LightCycler als auch im Gel war die cDNA-Verdünnung -5 noch leicht positiv.



Abb. 6: Virusnachweis von Equinem-Rhinovirus mit Hybridisierungssonden im LightCycler





Abb. 7: Amplifikate des Equinen-Rhinovirus-Nachweises mit Hybridisierungssonden im LightCycler

In diesem Versuchsansatz wurden aus einer Virussuspension mit dem Titer $10^{8,5}$ KID₅₀/ml 200 µl in die Extraktion eingesetzt und mit 50 µl eluiert. Davon wurden 3,5 µl in einem Ansatz von 20 µl transkribiert. Die im Anschluss daran durchgeführte dekadische Verdünnungsreihe erfolgte in 90 µl Wasser. Abschließend wurden 2 µl cDNA in der LightCycler-Reaktion (20 µl) amplifiziert. Unter Berücksichtigung der einzelnen Arbeitsschritte ergab sich rein rechnerisch eine Nachweisgrenze von 7 Äq. KID₅₀/20 µl PCR-Ansatz. Der kulturelle Virusnachweis war demnach 7-mal sensitiver als das System mit einer Nachweisgrenze von 7 Äq. KID₅₀/20 µl PCR-Ansatz. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung des Nachweises mit Hybridisierungssonden durchgeführt.

4.4 Etablierung der nested-PCR-Systeme

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Versuche, die zur Etablierung und Optimierung der einzelnen Nachweissysteme durchgeführt wurden, dargestellt. Ziel der Optimierungsversuche war es, ein möglichst sensitives System zu etablieren, dessen Empfindlichkeit mindestens der des kulturellen Nachweises entsprach.

4.4.1 Equines-Rhinovirus

Ziel der folgenden Vorversuche war es, ein empfindliches Testsystem zu entwickeln, mit dessen Hilfe eine mögliche Inhibition der RT-nested-PCR Reaktion aus Umweltproben überprüft werden konnte. Anhand eines externen Standards sollte das Ausmaß der Reaktionshemmung ermittelt werden. Die Primer wurden anhand der Sequenz X 96870 mit Vector NTI ausgewählt und zeigten bei der Überprüfung der Spezifität unter Verwendung der Datenbank (Blast) keine Kreuzreaktionen mit einem der in dieser Arbeit nachzuweisenden Erreger. Des Weiteren neigten die Primer nach der Softwareauswertung nicht zur Bildung von Dimeren.

4.4.1.1 Optimierung der ersten PCR

Für die erste PCR wurden die Annealingtemperaturen 50, 55 und 60 °C gewählt. Es wurde aus einer Suspension mit 10^4 KID₅₀/ml extrahiert. Anschließend fand die Amplifikation der cDNA nach dem unter 3.3.6.1.1 beschriebenen Temperaturprofil statt. Die Abb. 8 zeigt für alle Annealingtemperaturen eine gleich stark ausgebildete Bande bei ca. 300 bp.



Bahn 1: 50 °C Bahn 2: 55 °C Bahn 3: 60 °C Bahn 4: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 8: Amplifikate der ersten PCR von Equinem-Rhinovirus bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen

4.4.1.2 Virusnachweis mit SYBR Green I und Bestimmung der Sensitivität

Die Sensitivität des Nachweissystems unter Verwendung des LightCycler-DNA Master SYBR Green I Kits wurde bestimmt, indem die Nukleinsäuren aus den Ansätzen 10^1 , 10^2 , 10^3 und 10^4 KID₅₀/ml isoliert und, wie unter 3.3.6.1.2 beschrieben, in die RT-nested-PCR eingesetzt wurden. Die beiden nachfolgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis dieses Laufes. Die Schmelzkurvenanalyse ergab bei allen untersuchten Ansätzen einen spezifischen Peak bei 87,5 °C (s. Abb. 9). Rein rechnerisch ließ sich eine Nachweisempfindlichkeit von ca. 10^{-3} (0,00084) Äq. KID₅₀/20µl PCR-Ansatz ermitteln. Der molekularbiologische Nachweis war demnach prinzipiell um drei Zehnerpotenzen sensitiver als die Zellkultur. Abb. 10 stellt den PCR-Verlauf bzw. das Gesamtsignal der sich gebildeten Produkte dar. Es zeigte sich, dass die Kurven aller Verdünnungen zum gleichen Zeitpunkt anstiegen.



Abb. 9: Schmelzkurven der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität



Abb. 10: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

Die Amplifikate der ersten und zweiten PCR wurden zusätzlich im Agarosegel detektiert. Abb. 11 zeigt das Ergebnis. Demnach war die zweite PCR um drei Zehnerpotenzen sensitiver als die erste PCR.



Abb. 11: Amplifikate der ersten und zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

4.4.1.3 Optimierung der zweiten PCR

Im Folgenden wurde ein Versuch zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration durchgeführt. Als Template wurden 2 μ l der ersten PCR (Annealing 55 °C) aus dem Versuch zur Annealingtemperatur der ersten PCR eingesetzt (s. 3.3.6.1.1) und, wie unter 3.3.6.1.3 beschrieben, mit den verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen amplifiziert. Die Abb. 12 und Abb. 13 zeigen die Resultate im LightCycler. Alle Ansätze, mit Ausnahme der Negativkontrolle, zeigten bei ca. 87.5 °C einen spezifischen Peak. Die Amplifikate wurden zusätzlich im Agarosegel überprüft und sind in Abb. 14 zu sehen. Der höchste Peak (Abb. 12) war bei einer Konzentration von 4 mM zu beobachten. Bei der Messung des Gesamtsignals zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 4 mM die Kurve als erstes anstieg.



Abb. 12: Schmelzkurven der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 13: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Bahn 1: 2 mM Bahn 2: 3 mM Bahn 3: 4 mM Bahn 4: 5 mM Bahn 5: 6 mM Bahn 5: 6 mM Bahn 6: 7 mM Bahn 7: 8 mM Bahn 8: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 14: Amplifikate der zweiten PCR im LightCycler von Equinem-Rhinovirus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

4.4.1.4 Etablierung des Standards

Um die Sensitivität der endgültigen Methode zum Nachweis des Spikes zu bestimmen, wurden die Ansätze 1 bis 4 (10^5 bis 10^2 KID₅₀/ml) des Standards wie unter 3.3.6.1.4 beschrieben amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 und Abb. 16 dargestellt. Alle Ansätze zeigten bei einer Schmelztemperatur von 87,5 °C einen spezifischen Peak. Die Sensitivität entsprach somit dem Ergebnis aus 4.4.1.2. Bei der Betrachtung des Gesamtsignals (Abb. 16) fiel die hohe Fluoreszenz in Zyklus 1 auf. Des Weiteren befanden sich die Kurven in Zyklus 50 bereits in der Plateauphase.



Abb. 15: Schmelzkurven der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus unterschiedlicher Konzentrationen zur Etablierung des Standards



Abb. 16: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Equinem-Rhinovirus unterschiedlicher Konzentrationen zur Etablierung des Standards

In einer zweiten Reaktion wurden die Produkte der Ansätze 1 bis 3 (10⁵ bis 10³ KID₅₀/ml) aus der ersten PCR 1:2 verdünnt. Die zweite PCR wurde unter Verwendung des FastStart DNA Master SYBR Green I Kit durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 22 Zyklen gestoppt. Die Ergebnisse zeigen die nachfolgenden beiden Abbildungen (Abb. 17 und Abb. 18). Die gleichmäßigen Kurvenverläufe sind in beiden Darstellungen deutlich zu erkennen. Neben dem spezifischen Peak tauchte nur bei 82 °C ein weiterer kleiner auf. Bei der Dokumentation des Gesamtsignals während der Amplifikation verließ der Standard 1 ab Zyklus 8, Standard 2 ab Zyklus 12 und Standard 3 ab Zyklus 15 die Nulllinie.



Abb. 17: Schmelzkurven der zweiten PCR des verdünnten Equinen-Rhinovirus-Standards



Abb. 18: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR des verdünnten Equinen-Rhinovirus-Standards

4.4.1.5 Endgültiges Protokoll

Nach der Auswertung aller Vorversuche zur Optimierung des Nachweissystems wurde die RT-nested-PCR nach dem unter 3.3.6.1.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 8 ergaben, dass bei verschiedenen Annealingtemperaturen für die erste PCR keine sichtbaren Unterschiede erkennbar wurden. Aufgrund der errechneten Optima für die Schmelztemperaturen der beiden Primer wurde eine Temperatur von 55 °C gewählt. Die erste Amplifikation wurde nach 20 Zyklen abgebrochen, da die Ergebnisse in Abb. 10 gezeigt hatten gezeigt, dass sich die PCR-Reaktion nach 30 Zyklen bereits in der Plateauphase befand und damit eine Quantifizierung in der nachfolgenden nested-PCR unmöglich war. Durch die Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kits entstanden weniger Nebenprodukte (vergl. Abb. 9 und Abb. 17). Er wurde für alle weiteren Erregernachweise im LightCycler eingesetzt. Aufgrund der Ergebnisse, die in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt sind, wurde die MgCl₂-Konzentration mit 4 mM festgelegt. Wie in Abb. 18 ersichtlich, ging die zweite PCR ab Zyklus 22 in die Plateauphase über. Deshalb wurde für die Quantifizierung die Reaktion zu diesem Zeitpunkt abgebrochen und sofort im Anschluss daran eine zweite Schmelzkurvenanalyse ab 80 °C durchgeführt. Die Quantifizierung sollte später anhand der Fläche unter dem spezifischen Peak erfolgen.

4.4.2 Humane Enteroviren

Für den Nachweis wurden die Primer der ersten PCR aus der Publikation von SCHWEIGER et al. (1994) verwendet. Da mit Ausnahme des Temperaturprofils keine Angaben zur Durchführung der PCR gemacht wurden, musste die MgCl₂-Konzentration für die erste Amplifikation bestimmt werden. Die Sequenzen der Primer für die zweite PCR wurden nach einem Sequenzvergleich unterschiedlicher humaner Enteroviren innerhalb der homologen Abschnitte gewählt. Die Überprüfung der Spezifität unter Verwendung der Datenbank zeigte keine relevanten Kreuzreaktionen. Des Weiteren neigten die Sonden nach der Softwareauswertung nicht zur Bildung von Dimeren.

4.4.2.1 Optimierung der ersten PCR

Nachdem die Nukleinsäure aus einer Virussuspension mit 10^4 KID₅₀/ml extrahiert und transkribiert war, wurde die erste PCR mit den Annealingtemperaturen 50, 55 und 60 °C gefahren. Die Amplifikate wurden im Agarosegel detektiert. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt. Die sichtbare Bande bei ca. 450 bp war bei allen Temperaturen gleich stark.



Bahn 1: 50 °C Bahn 2: 55 °C Bahn 3: 60 °C Bahn 4: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 19: Amplifikate der ersten PCR von Polio Sabin S bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen

In einem zweiten Optimierungsversuch wurden die MgCl₂-Konzentrationen 1,5, 2, 2,5 und 3 mM gewählt. Dazu wurde das Amplifikat der ersten PCR des ersten Versuches zur Annealingtemperatur (55 °C) eingesetzt. Das Ergebnis zeigt Abb. 20. Bei einer Konzentration von 3 mM erschien kein Signal im Agarosegel. Bei den restlichen Konzentrationen zeigte sich kein Unterschied in der Signalstärke. Bei den wolkigen Aufhellungen am unteren Rand des Bildes handelt es sich um Reste des Mastermixes (Primer, dNTPs).



Bahn 1: 1,5 mM Bahn 2: 2 mM Bahn 3: 2,5 mM Bahn 4: 3 mM Bahn 5: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 20: Amplifikate der ersten PCR von Polio Sabin S bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen

4.4.2.2 Optimierung der zweiten PCR und Bestimmung der Sensitivität

Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration der zweiten PCR im LightCycler wurden zwei Versuche durchgeführt. In einem ersten Lauf wurde der Mastermix mit den Konzentrationen 2, 3, bis 8 mM pipettiert. Es wurde das PCR-Produkt, das aus einer Suspension mit dem Titer 10^3 KID₅₀/ml hervorging, verwendet. Aus der Abb. 21 geht hervor, dass bei allen eingesetzten MgCl₂-Konzentrationen ein spezifischer Peak bei ca. 89 °C erschien, der bei 2 mM am höchsten war. Bei der Messung des Gesamtsignals (Abb. 22) stieg die Kurve des Ansatzes mit einer Konzentration von 4 mM als erste an. Die beiden Kurven der Konzentrationen 3 und 2 mM lieferten hingegen einen gleichmäßigeren Verlauf und erreichten noch während der exponentiellen Phase ein stärkeres Fluoreszenzsignal als die der anderen Konzentrationen.



Abb. 21: Schmelzkurven der zweiten PCR von Polio Sabin S bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 22: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Polio Sabin S bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

Aufgrund der Ergebnisse, die in den beiden Abbildungen Abb. 21 und Abb. 22 zu sehen sind, wurde der Versuch mit den MgCl₂-Konzentrationen 2, 3 und 4 mM wiederholt. Dazu wurde

die RNA aus den Ansätzen 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 KID₅₀/ml isoliert und, wie unter 3.3.6.2.2 beschrieben, amplifiziert. Aus Gründen der Übersicht wurden die Ergebnisse der verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen einzeln dargestellt. Beim Vergleich der Schmelzkurvenanalysen in den Abbildungen Abb.23, Abb. 25 und Abb. 27 zeigte sich, dass bei allen Konzentrationen bis zum Ansatz 10^3 KID₅₀/ml ein spezifischer Peak auftrat, wobei die Höhe der Peaks bei 4 mM am niedrigsten war. Die Abbildungen Abb. 24, Abb. 26 und Abb. 28 dokumentieren den Verlauf der PCR Reaktion. Aus ihnen geht hervor, dass die Kurven bei einer Konzentration von 2 mM sehr gleichmäßig verliefen und bei den unterschiedlichen Viruskonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten anstiegen.



Abb. 23: Schmelzkurven der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 2 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 24: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 2 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 25: Schmelzkurven der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 3 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 26: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 3 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 27: Schmelzkurven der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 28: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ im LightCycler

Im Anschluss an die Versuche zur MgCl₂-Konzentration wurde ein Versuch zur Annealingtemperatur durchgeführt. Dieselben Ansätze wurden bei einer MgCl₂-Konzentration von 2 mM und einer Annealingtemperatur von 50 °C im LightCycler amplifiziert und detektiert. In den folgenden beiden Abbildungen Abb. 29 und Abb. 30 ist das Resultat graphisch dargestellt. Beim Vergleich der beiden Abbildungen Abb. 23 und Abb. 29 wird deutlich, dass bei einer Annealingtemperatur von 50 °C die Konzentration 10^2 KID₅₀/ml eindeutig ein spezifisches Signal lieferte. Die Nachweisgrenze konnte somit um eine Zehnerpotenz gesenkt werden.

Rein rechnerisch ergab sich, unter Berücksichtigung aller Arbeitsschritte, eine Sensitivität von 10^{-2} (0,0084) Äq. KID₅₀/20µl PCR-Ansatz, die damit prinzipiell zwei Zehnerpotenzen über dem kulturellen Nachweis lag.



Abb. 29: Schmelzkurven der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 50 °C Annealing im LightCycler



Abb. 30: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Polio Sabin S unterschiedlicher Konzentrationen bei 50 °C Annealing im LightCycler

4.4.2.3 Etablierung des Standards

Um eine Quantifizierung der möglicherweise nachgewiesenen Erreger durchführen zu können, wurde ein externer Standard für die nested-PCR etabliert. Hierzu wurden die Ansätze 1 bis 4 $(10^5 \text{ bis } 10^2 \text{ KID}_{50}/\text{ml})$ wie unter 4.3.6.2.3 amplifiziert und die PCR-Produkte vor der zweiten PCR 1:2 in DEPC-Wasser verdünnt. Alle Ansätze hatten bei 88 °C einen spezifischen Peak (s. Abb. 31). Die Abb. 32 zeigt den Verlauf der PCR-Reaktion. Die Ansätze ergaben einen gleichmäßigen Kurvenverlauf, wobei die Kurven der unterschiedlichen Viruskonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von ca. drei Zyklen anstiegen.



Abb. 31: Schmelzkurven der zweiten PCR des humanen Enteroviren-Standards



Abb. 32: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR des humanen Enteroviren-Standards

4.4.2.4 Endgültiges Protokoll

Nach den Vorversuchen zur Etablierung der ersten PCR wurde eine Annealingtemperatur von 55 °C und eine MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM gewählt. Wie schon beim Nachweis des Equinen-Rhinovirus ließen die verschiedenen Annealingtemperaturen keine sichtbaren Unterschiede erkennen (s. Abb. 19). Die Ergebnisse des Versuches zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration in Abb. 20 zeigten für 1,5, 2 und 2,5 mM ebenfalls keinen Unterschied. Die zweite Amplifikation wurde mit einer MgCl₂-Konzentration von 2 mM gefahren. Aus den Abbildungen Abb. 23 und Abb. 24 ging hervor, dass hier die Kurven ab Zyklus 9 anstiegen, den gleichmäßigsten Verlauf hatten und das spezifische Signal am höchsten war. Die Sensitivität konnte bei einer Annealingtemperatur von 50 °C um eine Zehnerpotenz gesteigert werden (s. Abb. 29) und wurde somit für die Reaktion gewählt. Die zweite PCR wurde aufgrund der Ergebnisse in Abb. 32 nach dem 26. Zyklus beendet. Für die Quantifizierung wurde entsprechend dem Nachweis von Equinem-Rhinovirus eine zweite Schmelzkurvenanalyse ab 80°C durchgeführt.

4.4.3 Hepatitis A-Virus

Der molekularbiologische Erregernachweis wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von GILGEN et al. (1997) durchgeführt. Es wurde nur die MgCl₂-Konzentration in einem Vorversuch für die Reaktion im LightCycler angepasst.

4.4.3.1 Optimierung der zweiten PCR

Aus einer Virussuspension mit 5 x 10^7 Genkopien/ml wurde die RNA isoliert und nach der RT-Reaktion, entsprechend den Angaben unter 3.3.6.4.1, amplifiziert. Für die zweite PCR wurde der Prämix mit den MgCl₂-Konzentrationen 2 bis 8 mM angesetzt. Das Ergebnis in Abb. 33 zeigt, dass bei allen Konzentrationen ein spezifisches Produkt gebildet wurde, dessen Schmelztemperatur bei 82 °C lag. Des Weiteren stieg die Kurve des Ansatzes mit 3 mM als erste an (s. Abb. 34). Die Kurven befanden sich bereits ab Zyklus 20 in der Plateauphase.



Abb. 33: Schmelzkurven der zweiten PCR von Hepatitis A-Virus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 34: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Hepatitis A-Virus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

4.4.3.2 Bestimmung der Sensitivität

Um die Sensitivität des Nachweises zu ermitteln, wurde die RNA aus einer Suspension mit einem Titer zwischen 5 x 10^7 und 5 x 10^8 Genkopien/ml extrahiert und transkribiert. Aus der cDNA wurde anschließend eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -6) angelegt, indem mit 9 µl vorgelegt wurde. Die nested-PCR folgte dem unter 3.3.6.4.3 beschriebenen Protokoll. Bei der Auswertung der Schmelzkurven zeigten die unverdünnte cDNA und die Verdünnungen -1 bis -4 einen Peak bei ca. 82 °C, wohingegen die Verdünnung -5 und -6 und die Negativkontrolle keinen aufwiesen. Die Dokumentation des Fluoreszenzsignals (Abb. 36) ergab, dass die Kurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten anstiegen und einen gleichmäßigen Verlauf hatten. Rechnerisch ergab sich, unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte, eine Nachweisgrenze zwischen 0,42 und 4,2 Genkopien/20µl PCR-Ansatz.



Abb. 35: Schmelzkurven der zweiten PCR von Hepatitis A-Virus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität



Abb. 36: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Hepatitis A-Virus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

4.4.3.3 Endgültiges Protokoll

Die erste PCR wurde in Anlehnung an die Publikation von GILGEN et al. (1997) mit einer Annealingtemperatur von 55 °C und einer MgCl₂-Konzentration von 3 mM durchgeführt, wobei die Reaktion entsprechend den anderen Nachweisen bereits nach 20 Zyklen abgebrochen wurde. Für die zweite Amplifikation wurde eine MgCl₂-Konzentration von 3 mM gewählt, da aus Abb. 34 hervor ging, dass mit dieser Konzentration die Kurve als erste anstieg. Um die maximale Empfindlichkeit des Nachweissystems zu erreichen, wurde die zweite PCR für 27 Zyklen gefahren. Die Quantifizierung aller positiven Proben sollte dann im Anschluss in einer gemeinsamen Reaktion erfolgen.

4.4.4 Hepatitis B-Virus

Zum Nachweis von Hepatitis B-Virus wurde ebenfalls nur die MgCl₂-Konzentration für die Reaktion im LightCycler optimiert. Die Sequenzen der Primer wurden der Veröffentlichung von KANEKO et al. (1989) und die Parameter der ersten PCR von DOUGLAS et al. (1993) entnommen. Als Template für die Versuche wurde der unter 3.3.6.5 beschriebene Eurohep Standard No. 1 mit einer Konzentration von 2,7 x 10^9 Moleküle/ml verwendet. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis -9) des Standardserums angelegt, indem 900 µl vorgelegt wurden. Anschließend wurden die DNA der einzelnen Verdünnungen extrahiert.

4.4.4.1 Optimierung der zweiten PCR

Der Mastermix wurde mit den MgCl₂-Konzentrationen 2, 3 bis 8 mM pipettiert und die erste PCR der Verdünnung -5 als Template eingesetzt. Das Ergebnis zeigen die Abbildungen Abb. 37 und Abb. 38. Die Schmelztemperatur des 258 bp Amplikons betrug ca. 86 °C. Alle Ansätze lieferten den spezifischen Peak. Bei 3 mM stieg die Kurve als erstes an und ergab die höchsten gemessenen Fluoreszenzwerte.



Abb. 37: Schmelzkurven der zweiten PCR von Hepatitis B-Virus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 38: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Hepatitis B-Virus bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

4.4.4.2 Bestimmung der Sensitivität

Die Sensitivität der PCR wurde anhand der DNA-Verdünnungsreihe (-3 bis -8) bestimmt, die direkt in die nested-PCR eingesetzt wurde. Aus Abb. 39 geht hervor, dass die Verdünnungen -3 bis -7 in der nested-PCR ein positives Signal lieferten. Die Abb. 40 zeigt gleichmäßige Reaktionsverläufe, wobei die Plateauphase für die Verdünnungen -3 bis -6 bereits in Zyklus 25 erreicht war. Die Amplifikate der zweiten PCR wurden zusätzlich in ein Agarosegel übertragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung ist in Abb. 41 dargestellt und entsprach dem Ergebnis im LightCycler. Das spezifische Signal war bei ca. 300 bp für die Verdünnungen -3 bis -7 deutlich sichtbar. Es konnte eine rechnerische Sensitivität von 0,22 Kopie/ 20 µl PCR-Ansatz ermittelt werden.



Abb. 39: Schmelzkurven der zweiten PCR von Hepatitis B-Virus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität



Abb. 40: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Hepatitis B-Virus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität



Abb. 41: Amplifikate der zweiten PCR im LightCycler von Hepatitis B-Virus unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

4.4.4.3 Endgültiges Protokoll

Die Parameter für die erste PCR wurden aus der Veröffentlichung von DOUGLAS et al. (1993) entnommen. Es wurden 5 μ l DNA mit einer MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM und einer Annealingtemperatur von 55 °C für 20 Zyklen amplifiziert. Die Ergebnisse in Abb. 37 und Abb. 38 zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration der zweiten PCR zeigten, dass bei 3 mM die Kurve als erste anstieg und die höchsten gemessenen Fluoreszenzwerte ergab. Um die Sensitivität des Nachweises möglichst auszuschöpfen, wurde die zweite PCR für 30 Zyklen durchgeführt. Eine Quantifizierung sollte wie auch beim Hepatitis A-Virus erst nach Abschluss aller Untersuchungen erfolgen.

4.4.5 Rotaviren

Zur Etablierung eines sensitiven Testsystems zur Detektion von Rotaviren der Gruppe A wurden zahlreiche Vorversuche durchgeführt. In einer ersten Versuchsreihe wurde die von GILGEN et al. (1997) beschriebene nested-PCR getestet und Versuche zur Optimierung angesetzt. Um die Sensitivität des molekularbiologischen Nachweises zu steigern, wurden neue Sondenpaare ausgewählt und für die RT-nested-PCR verwendet. Abschließend wurden verschiedene Primerkombinationen für die beiden PCR-Reaktionen getestet und der Nachweis mit den geeignetsten Paaren optimiert.

4.4.5.1 Optimierung der PCR aus der Literatur

Die von GILGEN et al. (1997) veröffentlichten Sequenzen der Primer RV-1 bis RV-4 stammen aus der hochkonservierten VP7-Region und sind damit zum spezifischen Nachweis von Rotaviren der Gruppe A geeignet. Bei der Überprüfung der Primer auf die Bildung von Dimeren zeigte sich, dass Dimerenbildung zwischen den Sonden RV-1 und RV-2 potentiell möglich war, wohingegen die Primer für die zweite PCR nicht dazu neigten. Weiterhin bestand die Möglichkeit der Primer RV-2 und RV-3 mit sich selbst Dimere zu bilden. Den beiden anderen Sonden RV-1 und RV-4 war dies theoretisch nicht möglich.

4.4.5.1.1 Optimierung der ersten PCR

Die Nukleinsäure wurde aus den Virussuspensionen 10^4 , $10^{5,5}$, $10^{6,5}$ und $10^{7,5}$ KID₅₀/ml extrahiert und mit dem Primer RV-1 in die RT-Reaktion eingesetzt. In einer ersten Reaktion wurde das Temperaturprogramm entsprechend der Veröffentlichung von GILGEN et al. (1997) gefahren. Die gelelektrophoretische Auftrennung ist in Abb. 42 dargestellt und ergab nur beim Ansatz 4 ($10^{7,5}$ KID₅₀/ml) eine sichtbare Bande mit ca. 1000 bp. Für die erste PCR ergab sich eine rechnerisch ermittelte Sensitivität von $10^{4,8}$ Äq. KID₅₀/50 µl PCR-Ansatz. Die theoretische Steigerung der Sensitivität um max. drei Zehnerpotenzen nach einer zweiten Amplifikation hätte eine Nachweisgrenze ergeben, die der kulturellen Isolierung entspräche. Daher wurden zwei weitere Versuche zur Optimierung des Temperaturprofils durchgeführt (3.3.6.6.1.1).



Abb. 42: Amplifikate der ersten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen

Bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und 55 °C mit Zeitverlängerung während der Elongation konnte die Sensitivität nicht gesteigert werden. Die PCR-Produkte beider Versuche wurden im Agarosegel detektiert und entsprachen dem Ergebnis in Abb. 44. Um zu überprüfen, ob in den im Agarosegel negativen Ansätze überhaupt eine erste Amplifikation stattgefunden hatte, wurden die PCR-Produkte der ersten PCR des dritten Versuches ("*timeincrement*") unter Verwendung der Primer RV-3 und RV-4 im LightCycler detektiert. Das Ergebnis in Abb. 43 zeigt die Schmelzkurvenanalyse. Alle untersuchten Virussuspensionen hatten bei 81,5 °C einen spezifischen Peak. Zur Kontrolle wurden die Amplifikate der zweiten PCR in ein Agarosegel übertragen (s. Abb. 44). Die Ergebnisse der Gelelektrophorese entsprachen demnach den Schmelzkurven. Alle Ansätze hatten eine spezifische Bande bei 350 bp.



Abb. 43: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen



Bahn 1: 10^4 KID₅₀/ml Bahn 2: $10^{5,5}$ KID₅₀/ml Bahn 3: $10^{5,5}$ KID₅₀/ml Bahn 4: $10^{6,5}$ KID₅₀/ml Bahn 5: $10^{7,5}$ KID₅₀/ml Bahn 6: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 44: Amplifikate der zweiten PCR im LightCycler von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen

4.4.5.1.2 Optimierung der zweiten PCR

Zur Ermittlung der besten MgCl₂-Konzentration für die zweite Amplifikation im LightCycler wurden mehrere Vorversuche durchgeführt (s. 3.3.6.6.1.2). In einem ersten Versuch wurde die erste PCR, die aus einer Virussuspension (10^4 KID₅₀/ml) und unter Verwendung der Primer RV-1/RV-2 hervorging, als Template in den LightCycler mit dem LightCycler-DNA

Master SYBR Green I Kit eingesetzt. Der Mastermix wurde mit den MgCl₂-Konzentrationen 2, 3 bis 8 mM pipettiert. Die nachfolgenden beiden Abbildungen zeigen das Resultat. Die Schmelzkurvenanalyse (Abb. 45) zeigt, dass, mit Ausnahme der Ansätze 2 und 8 mM, ein spezifisches Produkt gebildet wurde. Aus Abb. 46 geht hervor, dass bei einer MgCl₂-Konzentration von 7 mM die Kurve in Zyklus 22 als erste anstieg.



Abb. 45: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 46: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

Die MgCl₂-Konzentration von 7 mM wurde in einem weiteren Versuch nochmals überprüft, indem unterschiedliche Viruskonzentrationen $(10^2, 10^3 \text{ und } 10^4 \text{ KID}_{50}/\text{ml})$ isoliert und ampli-

fiziert wurden. Aus Abb. 47 geht hervor, dass nur bei einer Konzentration von 10^4 KID₅₀/ml ein spezifisches PCR-Produkt gebildet worden war. Des Weiteren zeigte sich kein gleichmäßiger Verlauf während der Amplifikation (s. Abb. 48) und eine geringere Gesamtfluoreszenz als in Abb. 47.



Abb. 47: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 7 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 48: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 7 mM MgCl₂ im LightCycler

Aufgrund der Ergebnisse in den beiden zuvor durchgeführten Versuchen wurde ein weiterer Vorversuch angesetzt. Um zusätzlich eine mögliche Sensitivitätssteigerung des Testsystems zu erreichen, wurde die erste PCR nach dem "*hot-start*"-Prinzip gefahren. Als Template wur-

de die cDNA aus den verschiedenen Virussuspensionen $(10^2, 10^3, 10^4 \text{ und } 10^5 \text{ KID}_{50}/\text{ml})$ verwendet. Die zweite PCR im LightCycler wurde mit den MgCl₂-Konzentrationen 4 und 7 mM pipettiert. Das Ergebnis zeigen die Abbildungen Abb. 49 bis Abb. 52. Aus Gründen der Übersicht wurden die Ansätze mit den unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen in getrennten Graphiken dargestellt. Die Virussuspensionen 10^2 und 10^3 KID₅₀/ml waren mit beiden MgCl₂-Konzentrationen negativ. Die Sensitivität ließ sich demnach auch durch eine "*hot-start*"-PCR nicht steigern. Die Dokumentation des Gesamtsignals in Abb. 52 zeigte, dass bei 7 mM die Kurven als erste ansteigen, wobei bei einer Konzentration von 4 mM die Kurven eine größere Steigung, eine stärker ausgeprägte exponentielle Phase und höhere Fluoreszenzwerte erreichten.



Abb. 49: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 50: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 51: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 7 mM MgCl₂ im LightCycler



Abb. 52: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 7 mM MgCl₂ im LightCycler

In der nachfolgenden Abb. 53 wurden die Amplifikate des LightCyclers im Agarosegel aufgetrennt. Es zeigte sich, dass bei einer MgCl₂-Konzentration von 4 mM die Banden stärker ausgeprägt waren. Entsprechend den Ergebnissen im LightCycler waren bei beiden Konzentrationen die Ansätze 10^2 und 10^3 KID₅₀/ml ohne sichtbares Signal.



```
Bahn 1: 10^{2} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 2: 10^{3} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 3: 10^{4} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 4: 10^{5} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 5: 10^{2} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 6: 10^{3} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 7: 10^{4} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 8: 10^{5} KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 9: neg. Kontrolle
M: 100 bp Marker
```

Bahn 1 bis 4: 7 mM MgCl₂ Bahn 5 bis 8: 4 mM MgCl₂



In einem letzten Versuch wurde die zweite PCR mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit und einer MgCl₂-Konznetration von 4 mM pipettiert. Das Ergebnis, das in den beiden Abbildungen Abb. 54 und Abb. 55 dargestellt ist, ergab, dass auch unter Verwendung der FastStart-Technik in der zweiten Amplifikation die Nachweisgrenze nicht gesenkt werden konnte. Die Kurven des Gesamtsignals stiegen erst ab Zyklus 48 an.



Abb. 54: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ und FastStart-Technik im LightCycler


Abb. 55: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 mM MgCl₂ und FastStart-Technik im LightCycler

4.4.5.2 Optimierung der PCR mit neuen Primern

Da mit den durchgeführten Vorversuchen zur Optimierung der nested-PCR aus der Literatur (4.4.5.1) keine Sensitivitätssteigerung erreicht wurde, wurden neue Primer aus der VP7-Region ausgewählt, indem Sequenzen verschiedener Rotaviren der Gruppe A verglichen wurden. Die Sonden RVA-1/RVA-2 und RVI-1/RVI-2 wurden aus den homologen Bereichen gewählt. Zur Sicherheit wurden sie unter Verwendung der Datenbank auf ihre Spezifität getestet und auf die Bildung von Primerdimeren überprüft. Die Möglichkeit der Dimerenbildung bestand zwischen den Primern RVI-1/RVI-2 und der Sonde RVA-1 mit sich selbst.

4.4.5.2.1 Optimierung der ersten PCR

Nachdem die RNA aus den Suspensionen 10^2 , 10^3 und 10^4 KID₅₀/ml isoliert und mit dem Primer RVA-2 transkribiert war, wurde sie in die erste PCR mit den Annealingtemperaturen 50, 55 und 60 °C, wie unter 3.3.6.6.2.1 beschrieben, eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend im LightCycler mit den Sonden RVI-1 und RVI-2 amplifiziert und detektiert. In den Abbildungen Abb. 56 und Abb. 57 ist das Ergebnis bei 50 °C Annealing dargestellt. Aus dem Protokoll der Schmelzkurvenanalyse ergaben sich zwei spezifische Peaks; bei 81 und 82 °C. Die beiden Amplifikate wurde in ein Agarosegel übertragen (s. Abb. 58). Somit hatte das 398 bp große Amplikon der zweiten PCR eine Schmelztemperatur von 82 °C.



Abb. 56: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen und 50 °C Annealing in der ersten PCR



Abb. 57: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen und 50 °C Annealing in der ersten PCR



Bahn 1: 10^4 KID₅₀/ml Bahn 2: 10^3 KID₅₀/ml Bahn 3: 10^2 KID₅₀/ml Bahn 4: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker



Die Amplifikation der ersten PCR mit den Temperaturen 55 und 60 °C erfolgte im Light-Cycler in einer zweiten Reaktion und ist in Abb. 59 und Abb. 60 dokumentiert. Aus Abb. 60 geht hervor, dass der Verlauf der Reaktion für beide Annealingtemperaturen gleich war. Die Kurven stiegen, im Gegensatz zu Abb. 57, in Zyklus 32 an. Bei der Schmelzkurvenanalyse ergaben sich bei ca. 80 und 83 °C zusätzliche unspezifische Peaks.



Abb. 59: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 55 und 60 °C Annealing im LightCycler



Abb. 60: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 55 und 60 °C Annealing im LightCycler

Durch die Wahl unterschiedlicher Annealingtemperaturen bei der ersten PCR ließ sich die Sensitivität des Testsystems nicht steigern. Bei allen durchgeführten Vorversuchen war die Virussuspension mit 10^4 KID₅₀/ml in der RT-nested-PCR positiv. Die anderen Ansätze blieben ohne spezifisches Signal.

4.4.5.2.2 Optimierung der zweiten PCR

Zur Optimierung der Annealingtemperatur der zweiten PCR wurden die Temperaturen 50, 55 und 60 °C gewählt. Dabei wurden die Amplifikate der ersten PCR des Vorversuchs zur Annealingtemperatur der ersten PCR mit den Sonden RVA-1/RVA-2 (s. oben) eingesetzt. In den Abbildungen Abb. 60 bis Abb. 63 sind die Schmelzkurven der Versuche dargestellt. In allen drei Versuchen hatte nur der Ansatz 3 (10^4 KID₅₀/ml) einen spezifischen Peak bei ca. 82 °C. Im Versuch mit 50 °C Annealing wurde zusätzlich ein Peak bei 81 °C verzeichnet, der jedoch im Agarosegel keine spezifische Bande bei 389 bp lieferte. Die Ansätze 3 aller Annealingtemperaturen zeigten im Gel eine sichtbare Bande, die beim Ansatz mit 60 °C Annealing etwas schwächer ausgebildet war (s. Abb. 64). Zusätzlich war ein schwaches Signal bei ca. 250 bp beim Ansatz mit 50 °C, obwohl bei der Schmelzkurvenanalyse kein zweiter Peak verzeichnet wurde.



Abb. 61: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 50 °C Annealing im LightCycler



Abb. 62: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 55 °C Annealing im LightCycler



Abb. 63: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 60 °C Annealing im LightCycler



```
Bahn 1: 50 °C, 10^4 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 2: 60 °C, 10^4 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 3: 55 °C, 10^4 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 4: 50 °C, 10^3 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 5: 60 °C, 10^3 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 6: 55 °C, 10^3 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 7: 50 °C, 10^2 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 8: 60 °C, 10^2 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 9: 55 °C, 10^2 KID<sub>50</sub>/ml
Bahn 10: neg. Kontrolle
M: 100 bp Marker
```

Abb. 64: Amplifikate der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 50, 55 und 60 °C Annealing im LightCycler

Die Abbildungen Abb. 65 bis Abb. 67 zeigen, dass in allen Versuchen die Kurven ab Zyklus 31 anstiegen und denselben Kurvenverlauf hatten.



Abb. 65: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 50 °C Annealing im LightCycler



Abb. 66: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 55 °C Annealing im LightCycler



Abb. 67: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 60 °C Annealing im LightCycler

Es wurde überprüft, ob sich durch Optimierung der MgCl₂-Konzentration in der zweiten PCR die Empfindlichkeit des Nachweises steigern ließ. Hierzu wurde der Prämix mit den Konzentrationen 2, 3 bis 8 mM pipettiert. Es wurde das PCR-Produkt, das aus einer Virussuspension mit 10^4 KID₅₀/ml hervorging, eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 68 und Abb. 69 dargestellt. Mit Ausnahme der Konzentration 2 mM lieferten alle Ansätze einen spezifischen Peak, der bei 4 mM am höchsten war. Auffallend war die geringe Gesamtfluoreszenz aller Ansätze.



Abb. 68: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 69: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

4.4.5.3 Auswahl neuer Primerkombinationen

Ziel der folgenden Vorversuche war es, durch geeignete Kombinationen aller bisher verwendeten und des zusätzlich ausgewählten Primers RVA-3 die Nachweisgrenze der RTnested-PCR unter die des kulturellen Erregernachweises zu senken. Bei der Überprüfung der Sondenpaare auf die Möglichkeit zur Bildung von Dimeren ergab sich folgendes: Die Sonden RV-2, RVA-1, RVA-3 und RV-3 waren theoretisch in der Lage mit sich selbst Dimere zu bilden, wohingegen es den Primern RVI-1, RV-1, RVA-2, RVI-2 und RV-4 nicht möglich war. Bei den Primerkombinationen war Dimerenbildung bei den Paaren RV-2/RV-1, RV-2/RVA-2, RVA-1/RV-1, RVI-1/RVI-2 wahrscheinlich, bei den Sondenpaaren RV-3/RV-4, RVA-1/RVI-2, RVA-3/RVI-2, RV-3/RVI-2 möglich und bei RVA-1/RVA-2, RVA-3/RV-4, RVA-3/RVA-2, RVA-1/RV-4, RVA-3/RV-4, RVA-1/RVA-2, RVA-3/RVA-2, RV-3/RVA-2, RVI-1/RVA-2 nicht möglich.

4.4.5.3.1 Primer für die erste PCR

Ziel dieses und des nachfolgenden Versuches war es, durch den Vergleich unterschiedlicher Primerkombinationen, die geeignetsten Paare für die erste PCR zu ermitteln. Aus einer Virussuspension mit $10^{8,5}$ KID₅₀/ml wurde die RNA extrahiert und anschließend in einer dekadischen Verdünnungsreihe (-1 bis -4) verdünnt, indem mit 180 µl vorgelegt wurde. Die Verdünnung -4 wurde nach der Transkription in der PCR amplifiziert (s. 3.3.6.6.3.1). Demnach war die eingesetzte Menge eine Zehnerpotenz höher als in den vorherigen Vorversuchen. Sie entsprach einer Ausgangsvirussuspension mit 10^5 KID₅₀/ml. Der Mastermix wurde mit den Primerkombinationen 1 bis 6 pipettiert. Die Abb. 70 zeigt das Ergebnis der aufgetrennten Amplifikate. Die Kombinationen 1 (RV-2/RV-1) und 5 (RVA-3/RV-1) ergaben nur eine sichtbare Bande bei ca. 1000 bp. Die Sondenpaare 2 (RV-2/RVA-2) und 6 (RVA-3/RVA-2) lieferten zwei dicht übereinander liegende Doppelbanden bei ca. 950 bp. Die Signale der Primerpaare 3 (RVA-1/RV-1) und 4 (RVA-1/RVA-2) waren hingegen nur sehr schwach im Bereich 950-1000 bp ausgebildet.



Bahn 1: RV-2/RV-1 Bahn 2: RV-2/RVA-2 Bahn 3: RVA-1/RV-1 Bahn 4: RVA-1/RVA-2 Bahn 5: RVA-3/RV-1 Bahn 6: RVA-3/RVA-2 Bahn 7: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 70: Amplifikate der ersten PCR von Human Wa mit unterschiedlichen Primerkombinationen

4.4.5.3.2 Primer für die zweite PCR

Nach der Auswertung des unter 3.3.6.6.3.1 beschriebenen Versuches wurde das Produkt der ersten PCR der Sondenkombination 1 (RV-1/RV-2) mit den Primerkombinationen 1 bis 9 in einer zweiten PCR amplifiziert (s. 3.3.6.6.3.2). Die Primerpaare 10 und 11 wurden mit dem Produkt der ersten PCR der Kombination 5 (RVA-3/RV-1) pipettiert. Die Auswertung erfolgte anhand der in Abb. 71 dargestellten Gelelektrophorese. Für die Ansätze 1 bis 3 ergaben sich dabei neben der spezifischen Bande bei ca. 350 bp zwei weitere Nebenbanden. Die Kombinationen 4 bis 6 hatten nur ein spezifisches Signal bei ca. 800 bp, das von allen durchgeführten Versuchen am stärksten ausgebildet war. Bei der Auftrennung der Amplifikate in den Slots 7 bis 9 zeigte sich neben dem spezifischen Produkt bei 950 bp eine oberhalb liegende weitere Schmierbande. Die letzten beiden Ansätze ergaben außer der Doppelbande bei ca. 400 bp mehrere Nebenprodukte.



Abb. 71: Amplifikate der zweiten PCR von Human Wa mit unterschiedlichen Primerkombinationen

Im Anschluss wurden die Sondenkombinationen 4 bis 6 im LightCycler System getestet. Das Produkt der ersten PCR wurde zuvor, wie unter 3.3.6.6.3.2 beschrieben, verdünnt (1:10, 1:100 und 1:1000). Aus den Schmelzkurvenanalysen (Abb. 72, Abb. 74 und Abb. 76) ergab sich für alle Verdünnungen und Primerkombinationen ein spezifischer Peak bei 81,6 °C.

Der Verlauf der Reaktionen (Abb. 73, Abb. 75 und Abb.77) zeigte, dass unter Verwendung der Sondenkombination 4 (RVA-1/RVI-2) das höchste Gesamtsignal erzielt wurde und bei allen Verdünnungen die Kurven als erste anstiegen. Der Übersicht wegen wurden die Ergebnisse wieder in getrennten Grafiken dargestellt.



Abb. 72: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RVA-1/RVI-2 im LightCycler



Abb. 73: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RVA-1/RVI-2 im LightCycler



Abb. 74: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RVA-3-1/RVI-2 im LightCycler



Abb. 75: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RVA-3-1/RVI-2 im LightCycler



Abb. 76: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RV-3-1/RVI-2 im LightCycler



Abb. 77: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen mit den Primer RV-3-1/RVI-2 im LightCycler

4.4.5.3.3 Bestimmung der Sensitivität

Um die Empfindlichkeit des molekularbiologischen Nachweises von Rotaviren zu bestimmen, wurde aus einer Virussuspension mit $10^{8,5}$ KID₅₀/ml die RNA extrahiert und anschließend in einer dekadischen Verdünnungsreihe (-1 bis -6) verdünnt, indem mit 180 µl vorgelegt wurde. Die nested-PCR wurde, mit Ausnahme der eingesetzten cDNA Menge (3 µl), entsprechend dem endgültig verwendeten Protokoll durchgeführt (s. 3.3.6.6.4). Die Amplifikate der ersten PCR wurden im Agarosegel detektiert und sind in Abb. 78 dargestellt. Die Verdünnungen -1 bis -4 wiesen eine spezifische Bande bei ca. 1000 bp auf. Das Ergebnis der zweiten PCR zeigt

die Schmelzkurvenanalyse in Abb. 79. Für die Verdünnungen -1 bis -5 ergab sich ein spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur von ca. 82 °C. Die nested-PCR war somit um eine Zehnerpotenz sensitiver als die PCR. Unter Berücksichtigung der Verdünnung bei den verschiedenen Arbeitsschritten (3,5 μ l für die RT-Reaktion, 3 μ l für die erste PCR und 2 μ l für die zweite PCR) ließ sich eine rechnerisch ermittelte Empfindlichkeit von 1,68 Äq. KID₅₀/ 20 μ l PCR Ansatz bestimmen.



Bahn 1: 10⁻⁶ Bahn 2: 10⁻⁵ Bahn 3: 10⁻⁴ Bahn 4: 10⁻³ Bahn 5: 10⁻² Bahn 6: 10⁻¹ Bahn 7: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 78: Amplifikate der ersten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität



Abb. 79: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

4.4.5.3.4 Optimierung der zweiten PCR

Die beiden folgenden Vorversuche wurden mit dem Ziel der Sensitivitätssteigerung der zweiten PCR durchgeführt. In einem ersten Versuch wurden die MgCl₂-Konzentrationen 2 bis 8 mM überprüft. Dabei wurde das Amplifikat der ersten PCR der Verdünnung -5 des vorherigen Versuches zur Sensitivitätsbestimmung (s. 3.3.6.6.3.4) verwendet. Die Ergebnisse in den Abbildungen Abb. 80 und Abb. 81 zeigen, dass es mit den Konzentration 3, 4, 5 und 8 mM zur Bildung eines spezifisches Produktes kam, das bei 4 mM am stärksten amplifiziert wurde.



Abb. 80: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler



Abb. 81: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen im LightCycler

Im zweiten Versuch zur Optimierung wurde eine Annealingtemperatur der zweiten PCR von 60 °C gewählt. Die erste PCR der Verdünnungen -5 und -6 (s. oben) wurden in die Reaktion eingesetzt. Aus der Schmelzkurvenanalyse in Abb. 82 geht hervor, dass die Sensitivität durch Erhöhung der Annealingtemperatur nicht gesteigert werden konnte.



Abb. 82: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 60 °C Annealing im LightCycler

4.4.5.3.5 Templateerhöhung der nested-PCR

Der Einfluss einer Erhöhung der eingesetzten Menge an Template wurde untersucht, indem in einem ersten Ansatz 5 μ l anstelle von 3 μ l cDNA nach dem Standardprotokoll in die erste PCR eingesetzt wurde. Es wurden die Verdünnungen -3 bis -6 aus dem Versuch zur Bestimmung der Sensitivität (s. 3.3.6.6.3.3) amplifiziert. Die Schmelzkurvenanalyse in Abb. 83 zeigt bis zur Verdünnung -5 den spezifischen Peak bei ca. 82 °C. Der Versuch wurde mit der Verdünnung -4 im Parallelansatz (3 und 5 μ l) wiederholt. Der Verlauf der PCR-Reaktion ist in Abb. 84 dargestellt. Hieraus ging hervor, dass bei einer Templatemenge von 5 μ l die Kurve zuerst anstieg.



Abb. 83: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 5 μl cDNA in der ersten PCR



Abb. 84: Amplifikationsverlauf der zweiten PCR von Human Wa bei 3 und 5 µl cDNA in der ersten PCR

Im zweiten Versuch wurde die in die zweite PCR eingesetzte Templatemenge von 2 auf 4 μ l verdoppelt. Es wurde die erste PCR der Verdünnungen -4 bis -6 verwendet. Es zeigte sich (s. Abb. 85), dass die Sensitivität um eine Zehnerpotenz herabgesetzt wurde. Bei einer Templatemenge von 4 μ l wurde nur in Ansatz 1 (Verdünnung -4) ein Produkt mit einer Schmelztemperatur von 81 °C gebildet. Das Ergebnis konnte in der Wiederholung des Versuches bestätigt werden.



Abb. 85: Schmelzkurven der zweiten PCR von Human Wa unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 µl Template im LightCycler

4.4.5.4 Endgültiges Protokoll

Nach Auswertung der Vorversuche zur Optimierung dieses Nachweissystems wurden 5 µl cDNA in die erste PCR eingesetzt. Die Abb. 84 zeigte, dass bei einer Erhöhung der eingesetzten Templatemenge die Kurve als erste anstieg. Die erste Amplifikation wurde mit einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM und einer Annealingtemperatur von 55 °C in Anlehnung an die Veröffentlichung von GILGEN et al. (1997) durchgeführt, wobei die Zeiten des Temperaturprofils verlängert und die Zyklenzahl auf 30 heraufgesetzt wurde. Aufgrund der Ergebnisse beim Sondenvergleich in Abb. 70 wurden die Primer RV-1/RV-2 verwendet. Mit diesem Primerpaar war nur eine spezifische Bande sichtbar, die außerdem am stärksten ausgebildet war. Für die zweite PCR wurden die beiden Sonden RVA-1 und RVI-2 eingesetzt. Die Ergebnisse in Abb. 71 zeigten, dass unter Einsatz dieser Sonden nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde, das die höchste Gesamtfluoreszenz hatte (s. Abb. 73). Die Amplifikation im LightCycler wurde bei einer MgCl₂-Konzentration von 4 mM und einer Annealingtemperatur von 60 °C gefahren. Der Versuch zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration hatte gezeigt, dass bei einer Konzentration von 4 mM das spezifische Produkt am stärksten amplifiziert wurde (s. Abb. 81). Wie die Abb. 82 zeigt, hatte die Erhöhung der Annealingtemperatur auf 60 °C zu keiner Sensitivitätssteigerung geführt. Ein Standard wurde nicht mitgeführt. Alle positiven Proben sollten abschließend quantifiziert werden.

4.4.6 Hantavirus

Der molekularbiologische Nachweis von Hantaviren erfolgte unter Verwendung einer RTnested-PCR im Thermocycler und anschließender Detektion im Agarosegel. Das Protokoll zur Durchführung der Reaktion und die Positivkontrolle (1µg/ml Plasmid) wurden vom Bernhard-Nocht-Institut bezogen.

4.4.6.1 Bestimmung der Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität des Nachweises wurde aus einer Virussuspension mit 10^4 KID₅₀/ml eine dekadische Verdünnungsreihe (-1 bis –10) angelegt, die RNA der einzelnen Verdünnungen isoliert und entsprechend den Angaben unter 3.3.6.7.2 amplifiziert. Das Ergebnis der ersten PCR ist in Abb. 86 dargestellt. Die Verdünnung –1 zeigte eine spezifische Bande bei ca. 650 bp. Nach der zweiten Amplifikation konnten die beiden nächsten Verdünnungen –2 und –3 im Agarosegel detektiert werden (s. Abb. 87). Somit war die nested-PCR zwei Zehnerpotenzen sensitiver als die erste PCR. Für den molekularbiologischen Erregernachweis ergab sich eine rechnerisch ermittelte Nachweisgrenze von 10^{-1} (0,07) Äq. KID₅₀/50 µl Ansatz. Sie lag demnach eine Zehnerpotenz über dem kulturellen Nachweis.



Bahn 1: 10^{-1} Bahn 2: 10^{-2} Bahn 3: 10^{-3} Bahn 4: 10^{-4} Bahn 5: 10^{-5} Bahn 6: 10^{-6} Bahn 7: 10^{-7} Bahn 8: 10^{-8} Bahn 9: 10^{-9} Bahn 10: 10^{-10} Bahn 11: pos. Kontrolle Bahn 12: neg. Kontrolle





Bahn 1: 10^{-1} Bahn 2: 10^{-2} Bahn 3: 10^{-3} Bahn 4: 10^{-4} Bahn 5: 10^{-5} Bahn 6: neg. Kontrolle Bahn 7: pos. Kontrolle M: 100 bp Marker

Abb. 87: Amplifikate der zweiten PCR von Puumala unterschiedlicher Konzentrationen zur Bestimmung der Sensitivität

4.5 Etablierung der Methoden zur Probenaufarbeitung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Vorversuche zur Aufarbeitung der unterschiedlichen Probentypen und das endgültig verwendete Protokoll dargestellt. Die Versuche zur Konzentrierung der Viruspartikel wurden anhand kontaminierter Proben überprüft. Es wurden die Referenzviren Polio Sabin S (unbehüllt) und Felines-Herpesvirus (behüllt) eingesetzt.

4.5.1 Vorversuche zur Vor- und Ultrafiltration

Um einen möglichen Virustiterverlust bei der Vor- und Ultrafiltration der Proben zu überprüfen, wurden Sammelflüssigkeiten für die Spezial-Impinger mit Polio Sabin S bzw. Felinem-Herpesvirus versetzt und wie unter 3.5.1 und 3.5.2 beschrieben aufgearbeitet. Des Weiteren wurde eine Abwasserprobe mit Polio Sabin S kontaminiert und nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler ebenfalls vorfiltriert.

In Tab. 43 sind die Virustiter in KID_{50} / ml vor und nach der Vorfiltration dargestellt. Die Versuche 1 bis 8 wurden mit Polio Sabin S und der Versuch 9 mit Felinem-Herpesvirus

durchgeführt. Versuch Nr. 10 zeigt das Ergebnis der Vorfiltration der Abwasserprobe. In keinem der durchgeführten Versuche kam es zu Virusverlusten im Filtrat.

Versuch Nr.	Ausgangslösung	Filtrat
1	$10^{3,25}$	$10^{3,25}$
2	$10^{3,75}$	$10^{3,00}$
3	$10^{3,00}$	$10^{3,25}$
4	$10^{3,87}$	10 ^{3,75}
5	$10^{6,00}$	$10^{5,50}$
6	$10^{4,75}$	$10^{4,75}$
7	$10^{3,87}$	$10^{3,75}$
8	$10^{3,00}$	$10^{3,25}$
9	10 ^{4,75}	$10^{4,50}$
10	$10^{3,87}$	$10^{3,80}$

Tab. 4	. 43: Virustiter (Polio Sabin S bzw. Felines-Herpesvirus) in KID ₅₀ / ml vor ur	nd nach der
	Vorfiltration	

Der Erfolg der Ultrafiltration wurde überprüft, indem der Virustiter vor der Ultrafiltration, im Retentat und Filtrat bestimmt wurde. In den Versuchen 1 bis 5 wurde die Sammelflüssigkeit mit Polio Sabin S und in den Versuchen 6 und 7 mit Felinem-Herpesvirus versetzt. Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigt Tab. 44. In keinem der durchgeführten Versuche konnte Virus im Filtrat nachgewiesen werden.

Nach Abschluss der Ultrafiltration ergab sich ein milchiges, leicht visköses Retentat von ca. 15 ml Gesamtmenge. Das dem Sammelmedium als Entschäumer zugesetzte Olivenöl wurde bei diesem Arbeitsschritt aufkonzentriert. Das Volumen der Probe wurde um den Faktor 60 reduziert. Dem zu Folge hätte der Virustiter im Retentat mindestens eine Zehnerpotenz über dem der Ausgangslösung liegen müssen. Die Versuche zeigten unterschiedliche Ergebnisse. In Versuch Nr. 1 und 5 war keine Titererhöhung im Retentat zu erkennen. Die restlichen Vorversuche ergaben eine Aufkonzentrierung zwischen einer halben (Versuch 3) und zwei (Versuch 2) Zehnerpotenzen.

Tab. 44: Virustiter (Polio Sabin S bzw. Felines-Herpesvirus) in KID₅₀/ ml vor der Ultrafiltration, im Retentat und Filtrat

Versuch Nr.	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
1	$10^{5,50}$	10 ^{5,50}	n.n.
2	10 ^{5,25}	10 ^{7,25}	n.n.
3	$10^{5,50}$	$10^{6,00}$	n.n.
4	$10^{2,25}$	$10^{3,75}$	n.n.
5	$10^{6,00}$	$10^{6,00}$	n.n.
6	$10^{4,50}$	10 ^{5,50}	n.n.
7	$10^{5,00}$	$10^{6,25}$	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Die nachfolgende Tabelle Tab. 45 zeigt die Ergebnisse der 5-minütigen Ultraschallbehandlung einiger Retentate, die keine Virustitererhöhung zur Folge hatte. Die Versuche 1 bis 4 waren mit Polio Sabin S, die restlichen mit Felinem-Herpesvirus durchgeführt worden.

Tab. 45:	Virustiter (Polio	Sabin S bzw.	. Felines-Herpesviru	s) in KID ₅₀ / m	nl im Retentat vor
	und nach Besch	allung			

Versuch	Retentat	Retentat
Nr.	ohne Ultraschall	mit Ultraschall
1	$10^{3,75}$	$10^{3,50}$
2	$10^{4,50}$	10 ^{4,75}
3	$10^{4,75}$	10 ^{4,75}
4	$10^{5,50}$	$10^{6,00}$
5	$10^{5,50}$	10 ^{5,75}
6	$10^{6,25}$	$10^{7,00}$
7	10 ^{6,25}	10 ^{6,25}
8	$10^{6,00}$	$10^{6,25}$

4.5.2 Vorversuche zur Ultrazentrifugation mit Stufengradienten

Um die Ölemulsion des Retentats zu brechen und eine weitere Aufkonzentrierung der Viren zu erreichen, wurden Vorversuche zur Zonendichtegradientenzentrifugation (s. 3.5.3) durchgeführt, wobei die Trennmedien Saccharose und Percoll eingesetzt wurden. Durch die 6-stündige Ultrazentrifugation konnte die Ölemulsion gebrochen werden. Im Röhrchen hatten sich folgende Zonen gebildet:

- a) Milchig, weiß mit fester Ölhaut
- b) Klar (eigentliche Probe)
- c) 10 % Saccharose, rot gefärbt
- d) 60 % Saccharose, klar, viskös bzw. unter Einsatz von Percoll bildete sich am Röhrchenboden eine nicht abzunehmende gelartige Schicht.

Nachdem die einzelnen Banden durch Anstechen der Zentrifugengläser (Einwegspritzen und Kanülen) sorgfältig entnommen waren, wurden die Viruskonzentrationen bestimmt. In den Versuchen mit dem Trennmittel Percoll wurde direkt über der sich gebildeten festen Schicht ein Aliquot entnommen und untersucht.

In Tab. 46 sind die Ergebnisse der Ultrazentrifugation mit den Stufengradienten 10 % und 60 % Saccharose dargestellt. Dabei wurden die Versuche 1 bis 5 mit Polio Sabin S und die Ansätze 6 und 7 mit Felinem-Herpesvirus durchgeführt. Die Tabelle zeigt, dass die höchsten Titer in der Saccharoseschicht mit 60 % nachgewiesen wurden. Des Weiteren konnte, mit Ausnahme in Versuch Nr. 3, eine leichte Aufkonzentrierung verzeichnet werden (vergl. Virustiter im Retentat und in 60 % Saccharose).

Tab. 46:	Virustiter (Polio Sabin S bzw. Felines-Herpesvirus) in KID ₅₀ / ml im Retentat nach
	der Ultrafiltration und in den einzelnen Zonen nach der Dichtegradientenultra-
	zentrifugation

Versuch Nr.	Retentat	Ölschicht	Probe	10 % Saccharose	60 % Saccharose
1	$10^{6,00}$	$10^{3,50}$	$10^{2,0}$	$10^{2,75}$	$10^{7,00}$
2	$10^{6,00}$	$10^{2,00}$	n.n.	n.b.	$10^{6,75}$
3	$10^{4,75}$	$10^{1,50}$	n.n.	$10^{1,50}$	$10^{4,00}$
4	$10^{4,50}$	n.n.	n.n.	n.n.	10 ^{4,75}
5	$10^{4,50}$	$10^{1,50}$	n.n.	n.n.	10 ^{5,25}
6	$10^{4,50}$	$10^{2,75}$	$10^{2,5}$	$10^{2,50}$	10 ^{5,25}
7	$10^{6,00}$	$10^{2,50}$	$10^{2,0}$	$10^{4,50}$	$10^{6,25}$

n.n.: nicht nachweisbar

n.b.: nicht bestimmt

Beide Versuche mit dem Trennmittel Percoll wurden mit Polio Sabin S durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass sich der Großteil der Viren nach der Zentrifugation in der untersten Gradientenstufe abscheidet (s. Tab. 47).

Tab. 47: Virustiter (Polio Sabin S) in KID₅₀/ ml im Retentat nach der Ultrafiltration und in den einzelnen Zonen nach der Dichtegradientenultrazentrifugation

Versuch Nr.	Retentat	Ölschicht	Probe	10 % Saccharose	Über Percoll
1	10^{6}	$10^{3,25}$	10^{1}	$10^{2,5}$	$10^{5,75}$
2	10^{6}	$10^{2,5}$	$10^{1,5}$	10^{3}	10 ^{7,25}

4.5.3 Vorversuch zur Wirkung von Trypsin

In einer Versuchsreihe wurde die Wirkung von Trypsin zum Verdau der MD 8-Gelatinefilter und eine mögliche schädigende Wirkung auf behüllte und unbehüllte Viren überprüft. Es zeigte sich, dass das Filter nach einer Inkubation von ca. 10 min. bei 37 °C vollständig gelöst war. Die Wirkung von Trypsin auf das behüllte (Felines-Herpesvirus, FEHV) und unbehüllte (Polio Sabin S, Polio) Referenzvirus zeigt die nachfolgende Grafik. Über einen Zeitraum von einer Stunde kam es bei Poliovirus zu keinem und bei Felinem-Herpesvirus erst nach 30 min. zu einem Titerverlust von einer Zehnerpotenz.



Abb. 88: Wirkung von Trypsin bei 37 °C auf Polio Sabin S (Polio) und Felines-Herpesvirus (FEHV)

4.5.4 Vorversuche mit Zentrifugenkonzentratoren

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einsatz des Centriprep-500 zur Aufkonzentrierung der gelösten MD 8-Gelatinefilter getestet. Hierzu wurden die Filter in Sammelflüssigkeiten gelöst, mit Polio Sabin S versetzt und wie unter 3.5.5.1 beschrieben mit dem Zentrifugenkonzentrator aufgearbeitet. In Tab. 48 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Bei der Aufarbeitung ließ sich ein Teil der Gelatine durch die 500 kD Membran abtrennen. Das Retentat betrug zwischen 3 und 6 ml. Wie aus den beiden Versuchen 2 und 3 hervorgeht, kam es zu geringen Virusverlusten mit dem Filtrat. Durch die Aufkonzentrierung konnte in keinem der durchgeführten Versuche einer Titererhöhung im Retentat erzielt werden.

Tab. 48: Virustiter (Polio Sabin S) in KID₅₀/ml vor der Zentrifugation mit dem Centriprep-500, im Retentat und Filtrat

Versuch Nr.	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
1	$10^{2,25}$	$10^{2,25}$	n.n.
2	$10^{3,50}$	$10^{3,25}$	10 ^{1,75}
3	10 ^{5,25}	10 ^{5,25}	$10^{2,75}$

n.n.: nicht nachweisbar

In einer zweiten Serie wurden sechs Versuche zur Aufarbeitung der MD 8-Gelatinefilter mit dem JumboSep-Konzentrator unter Verwendung einer 100 kD Membran, wie unter 3.5.5.2 beschrieben, untersucht. Die Proben waren mit Polio Sabin S kontaminiert. Die Tab. 49 zeigt die Ergebnisse dieser Vorversuche. In den Versuchen 1 und 2, unter Verwendung neuer Membranen, konnte im Filtrat kein Virus nachgewiesen werden. In den Versuchen 3 bis 6 hingegen war das Filtrat nicht virus-frei. Das Retentat betrug zwischen 4 und 5 ml. In allen durchgeführten Untersuchungen war der Titer im Retentat etwas höher als in der Ausgangslösung.

Versuch Nr.	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
1	$10^{1,75}$	$10^{2,25}$	n.n.
2	10 ^{4,25}	$10^{5,00}$	n.n.
3	$10^{5,75}$	$10^{6,00}$	$10^{4,50}$
4	$10^{4,25}$	$10^{5,00}$	$10^{3,00}$
5	$10^{4,25}$	$10^{4,50}$	$10^{2,25}$
6	$10^{3,25}$	$10^{3,75}$	$10^{2,00}$

Tab. 49: Virustiter (Polio Sabin S) in KID₅₀/ml vor der Zentrifugation mit dem JumboSep (100kD), im Retentat und Filtrat

n.n.: nicht nachweisbar

Da der Konzentrator JumboSep für ein Probenvolumen von maximal 50 ml ausgelegt ist, wurde er zur Aufkonzentrierung der XM-2- und HZ-Proben in Erwägung gezogen. In einem Vorversuch wurde Sammelflüssigkeit des XM-2 mit Polio Sabin S versetzt, auf die beiden Sammelbecher verteilt und der Sammler für 30 min. betrieben. Eine Probe wurde unter Einsatz einer 100 kD und die andere unter Verwendung einer 300 kD Membran filtriert. In beiden Fällen wurden neue Membranen eingesetzt. Der Virustiter wurde vor und nach der Sammlung bestimmt. Er betrug sowohl vor als auch nach der "Sammlung" 10^{2,5} KID₅₀/ml. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse nach der Filtration mit 100 bzw. 300 kD Membranen. In beiden Filtraten war kein Virus nachzuweisen. Bei der Aufarbeitung zeigte sich, dass unter Verwendung der 300 kD Membran das in der Sammelflüssigkeit enthaltene BSA teilweise abgetrennt werden konnte. Das Protein erschwerte die Zentrifugation mit der 100 kD Membran, wodurch sich lange Zentrifugationszeiten ergaben.

Tab. 50: Virustiter (Polio Sabin S) in KID₅₀/ml im Retentat und Filtrat beim Membranvergleich

Membran	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
100 kD	$10^{2,5}$	$10^{3,25}$	n.n.
300 kD	10 ^{2,5}	$10^{3,25}$	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Nachdem ein Teil der HZ- und XM-2-Proben mit den 300 kD Membranen aufgearbeitet waren, wurden die mehrfach verwendeten und desinfizierten 300 kD Membranen auf ihre Tauglichkeit hin überprüft, indem mit Polio Sabin S kontaminierten Sammelflüssigkeit zentrifugiert wurde. Aus Tab. 51 geht hervor, dass in allen untersuchten Filtraten Virus zu finden war. Die Titer im Retentat waren nur geringfügig höher als in der Ausgangslösung.

Membran	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
1	$10^{4,25}$	$10^{4,50}$	$10^{4,00}$
2	$10^{4,25}$	$10^{5,50}$	$10^{3,75}$
3	$10^{4,25}$	$10^{4,50}$	$10^{4,00}$
4	$10^{4,25}$	$10^{4,50}$	10 ^{4,25}
5	$10^{4,25}$	10 ^{4,75}	$10^{4,00}$
6	$10^{4,25}$	10 ^{5,25}	$10^{4,00}$

Tab. 51	Virustiter (Polio Sabin S) in KID ₅₀ /ml im Retentat und Filtrat mehrfach	verwendeter
	300 kD Membranen	

Die Vorversuche 1 bis 7 in Tab. 52 simulierten die weitere Aufarbeitung der entnommenen 60 % Saccharoselösung nach der Dichtegradientenultrazentrifugation mit dem Ultrafree-15 (100 kD). Im Filtrat war in allen durchgeführten Vorversuchen kein Virus nachweisbar. Bei der Titration zeigte sich jedoch, dass die Verdünnungsstufe 0 sowohl der Ausgangslösung als auch des Retentats und Filtrates nach kurzer Zeit toxische Effekte in der Zellkultur hervorriefen. Daher wurde das Retentat (ohne Viruszusatz) in einer zweiten Versuchsreihe auf 1, 3 und 4 ml Endvolumen mit DMEM aufgefüllt und in der Zellkultur auf toxische Effekte hin beobachtet. Die Versuche ergaben, dass bei einem Endvolumen von 4 ml keine solchen Effekte mehr auftraten.

Tab. 52: Virustiter (Polio Sabin S) in KID₅₀/ml vor der Zentrifugation mit dem Ultrafree-15, im Retentat und Filtrat

Versuch Nr.	Ausgangslösung	Retentat	Filtrat
1	10 ^{4,75}	$10^{5,50}$	n.n.
2	$10^{4,50}$	10 ^{4,75}	n.n.
3	$10^{4,50}$	$10^{5,00}$	n.n.
4	$10^{2,50}$	$10^{3,50}$	n.n.
5	$10^{2,50}$	$10^{4,00}$	n.n.
6	$10^{3,00}$	$10^{4,00}$	n.n.
7	$10^{3,00}$	$10^{3,25}$	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

4.5.5 Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter

Der unter 3.5.6 beschriebene Vorversuch sollte mehrere Fragen beantworten. Konnte das sich in Lösung befindende Gelatinefilter mit dem Ultrafree-15 aufkonzentriert und das verbleibende Retentat durch das Trägermaterial des High Pure Viral Nucleic Acid Kits zentrifugiert werden und hatte die Gelatine nach der Isolierung der Nukleinsäure eine hemmende Wirkung auf die RT-PCR? Bei der Zentrifugation im Konzentrator betrugen die Retentate nach zwei Stunden 300 μ l. Die Aufarbeitung mit dem Extraktionskit erwies sich als unproblematisch. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Nachweise sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Alle Verdünnungen der Ansätze 1 (mit Gelatinefilter) und Ansätze 2 (ohne Gelatinefilter) hatten im Agarosegel die spezifischen Banden. Demnach war nicht mit einer inhibitorischen Wirkung des Gelatinefilters zu rechnen.



Bahn 1: 1:200 Bahn 2: 1:400 Bahn 3: 1:800 Bahn 4: 10⁻³ Bahn 5: 1:200 Bahn 6: 1:400 Bahn 7: 1:800 Bahn 8: 10⁻³ Bahn 9: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Bahn 1 bis 4: Ansatz 1 Bahn 5 bis 8: Ansatz 2

Abb. 89: Amplifikate der Aujeszky-Virus PCR



Bahn 1: unverdünnt Bahn 2: 10^{-1} Bahn 3: 10^{-2} Bahn 4: unverdünnt Bahn 5: 10^{-1} Bahn 6: 10^{-2} Bahn 7: neg. Kontrolle M: 100 bp Marker

Bahn 1 bis 3: Ansatz 1 Bahn 4 bis 6: Ansatz 2

Abb. 90: Amplifikate der Enterovirus RT-nested-PCR

4.5.6 Endgültige Methode

Aufgrund der Vorversuche zur Vorfiltration sollten alle Proben mit Ausnahme die der Filtrationssammler vor der eigentlichen Aufarbeitung vorfiltriert werden. Die Versuche ergaben, dass mit keinem Titerverlust zu rechnen war. Die Vorversuche zur Behandlung der Proben der beiden Spezial-Impinger mit dem Ultrafiltrationsmodul hatten gezeigt, dass eine Konzentrierung ohne Virusverlust auf ein Endvolumen von ca. 15 ml möglich war. Die Brechung der Ölemulsion und weitere Aufkonzentrierung der Viruspartikel gelang mittels der Ultrazentrifugation. Die höchsten Virustiter wurden in der 60 % Saccharosephase nachgewiesen. Die Abtrennung des in der Zellkultur toxisch wirksamen Zuckers sollte mit dem Zentrifugenkonzentrator Ultrafree-15 erfolgen. Die Ergebnisse der Vorversuche hatten gezeigt, dass nicht mit Virusverlusten im Filtrat zu rechnen war.

Die durchgeführten Vorversuche zur Aufarbeitung der MD 8-Gelatinefilter ergaben, dass die Gelatine ohne eine Schädigung der Viren mit Trypsin verdaut werden konnte. Beim Vergleich der beiden Konzentratoren Centriprep-500 und JumboSep (100 kD) zur Aufarbeitung der Filter war in beiden Fällen Virus im Filtrat nachweisbar. Aufgrund der kürzeren Zentrifugationszeiten wurde das Centriprep-500 System verwendet.

Die Viruskonzentrierung aus den Sammelflüssigkeiten des HZ- und XM-2-Sammlers wurde mit dem JumboSep und einer 300 kD Membran durchgeführt. Ein Vorversuch zum Vergleich der Membranen mit den Porengrößen 100 und 300 kD hatte gezeigte, dass unter Verwendung neuer Membranen das Filtrat Virus frei war. Eine spätere Überprüfung der desinfizierten und gereinigten Membranen ergab, dass eine Filtration ohne Titerverlust nicht mehr möglich war. Vergleiche hierzu auch die Ergebnisse in Tab. 49. Unter Verwendung neuer 100 kD Membranen war kein Virus im Filtrat nachzuweisen.

4.6 Ergebnisse der Außenversuche

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Außenmessungen, die im Zeitraum März 1998 bis September 1999 durchgeführt wurden, dargestellt. Es werden die Besonderheiten an den Standorten geschildert, wobei die Tabellen jeweils einen Überblick über die gesammelten Luftkeim- und Substratproben, deren Probennummer, die ermittelte relativ Luftfeuchte und Temperatur während der einzelnen Messvorgänge liefern. Parallele Messungen sind in einer gemeinsamen Zeile aufgelistet. Nachfolgend werden die Ergebnisse der unter 3.7 beschriebenen kulturellen Virusisolierung tabellarisch dargestellt und erläutert. Des Weiteren werden die Ergebnisse des molekularbiologischen Erregernachweises gezeigt.

Anmerkungen zum kulturellen Erregernachweis

Bei der Inokulation der Proben in den Zellsystemen hatte sich gezeigt, dass der cpe zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Erscheinung trat. So wurde er bei BGM im Allgemeinen am zweiten Tag, bei MA104 nach drei Tagen und bei A549 in der Regel nach vier Tagen sichtbar. Bei VERO war es sehr unterschiedlich und variierte zwischen einem und sechs Tagen. Des Weiteren hatte keine der untersuchten Proben toxische Effekte auf die Zellkulturen. Die stets mitgeführten Zellkontrollen wiesen in keinem Fall cytopathische Effekte auf.

Anmerkungen zum molekularbiologischen Erregernachweis

Bevor der eigentliche Erregernachweis mittels den etablierten PCR-Systemen erfolgte, wurde in einer ersten Reaktion das zugesetzte Equine-Rhinovirus in den Proben amplifiziert. Hierdurch wurde die Nukleinsäureextraktion überprüft und anhand des mitgeführten Standards die Inhibition in den einzelnen Proben bestimmt. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Standardkurven in den Tabellen 93 bis 99 (s. Anhang) zeigen, dass es zwischen dem kalkulierten Wert der Standards 1, 2 und 3 und dem Erwartungswert zu Abweichungen von bis zu 1/4 Zehnerpotenz kam. Die Beurteilung der Inhibition wurde daher anhand der im LightCycler ermittelten Peakfläche vorgenommen. Zusätzlich wurden systematische Schwankungen des RTnested-PCR-Testsystems von einer Zehnerpotenz berücksichtigt. Eine Probe galt als nicht inhibiert ("-"), wenn die ermittelte Peakfläche der Probe größer bzw. gleich der des Standards 2 war und als inhibiert ("+"),. wenn die Peakfläche größer bzw. gleich des Standards 1 war. Lag die Peakfläche der Probe unter dem Wert des Standard 1, so wurde sie als stark inhibiert ("++") betrachtet.

Weiterhin sind die Resultate der RT-nested-PCR zum Nachweis humaner Enteroviren dargestellt. Die Viruskonzentrationen wurden ermittelt, indem aus den mitgeführten Standards 1 bis 3 eine Modellgleichung (Regression) erstellt wurde (s. Anhang Tabellen 100 bis 103). Zusätzlich werden die Ergebnisse der Poliovirus spezifischen RT-nested-PCR dokumentiert. Die Auswertung erfolgte nur qualitativ (s. 3.3.6.3).

In keiner der mit den etablierten PCR-Systemen untersuchten Proben konnte Hepatitis A-Virus, Hepatitis B-Virus, Rota- und Hantaviren nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle wurde in allen Läufen detektiert. Sowohl die Negativ- als auch Prozesskontrollen waren in allen Reaktionen ohne spezifischen Peak im LightCycler.

4.6.1 Abwasserlauf (Nesenbach) in Stuttgart Kaltental

Im Bereich des natürlichen Bachlaufes, in den Abwässer eingeleitet werden, waren sehr deutliche Verschmutzungen zu sehen (z.B. Toilettenpapier). An den drei Messterminen (24.03., 06.04. und 24.04.98) wurden unterschiedliche Standpunkte für die Messgeräte (Sieb-Impinger und MD 8-Originalgerät) gewählt. Zusätzlich wurden an verschiedenen Stellen Abwasserproben entnommen. Die Zuordnung der personenbezogenen Messungen erwies sich als schwierig, da die Beschäftigten häufig ihren Arbeitsplatz wechselten.

Standort I

Dieser Messpunkt befand sich im Bereich eines Betonschachtes, unterhalb dessen das Abwasser verlief. Zusätzlich wurden zwei der dort Beschäftigten mit dem PGP-GSP-System ausgestattet.

Standort II

Der Standort war direkt am Wasserlauf, wobei zusätzlich Abwasser aus einem Rohr ca. 1 m oberhalb der Wasseroberfläche zugeführt wurde.

Standort III

Die parallelen Messungen wurden direkt am fließenden Wasser durchgeführt.

Standort IV und V

Hier wurden nur personenbezogene Messungen durchgeführt. Es handelte sich um den Baggerfahrer und einen Arbeiter, der im Bereich der Baggertätigkeiten beschäftigt war, des weiteren um zwei Personen, die auf dem bereits abgedeckten Kanal arbeiteten.

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Standort I:		
Impinger-Loch, Nr. 38		
MD 8, <i>Nr. 3</i>	41	
Arbeiter I, Nr. 125, 126	41	/,/
Arbeiter II, Nr. 127, 128		
Abwasser, Nr. 107, 111		
Standort II:		
Impinger-Loch, Nr. 61	/1	77
MD 8, Nr. 4	71	7,7
Abwasser, Nr. 101, 106		
Standort III:		
Impinger-Loch, Nr. 59	52,6	12,6
MD 8, Nr. 5		
Impinger-Loch, Nr. 60	52.6	12.6
MD 8, Nr. 6	52,0	12,0
Impinger-Loch, Nr. 37	60.5	14.0
MD 8, Nr. 7	00,5	14,7
Impinger-Loch, Nr. 62		
MD 8, Nr. 8	60,5	14,9
Abwasser, Nr. 112, 113		
Impinger-Loch, Nr. 33	62	1/1 2
MD 8, Nr. 9	02	14,5

Tab. 53: Probenumfang der Luftkeimmessungen in Kaltental

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Standort IV: PGP Baggerfahrer, Türe offen, <i>Nr. 129, 130</i> PGP Arbeiter mit Schaufel, <i>Nr. 131, 132</i> Abwasser, <i>Nr. 89, 99, 102, 104, 105, 108, 109, 110</i>	51,5	13,4
Standort V: PGP Arbeiter I, <i>Nr. 133, 134</i> PGP Arbeiter II, <i>Nr. 135, 136</i>	62	14,3

Fortsetzung Tab. 53: Probenumfang der Luftkeimmessungen in Kaltental

4.6.1.1 Kultureller Virusnachweis

In Tab. 54 sind die Ergebnisse der kulturellen Isolierung der Substratproben (Abwasser) dargestellt. Mit Ausnahme der Proben 112 und 113 konnte in allen Proben Virus nachgewiesen werden, wobei sich die Linie BGM am empfänglichsten zeigte. Auffallend waren die hohen Konzentrationen (größer bzw. gleich 5000 KID₅₀/ml) in allen vier Zellsystemen der Proben 106 und 107, die am 24.3.98 aus dem Wasserlauf gezogen wurden. Des Weiteren erreichten die Isolate nach der Plaquereinigung der Probe 107 im Zellsystem BGM einen Titer von $10^{9,12}$ KID₅₀/ml, wohingegen auf A549 nur $10^{4,75}$ KID₅₀/ml nachgewiesen wurden. Im Allgemeinen lagen die Viruskonzentrationen der gereinigten Isolate zwischen $10^{6,5}$ und 10^{8} KID₅₀/ml.

	VERO			BGM				A549			MA104		
Probe Nr	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	
89	-1	50	6,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	-	-	-	-1	50	7,12	-	-	-	-	-	-	
101	-1	50	7,12	-2	500	8,12	-1	50	6,25	-1	50	7,5	
102	-1	50	7,5	-2	500	8,25	-	-	-	-1	50	7,62	
104	-	-	-	0	5	6,5	0	5	6	-	-	-	
105	-	-	-	-1	50	7,62	0	5	6,62	-	-	-	
106	-3	>5000	7,62	-3	>5000	8,25	-2	500	7,37	-2	500	7	
107	-2	500	7,62	-3	>5000	9,12	-3	>5000	4,75	-3	>5000	7,62	
108	0	5	6,75	0	5	7,5	-	-	-	0	5	7,75	
109	-	-	-	0	5	7,37	-1	50	8	-	-	-	
110	-	-	-	0	5	7,37	0	5	7,62	-	-	-	
111	-1	50	7,12	0	5	8,37	0	5	5,87	-	-	-	
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tab. 54: Kulturelle Virusisolierung aus den Abwasserproben in Kaltental

Verd. Verdünnungsstufe

KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

> größer bzw. gleich

Bei der Inokulation der Proben in den verschiedenen Zellsystemen zeigte sich, dass die Proben 102, 108, 109, 111-113 sehr stark mit Bakterien belastet waren. Bei allen Proben, bei denen nur die Verdünnungsstufe 0 ein positives Ergebnis in den Zelllinien VERO, BGM und A549 zeigten, kam der cpe erst nach der Passage der Ansätze zum Vorschein. Die Probe 104 wies in der Linie A549 den ersten cpe nach einer Inkubation von sechs Tagen auf.

Nach der unter 3.7.3 beschrieben Plaquereinigung zeigten die Virusisolate während der Virusvermehrung Besonderheiten. Im Allgemeinen wurde ein cpe im Zellsystem MA104 nach ein bis zwei Tagen sichtbar. Bei den Proben 102 und 107 wurden jedoch sieben bzw. vier Tage benötigt. Noch auffälliger waren die Unterschiede in der Zelllinie A549. Die Probe Nr. 101 musste einen Tag, Nr. 104 drei Tage, Nr. 105 neun Tage und Nr. 107, 110 und 111 zwei Tage lang inkubiert werden. Unterschiede traten auch in der Art des cpe der einzelnen Isolate auf. Dabei fielen die Proben 106 und 109 in der Linie A549 besonders auf. Die Probe 106 bewirkte nach acht Tagen die ersten Veränderungen. Die Infektionsherde waren in kleinen Gruppen abgekugelter Zellen über dem gesamten Zellrasen verteilt und breiteten sich nur langsam aus. Der erste cpe der Probe 109 zeigte sich nach 3-tägiger Inkubation, wobei er sich langsam netzartig über den Rasen ausbreitete.

Bei der Überprüfung der ZKÜ auf das Vorhandensein von Rotaviren mit dem Enzym-Immunoassay Ridascreen (s. 3.2.4) zeigten die Proben 109, 112 und 113 einen leicht positiven Farbumschlag. Die Überstände wurden zusätzlich im EIA nach dem unter 3.2.3 beschriebenen Protokoll untersucht. Das Ergebnis war negativ. Es konnten keine gefärbten Infektionsherde detektiert werden.

Die Ergebnisse der kulturellen Isolierung der Luftkeimproben zeigt Tab. 55. In keiner der mit dem MD 8-Sammler gezogenen Proben konnte Virus nachgewiesen werden. Der parallel dazu betriebene Loch-Impinger sammelte hingegen zwischen $10^{1,3}$ und $10^{3,3}$ KID₅₀/m³. Die höchste Viruskonzentration mit größer bzw. gleich 5000 KID₅₀/ml wurde in Probe 60 gefunden, die direkt am Wasserlauf gezogen wurde (Standort III). Die Titration der Isolate bei der Plaque-reinigung ergab bei den Proben 33, 59 und 61 in den unterschiedlichen Zellsystemen Unterschiede im Bereich von drei Zehnerpotenzen.

Bei der Inkubation der Proben auf den Zellsystemen waren die Ansätze mit den Originalproben 3 und 4 schon nach kurzer Zeit verpilzt, so dass die Passage mit der ersten Verdünnung durchgeführt werden musste. Die Proben 37 und 61 waren erst nach der Passage im System MA104 positiv. Ebenso verhielt sich die Probe 59 in der Zelllinie VERO. Den ersten cpe zeigte Probe 61 in VERO Zellen nach einer Inkubation von sechs Tagen, wobei er nach der Passage schon am nächsten Tag in Erscheinung trat. Nach der Plaquereinigung erfolgte die Virusvermehrung, wobei der cpe zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftrat. Die Isolate der Proben 33, 37 und 38 benötigten in A549 zwei Tage und die Isolate 60 und 62 sechs Tage. Der cpe des Isolates der Probe 59 breitete sich nur sehr langsam in VERO aus.

						V	ERO		BGM			A549				MA104				
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Menge A	Menge B	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml
38 L	30	30	1000	990	-1	50	2,35	6,87	-2	500	3,35	6,87	-2	500	3,35	7,37	-2	500	3,35	8,37
3 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61 L	30	30	1000	990	-1	50	2,35	5,62	0	5	1,35	8,12	-	-	-	-	0	5	1,35	5,5
4 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 L	30	30	1000	990	0	5	1,35	4,25	0	5	1,35	7,37	-	-	-	-	-1	50	2,35	6,25
5 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 L	30	30	1000	990	-3	>5000	>4,35	6,5	-2	500	3,35	8	-2	500	3,35	7,75	-1	50	2,35	6,75
6 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 L	30	30	1000	990	-1	50	2,35	7	-1	50	2,35	7,5	-1	50	2,35	7,75	0	5	1,35	6,87
7 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62 L	30	30	1000	990	-1	50	2,35	6,5	-2	500	3,35	7,12	0	5	1,35	7,12	-1	50	2,35	6,75
8 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 L	30	30	1000	990	0	5	1,35	5,25	0	5	1,35	6,5	-1	50	2,35	7,62	0	5	1,35	8,37
9 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 55: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Kaltental

SG Sammelgerät

L Loch-Impinger

M MD 8-Sammler

t Sammelzeit [min.]

Vol. Durchflussrate [l/min]

A Volumen des Sammelmediums [ml]

B Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml]

Verd.

KID₅₀/ml log KID₅₀/m³ log KID₅₀/ml (grau unterlegt) > größer bzw. gleich Verdünnungsstufe Virustiter der Probe in der Zellkultur Virustiter pro 1 m³ Luft Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

4.6.1.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Aus den Ergebnissen in Tab. 56 geht hervor, dass in allen untersuchten Proben der molekularbiologische Erregernachweis möglich war. Es wurden $10^{1,71}$ bis $10^{6,71}$ Äq. log KID₅₀/ml der zugesetzten Equinen-Rhinoviren (10^5 KID₅₀/ml) detektiert. Die Proben des MD 8-Sammlers und des PGP-GSP-Systems waren praktisch nicht inhibiert. Die Abwasserproben 107 bis 113 wiesen praktisch keine Inhibition auf, wohingegen alle weiteren Substratproben inhibiert (Proben 89, 99, 101, 102 und 106) bzw. stark inhibiert (Proben 104 und 105) waren. Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich auch für die Proben des Impingers. So waren die Proben 38, 37 und 33 nicht inhibiert, die Proben 59 bis 62 jedoch stark.

14 der 40 molekularbiologisch untersuchten Proben dieses Standortes ergaben in der RTnested-PCR zum Nachweis humaner Enteroviren ein positives Signal im LightCycler, wobei die Substratproben 112, 108 und 110 aufgrund ihres schwach ausgeprägten spezifischen Peaks nicht quantifiziert werden konnten (vergl. Abb. 91). Zur Kontrolle wurden die Amplifikate der zweiten PCR in ein Agarosegel übertragen. In Abb. 92 sind alle positiven Proben, bei denen ein Signal bei ca. 150 bp sichtbar war zusammengestellt. Anhand des mitgeführten Standards ergaben sich Viruskonzentrationen zwischen 1 und 10^{3,53} Äq. KID₅₀/ml. In keiner der untersuchten personenbezogenen Proben wurden Enteroviren detektiert. Beim Poliovirus spezifischen Nachweis zeigten nur die Impinger-Proben 38 und 60 im LightCycler den spezifischen Peak bei ca. 89 °C, der bei Probe 38 schwach ausgebildet war. Alle Amplifikate wurden ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt. Hierbei zeigte die Probe 60 (Abb. 100) ein deutliches und die Probe 38 (Abb. 99) ein schwächeres Signal bei 283 bp.

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
38	Impinger-Loch	6,33	-	3,53	ja
3	MD 8	5,89	-	n.n.	nein
125	PGP-GSP	3,28	-	n.n.	nein
126	PGP-GSP	4,12	-	n.n.	nein
127	PGP-GSP	3,32	-	n.n.	nein
128	PGP-GSP	3,85	-	n.n.	nein
107	Abwasser	4,57	-	3,32	nein
111	Abwasser	4,92	-	-0,02	nein
61	Impinger-Loch	3,07	++	0,56	nein
4	MD 8	5,95	-	n.n.	nein
101	Abwasser	3,54	+	-0,05	nein
106	Abwasser	3,44	+	2,73	nein
59	Impinger-Loch	1,71	++	n.n.	nein
5	MD 8	6,11	-	n.n.	nein
60	Impinger-Sieb	2,55	++	3,53	ja
6	MD 8	5,65	-	n.n.	nein

Tah.	56:	Mo	leku	larbio	logischer	Vin	usnachweis	s aus	den	Proben	in	Kaltenta	al
1 av.	50.	IVIU	ICKU	101010	logischer	V 11 U	usilaciiwei	s aus	ucn	110000	111	Kanonia	μ

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml Inhibition		Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
37	Impinger-Loch	5,91	-	2,13	nein
7	MD 8	4,92	-	n.n.	nein
62	Impinger-Loch	2,47	++	0,87	nein
8	MD 8	4,74	-	n.n.	nein
112	Abwasser	4,40	-	n.q.	nein
113	Abwasser	3,98	-	n.n.	nein
33	Impinger-Loch	6,71	-	2,75	nein
9	MD 8	5,41	-	n.n.	nein
129	PGP-GSP	3,52	-	n.n.	nein
130	PGP-GSP	3,46	-	n.n.	nein
131	PGP-GSP	3,51	-	n.n.	nein
132	PGP-GSP	3,22	-	n.n.	nein
89	Abwasser	3,10	+	n.n.	nein
99	Abwasser	3,64	+	n.n.	nein
102	Abwasser	3,52	+	1,92	nein
104	Abwasser	2,45	++	n.n.	nein
105	Abwasser	2,88	++	n.n.	nein
108	Abwasser	3,71	-	n.q.	nein
109	Abwasser	3,86	-	n.n.	nein
110	Abwasser	4,65	-	n.q.	nein
133	PGP-GSP	3,64	-	n.n.	nein
134	PGP-GSP	3,95	-	n.n.	nein
135	PGP-GSP	4,47	-	n.n.	nein
136	PGP-GSP	4,72	-	n.n.	nein

	Fortsetzung Tal	b. 56: Molek	ularbiologische	r Virusnachw	eis aus de	n Proben	in Kaltental
--	-----------------	---------------------	-----------------	--------------	------------	----------	--------------

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- n.q. Virus nicht quantifizierbar
- **n.n.** Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert



Abb. 91: Schmelzkurven der zweiten PCR von humanen Enteroviren der nicht quantifizierbaren Substratproben 108, 110, 112 und 114



Abb. 92: Amplifikate der zweiten PCR aller im LightCycler als Enterovirus-positiv deklarierten Proben des Standortes Abwasserlauf Kaltental

4.6.1.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Beim Vergleich der Ergebnisse des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises von humanen Enteroviren, der in Tab. 57 zusammengefasst ist, ergab sich Folgendes. In der Abwasserprobe 112 konnten mit der PCR humane Enteroviren nachgewiesen werden, wohingegen sich in der Zellkultur kein cpe gezeigt hatte. Des Weiteren waren die Proben 59, 89, 99, 104, 105 und 109 im Gegensatz zur Zellkultur in der PCR negativ, wobei die PCR-Reaktionen einiger Proben zum Teil stark gehemmt waren. Für die Proben 38, 37 und 33, die praktisch nicht inhibiert waren, lieferte die PCR höhere Ergebnisse, für die Proben 101 hingegen die Zellkultur, wobei bei dieser Probe eine Hemmung der PCR-Reaktion zu berücksichtigen war. Die in der PCR nicht quantifizierbaren Virusmengen in den Substratproben 108 und 110 lieferten auch in der Kultur nur geringe Konzentrationen. Alle MD 8-Proben und die Abwasserprobe 113 waren sowohl in der PCR als auch in der Zellkultur virus-negativ. Die restlichen Proben zeigten im kulturellen und molekularbiologischen Nachweis ähnliche

Erregerkonzentrationen. Dabei ist jedoch die Inhibition in den Proben 61, 106, 60, 62 und 102 zu berücksichtigen.

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
38	Impinger-Loch	3,53	1,7	2,7	2,7	2,7
3	MD 8	-	-	-	-	-
107	Abwasser	3,32	2,7	>3,7	>3,7	>3,7
111	Abwasser	-0,02	1,7	0,7	0,7	-
61	Impinger-Loch	0,56	1,7	0,7	-	0,7
4	MD 8	-	-	-	-	-
101	Abwasser	-0,05	1,7	2,7	1,7	1,7
106	Abwasser	2,73	>3,7	>3,7	2,7	2,7
59	Impinger-Loch	-	0,7	0,7	-	1,7
5	MD 8	-	-	-	-	-
60	Impinger-Loch	3,53	>3,7	2,7	2,7	1,7
6	MD 8	-	-	-	-	-
37	Impinger-Loch	2,13	1,7	1,7	1,7	0,7
7	MD 8	-	-	-	-	-
62	Impinger-Loch	0,87	1,7	2,7	0,7	1,7
8	MD 8	-	-	-	-	-
112	Abwasser	n.q.	-	-	-	-
113	Abwasser	-	-	-	-	-
33	Impinger-Loch	2,75	0,7	0,7	1,7	0,7
9	MD 8	-	-	-	-	-
89	Abwasser	-	1,7	-	-	-
99	Abwasser	-	-	1,7	-	-
102	Abwasser	1,92	1,7	2,7	-	1,7
104	Abwasser	-	-	0,7	0,7	-
105	Abwasser	-	-	1,7	0,7	-
108	Abwasser	n.q.	0,7	0,7	-	0,7
109	Abwasser	-	-	0,7	1,7	-
110	Abwasser	n.q.	-	0,7	0,7	-

 Tab. 57: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Proben in Kaltental

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

- **n.q.** nicht quantifizierbar
- Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar
- > größer bzw. gleich

Probe inhibiert

Probe stark inhibiert

4.6.2 Kreismülldeponie Bruchsal

Auf der Kreismülldeponie fanden insgesamt drei Messtermine statt. Die Messung am 08.07.98 wurde auf der Deponie im Bereich der Müllanlieferung und Verdichtung durchgeführt. Aufgrund heftiger Regengüsse musste die Probenahme abgebrochen werden, ebenso die Messung am 30.07.98. Am 11.08.98 war es sonnig und sehr heiß, so dass aufgrund einer Überhitzung der stromversorgenden Geräte die parallele Messung zum Teil unmöglich war. Aus Gründen des Arbeitsablaufs auf der Anlage betrug die Sammelzeit der Proben 137 und 138 jeweils 30 min., die der Probe 139 hingegen 50 min. und bei Nr. 140 40 min. Abweichungen der Sammelzeit betrafen außerdem die Proben 29, 14, 67 und 65. Aufgrund mehrerer Stromunterbrechungen lag sie bei 20-23 min (s. Tab. 58).

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
PGP Radladerfahrer in geschlossener Kabine, Nr. 137 PGP Verdichterfahrer in geschlossener Kabine, Nr. 138	76,0	14,7
PGP Verdichterfahrer ohne Filter in Kabine, Nr. 139 PGP Verdichterfahrer mit Filter in Kabine, Nr. 140	98,0	18,4
XM-2, Nr. 26	46,3	31,2
XM-2, Nr. 25	41,6	32,4
XM-2, Nr. 29 MD 8, Nr. 14	14,1	42,1
XM-2, Nr. 30	22,6	36,6
Impinger-Loch, Nr. 67 Impinger-Sieb, Nr. 65	40,2	32,3
Impinger-Loch, Nr. 66 Impinger-Sieb, Nr. 68	36,0	34,5

Tab. 58: Probenumfang der Luftkeimmessung in Bruchsal (Mülldeponie)

4.6.2.1 Kultureller Virusnachweis

In keiner der mit dem XM-2 und MD 8-Sammler gezogenen Luftproben konnte Virus in den angebotenen Zellsystemen nachgewiesen werden. Die Proben der Impinger waren hingegen alle positiv. Die höchste Konzentration mit 500 KID₅₀/ml wurde in der Probe 67 detektiert. Die Parallelmessung der Proben 67 und 65 ergab mit $10^{3,53}$ KID₅₀/m³ eine bessere Sammelleistung für den Loch-Impinger, wohingegen sie bei der zweiten Messung für beide Sammelgeräte gleich war. Der Virustiter der Isolate nach der Plaqueisolierung lag zwischen 10^7 und 10^8 KID₅₀/ml. Die einzelnen Ergebnisse sind der nachfolgenden Tabelle Tab. 59 zu entnehmen.

Der Pilzbefall der Zellkulturen VERO und BGM während der Inokulation der beiden XM-2-Proben 29 und 30 hatte zur Folge, dass nur höhere Verdünnungsstufen passagiert werden konnten. Die Proben 66 und 68 waren erst nach der Passage der Verdünnungsstufe 0 im Zellsystem VERO positiv. Die Virusvermehrung der Isolate 65 und 67 benötigte fünf bzw. sechs Tage bis zum Auftreten des ersten cpe.
											A 5 4 0			MA 104						
						V	ERU			_	BGN		A349					IV	IA104	
Probe																				
Nr/			Menge	Menge			log	log			log	log			log	log			log	log
SG	t	Vol.	Α	В	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	$\overline{\text{KID}_{50}/\text{m}^3}$	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	$\overline{\text{KID}_{50}/\text{m}^3}$	KID ₅₀ /ml
26 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29 X	23	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 M	23	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67 L	20	30	1000	990	-2	500	3,53	7,37	-2	500	3,53	8,00	-2	500	3,53	8,12	-1	50	2,53	7,25
65 S	20	30	1000	990	-1	50	2,53	7,25	0	5	1,53	7,25	0	5	1,53	7,87	0	5	1,53	7,25
66 L	30	30	1000	990	0	5	1,35	6,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68 S	30	30	1000	990	0	5	1,35	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0	5	1,35	7,5

Tab. 59: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Bruchsal (Mülldeponie)

SG Sammelgerät

X XM-2

- M MD 8-Sammler
- L Impinger-Loch
- S Impinger-Sieb
- t Sammelzeit [min.]

Vol. Durchflussrate [l/min]

A Volumen des Sammelmediums [ml]

B Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml]

Verd. Verdünnungsstufe

KID₅₀/**ml** Virustiter der Probe in der Zellkultur

 $\log \text{KID}_{50}/\text{m}^3$ Virustiter pro 1 m³ Luft

log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

> größer bzw. gleich

4.6.2.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die Versuche zur Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus zeigten, dass in allen Proben der PCR-Nachweis möglich war. Dabei wurden zwischen $10^{1,51}$ und $10^{6,15}$ Äq. log KID₅₀/ml der zugesetzten Viren (10^5 KID₅₀/ml) wieder gefunden, wobei der Wert in den beiden XM-2 Proben 29 und 30 am höchsten war. Praktisch ergab sich für die MD 8- und PGP-GSP-Proben keine Inhibition, wohingegen die Proben der Spezial-Impinger sowohl nicht inhibiert (Proben 68) als auch stark inhibiert (Proben 65 bis 67) waren.

Die molekularbiologische Untersuchung auf humane Enteroviren ergab für die Proben 65 und 67 ein positives Ergebnis. Anhand des Standards wurden Viruskonzentrationen von $10^{1,61}$ bzw. $10^{3,51}$ Äq. KID₅₀/ml bestimmt. Die im LightCycler positiven Amplifikate wurden zusätzlich in ein Agarosegel überführt. Die nachfolgende Abb. 93 zeigt das Ergebnis. Die Ausprägung der spezifischen Banden entsprach der im LightCycler kalkulierten Virusmenge. Auch an diesem Standort waren alle PGP-Proben in der PCR negativ. In der Poliovirus RT-nested-PCR waren die Impinger-Proben 67 und 65 positiv. Beide Proben wiesen den spezifischen Peak bei ca. 89 °C auf. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate ist in Abb. 100 dargestellt. Probe 67 zeigte eine deutliche Bande, wohingegen die der Probe 65 nur leicht zu sehen war. Entsprechen war auch der spezifische Peak im LightCycler bei Probe 67 größer.

		Equines-R	hinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
137	PGP-GSP	3,89	-	n.n.	nein
138	PGP-GSP	4,47	-	n.n.	nein
139	PGP-GSP	4,51	-	n.n.	nein
140	PGP-GSP	4,23	-	n.n.	nein
26	XM-2	3,91	+	n.n.	nein
25	XM-2	3,43	+	n.n.	nein
29	XM-2	5,38	-	n.n.	nein
14	MD 8	3,66	+	n.n.	nein
30	XM-2	6,15	-	n.n.	nein
67	Impinger-Loch	2,64	++	3,51	ja
65	Impinger-Sieb	3,02	++	1,61	ja
66	Impinger-Loch	1,51	++	n.n.	nein
68	Impinger-Sieb	4,00	-	n.n.	nein

Tab. 60: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Bruchsal (Deponie)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- n.n. Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert



Bahn 1: Probe 65 Bahn 2: Probe 67 M: 100 bp Marker

Abb. 93 : Amplifikate der zweiten PCR aller im LightCycler als Enterovirus-positiv deklarierten Proben des Standortes Kreismülldeponie Bruchsal

4.6.2.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

In Tab. 61 sind die Ergebnisse des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises von humanen Enteroviren gegenübergestellt. Demnach waren die Proben 65 und 67 sowohl in der PCR als auch in der Zellkultur positiv. Es zeigte sich, dass für die Probe 67 mit der PCR Viruskonzentrationen ermittelt wurden, die eine Zehnerpotenz über der der kulturellen Isolierung lag, wohingegen sich für die Probe 65 keine Unterschiede ergaben. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss jedoch die starke Inhibition in beiden Proben berücksichtigt werden. Der kulturelle Erregernachweis in der Proben 66, die stark inhibiert war, und der Probe 68 konnte in der PCR nicht bestätigt werden. Weiterhin waren alle MD 8- und XM-2-Proben dieses Standortes sowohl in der PCR als auch in der Zellkultur virus-negativ.

Proben Nr.	Sammelgeräte	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
26	XM-2	-	-	-	-	-
25	XM-2	-	-	-	-	-
29	XM-2	-	-	-	-	-
14	MD 8	-	-	-	-	-
30	XM-2	-	-	-	-	-
67	Impinger-Loch	3,51	2,7	2,7	2,7	1,7
65	Impinger-Sieb	1,61	1,7	0,7	0,7	0,7
66	Impinger-Loch	-	0,7	-	-	-
68	Impinger-Sieb	_	0,7	_	-	0,7

Tab. 61: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in Bruchsal (Deponie)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

- Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar

Probe inhibiert

Probe stark inhibiert

4.6.3 Klärwerk München

Die Messung fand am 06.08.98 statt. Am Rande der Anlage, im Bereich des Nachklärbeckens und Vorfluters, wurden zwei Standorte im Abstand von ca. 5 m ausgewählt. Zusätzlich wurden ein Kraneinweiser und ein Schachtarbeiter mit dem PGP-GSP-System beprobt. Der Tag war sonnig und warm. Die personenbezogenen Messungen betrugen 30 min., wobei für die Probenahme 143 und 144 aufgrund der Feuchtigkeit CN-Filter eingesetzt wurden. Die Abwasserprobe wurde aus dem Nachklärbecken entnommen.

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
PGP Kraneinweiser, Nr. 141, Nr. 142	65,0	19,3
PGP Schachtarbeiter, Nr. 143, Nr. 144	50,0	20,0
XM-2, Nr. 1, Nr. 2	48,0	22,4
XM-2, Nr. 15, Nr. 16	42,7	24,4
MD 8, Nr. 11		
Impinger-Loch, Nr. 72	65,0	19.3
Impinger-Sieb, Nr. 70		
MD 8, <i>Nr. 12</i>	65.0	193
Impinger-Sieb, Nr. 73	05,0	17.5
MD 8, Nr. 10		
Impinger-Loch, Nr. 74	65,0	19.3
Impinger-Sieb, Nr. 69		
MD 8, Nr. 13		
Impinger-Loch, Nr. 75	22,4	34,6
Impinger-Sieb, Nr. 71		
Abwasser, Nr. 114		

 Tab. 62: Probenumfang der Luftkeimmessung in München (Klärwerk)

4.6.3.1 Kultureller Virusnachweis

Die Ergebnisse in Tab. 63 zeigen, dass auch an diesem Standort die Proben des XM-2 und MD 8-Sammlers in allen Zellkulturen negativ ausfielen, ebenso die Abwasserprobe Nr. 114 aus dem Nachklärbecken. Im Gegensatz dazu waren alle untersuchten Proben der beiden Spezial-Impinger, mit Ausnahme der Probe 74, auf mindestens drei der verwendeten Zelllinien positiv. Dabei wurden Viruskonzentrationen von 5 bis 50 KID₅₀/ml nachgewiesen. Beim Vergleich der beiden parallel eingesetzten Spezial-Impinger wies in zwei Messungen der Loch-Impinger und in einer Messung der Sieb-Impinger eine höhere Sammelleistung auf. Die verschiedenen Virusisolate erreichten nach der Plaquereinigung Titer zwischen 10^5 und 10^8 KID₅₀/ml.

Besonderheiten bei der kulturellen Virusisolierung traten, neben der Verpilzung der Ansätze der Proben 1 und 2, vor allem bei der Probe 75 auf. Im Zellsystem A549 wurde der erste cpe nach einer Inkubation von fünf Tagen sichtbar, wobei er nach der Passage schon am nächsten zu erkennen war. Des Weiteren konnte ein cpe in den Zellen VERO und MA104 erst nach der Passage der Verdünnung 0 gefunden werden. Bei der Virusvermehrung des Isolates in MA104 zeigte sich nach 10-tägiger Bebrütung der erste cpe. Alle Isolate, die in dem Zellsystem A549 vermehrt wurden, hatten bereits am zweiten Tag einen cpe.

- <u></u>					VERO				BGM			A549			MA104					
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Menge A	Menge B	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml
1 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 L	30	28	1000	990	-1	50	2,38	7,50	-1	50	2,38	7,75	-1	50	2,38	7,25	0	5	1,38	6,75
70 S	30	31	1000	990	0	5	1,34	7,25	0	5	1,34	7,87	0	5	1,34	7,37	-	-	-	-
12 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73 S	30	31	1000	990	-1	50	2,34	7,12	0	5	1,34	7,75	0	5	1,34	7,62	0	5	1,34	8,00
10 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74 L	30	28	1000	990	-	-	-	-	0	5	1,38	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-
69 S	30	31	1000	990	-1	50	2,34	7,00	-1	50	2,34	7,62	-1	50	2,34	8,12	-1	50	2,34	7,62
13 M	28	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75 L	28	30	1000	990	0	5	1,38	6,25	0	5	1,38	7,25	-1	50	2,38	7,00	0	5	1,38	5,12
71 S	28	30	1000	990	0	5	1,38	7,62	0	5	1,38	7,75	0	5	1,38	7,37	-	-	-	-

Tab. 63: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in München (Klärwerk)

- Sammelgerät SG
- Impinger-Loch L
- Impinger-Sieb S
- MD 8-Sammler Μ
- PGP-GSP Р
- XM-2 Х
- Α Abwasser
- Sammelzeit [min.] t

- Verd. Verdünnungsstufe
- Durchflussrate [l/min] Vol.
- Volumen des Sammelmediums [ml] Α
- Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml] B
- **KID₅₀/ml** Virustiter der Probe in der Zellkultur **log KID₅₀/m³** Virustiter pro 1 m³ Luft
- log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung
- > größer bzw. gleich

4.6.3.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises zeigt die Tabelle Tab. 64. Da zwischen $10^{2,42}$ und $10^{5,83}$ Äq. Kid₅₀/ml des zugesetzten Spikes (10^5 KID₅₀/ml) detektiert werden konnte, war demnach die RT-nested-PCR in allen untersuchten Proben möglich. Die höchste Wiederfindung wurde für die XM-2-Proben 1 und 2 ermittelt. Alle untersuchten PGP-GSP-Proben waren praktisch nicht inhibiert, ebenso verhielt es sich mit den XM-2-Proben 1, 2, 16, den MD 8-Proben 10, 11 und der Abwasserprobe 114. Die restlichen Proben waren teilweise inhibiert (Proben 15, 12, 74 und 13) bis stark inhibiert (Proben 73, 75 und 71).

Der Nachweis von humanen Enteroviren gelang in sieben der an diesem Standort gesammelten Proben. Mit Ausnahme der Probe 114 (Abwasser) handelte es sich dabei um Proben, die unter Verwendung eines Spezial-Impingers gezogen wurden. Der höchste Virustiter mir 10^{2,06} Äq. KID₅₀/ml wurde für die Probe 72 ermittelt. Aufgrund des kleinen spezifischen Peaks konnte die Erregermenge in Probe 114 nicht quantifiziert werden (vergl. Abb. 91). Die gelelektrophoretische Auftrennung aller im LightCycler positiv erscheinender Amplifikate wurden zusätzlich im Agarosegel überprüft und sind in Abb. 94 dargestellt. Die Banden waren in Abhängigkeit der Virusmenge unterschiedlich stark ausgebildet. Wieder ließ sich in keiner der untersuchten PGP-GSP-Proben Virus nachweisen. An diesem Standort konnte nur in der Impinger-Probe 72 Poliovirus mit der RT-nested-PCR nachgewiesen werden. In Abb. 100 ist das Amplifikat der zweiten PCR mit der spezifischen Bande bei 283 bp im Agarosegel zu sehen.

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
141	PGP-GSP	4,83	-	n.n.	nein
142	PGP-GSP	4,15	-	n.n.	nein
143	PGP-GSP	3,90	-	n.n.	nein
144	PGP-GSP	4,76	-	n.n.	nein
1	XM-2	5,41	-	n.n.	nein
2	XM-2	5,40	-	n.n.	nein
15	XM-2	3,53	+	n.n.	nein
16	XM-2	4,04	-	n.n.	nein
11	MD 8	4,10	-	n.n.	nein
72	Impinger-Loch	3,86	-	2,06	ja
70	Impinger-Sieb	4,29	-	0,72	nein
12	MD 8	3,42	+	n.n.	nein
73	Impinger-Sieb	2,42	++	1,66	nein
10	MD 8	4,77	-	n.n.	nein

	Tab.	64:	Mo	lek	ular	biol	ogis	cher	Viru	usnach	weis	aus	den	Proben	in	München	(Klärwerk	s)
--	------	-----	----	-----	------	------	------	------	------	--------	------	-----	-----	--------	----	---------	-----------	----

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
74	Impinger-Loch	3,14	+	0,54	nein
69	Impinger-Sieb	4,00	-	1,28	nein
13	MD 8	3,38	+	n.n.	nein
75	Impinger-Loch	3,02	++	0,56	nein
71	Impinger-Sieb	3,05	++	n.n.	nein
114	Abwasser	4,23	_	n.q.	nein

Fortsetzung Tab. 64: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Proben in München (Klärwerk)

Virustiter der Probe in der PCR
Virus nicht quantifizierbar
Virus nicht nachweisbar
Probe nicht inhibiert
Probe inhibiert
Probe stark inhibiert



(Bahn 1: Probe 67) Bahn 2: Probe 69 Bahn 3: Probe 70 Bahn 4: Probe 72 Bahn 5: Probe 73 Bahn 6: Probe 74 Bahn 7: Probe 75 Bahn 8: Probe 114 M: 100 bp Marker

Abb. 94: Amplifikate der zweiten PCR aller im LightCycler als Enterovirus-positiv deklarierten Proben des Standortes Klärwerk München

4.6.3.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Aus der Gegenüberstellung des kulturellen und molekularbiologischen Erregernachweises in Tab. 65 geht hervor, dass mit Ausnahme der Probe 71, die stark inhibiert war, alle in der Zellkultur positiven Proben auch in der RT-nested-PCR positiv waren. Beim Vergleich der ermittelten Viruskonzentrationen zeigte sich, dass für die Probe 72, die praktisch nicht inhibiert war, der mittels der PCR bestimmte Wert über dem des kulturellen Nachweises lag. Für die Probe 70, ebenfalls nicht inhibiert, ergaben sich mit beiden Systemen entsprechende Viruskonzentrationen. Für alle anderen Proben waren die kulturell bestimmten Virusmengen geringer als mit der PCR, wobei mit Ausnahme einer Impinger-Probe (Nr. 69) alle Luftproben inhibiert bzw. stark inhibiert waren. Die Abwasserprobe Nr. 114 war nur in der RT-PCR schwach positiv. Eine Quantifizierung konnte jedoch nicht vorgenommen werden.

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
1	XM-2	-	-	-	-	-
2	XM-2	-	-	-	-	-
15	XM-2	-	-	-	-	-
16	XM-2	-	-	-	-	-
11	MD 8	-	-	-	-	-
72	Impinger-Loch	2,06	1,7	1,7	1,7	0,7
70	Impinger-Sieb	0,72	0,7	0,7	0,7	-
12	MD 8	-	-	-	-	-
73	Impinger-Sieb	1,66	1,7	0,7	0,7	0,7
10	MD 8	-	-	-	-	-
74	Impinger-Loch	0,54	-	0,7	-	-
69	Impinger-Sieb	1,28	1,7	1,7	1,7	1,7
13	MD 8	-	-	-	-	-
75	Impinger-Loch	0,56	0,7	0,7	1,7	0,7
71	Impinger-Sieb	-	0,7	0,7	0,7	-
114	Abwasser	n.q.	-	-	-	-

Tab. 65: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Proben in München (Klärwerk)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

n.q. nicht quantifizierbar

- Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar

Probe inhibiert

Probe stark inhibiert

4.6.4 Mülldeponie Gelnhausen-Haller

Aufgrund der schlechten Witterung und eines Defektes des auf der Deponie verwendeten Kompaktors konnten nicht alle geplanten Messtermine wahrgenommen werden. Die Standortmessungen am 08.09.98 fanden während Radladerarbeiten (hauptsächlich Abtragen von Erde, teilweise Zumischen von Altmüll) statt. Eine geplante Wiederholung des Messtermins ließ sich aufgrund der schlechten Witterung nicht realisieren.

Tah	66.	Drohonumf	ang dar	Luftkaimma	suna in C	Johnson	Uallar (Mülldər	nonia)
1 av.	00.	Trobenunn	ang uci	Luitkemme	sung m C	Jennausen-	manor (winnuc	Joine

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Impinger-Loch, Nr. 64	72,7	19,2
Impinger-Sieb, Nr. 63 MD 8, Nr. 17	66,0	20,8

4.6.4.1 Kultureller Virusnachweis

Die kulturelle Virusisolierung gelang nur aus den beiden Impinger-Proben (s. Tab. 67). Den höchsten Virustiter mit 500 KID₅₀/ml erreichte die Probe Nr. 64 in der Zelllinie MA104. Die Isolate erreichten nach der Plaquereinigung Titer von ca. 10^7 bis 10^8 KID₅₀/ml.

Bei der Inokulation auf den unterschiedlichen Zelltypen konnte bei Probe 63 nur nach der Passage ein cpe im System MA104 detektiert werden. Bei der Virusvermehrung nach der Plaquereinigung ergab sich im Zellsystem MA104 für die Probe 63 ein cpe nach drei Tagen, wobei er bei der Probe 64 erst nach sechs Tagen auftrat. In der Zelllinie A549 verhielt es sich genau umgekehrt.

Tab. 67: Kulturelle Virusisolierung aus den Lu	tproben in Gelnhausen-Haller (Mülldeponie)
--	--

_					VERO BGM			A549			MA104									
Probe	•																			
Nr/			Menge	Menge			log	log			log	log			log	log			log	log
SG	t	Vol.	Α	В	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID_{50}/m^3	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID_{50}/m^3	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml
64 L	30	30	1000	989	-1	50	2,35	7,12	-1	50	2,35	8,12	-1	50	2,35	7,62	-2	500	3,35	7,00
63 S	30	30	1000	989	-	-	-	-	0	5	1,35	7,87	-1	50	2,35	7,37	0	5	1,35	6,75
17 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SG Sammelgerät

Impinger-Loch L

Impinger-Sieb S

MD 8-Sammler Μ

Sammelzeit [min.] t

Vol. Durchflussrate [l/min]

Volumen des Sammelmediums [ml] А

Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml] B

Verdünnungsstufe Verd.

KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur **log KID₅₀/m³** Virustiter pro 1 m³ Luft

log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

> größer bzw. gleich

4.6.4.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Von diesem Standort wurden nur drei Proben molekularbiologisch untersucht. Die durchgeführte PCR zur Ermittlung der Inhibition hatte gezeigt, dass in Probe 64 nur 1 Äq. KID₅₀/ml des zugesetzten Equinen-Rhinovirus (10^5 KID₅₀/ml) wieder gefunden werden konnten. Trotzdem konnten humane Enteroviren mit einer Konzentration von $10^{0,47}$ Äq. KID₅₀/ml detektiert werden. Die beiden anderen Proben waren weniger stark bzw. praktisch nicht inhibiert. Für die Impinger-Probe Nr. 63 wurden $10^{0,56}$ Äq. KID₅₀/ml humane Enteroviren detektiert. Die Amplifikate der im LightCycler positiv erscheinenden Proben 63 und 64 wurden in ein Agarosegel übertragen (s. Abb. 95). Auffällig war hier die stark ausgebildete spezifische Bande der Probe 64. In keiner der Proben konnte Poliovirus detektiert werden.

Tab.	68: Molekularbiolog	ischer Virusnachwe	is aus den Luft	proben in Gelnhaus	en-Haller
	(Mülldeponie)				

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
64	Impinger-Loch	0,11	++	0,47	nein
63	Impinger-Sieb	3,20	+	0,56	nein
17	MD 8	4,10	-	n.n.	nein

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- n.n. Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert



Bahn 1: Probe 63 Bahn 2: Probe 64 M: 100 bp Marker

Abb. 95: Amplifikate der zweiten PCR aller im LightCycler als Enterovirus-positiv deklarierten Proben des Standortes Gelnhausen-Haller (Mülldeponie)

4.6.4.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Der Vergleich der Ergebnisse des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises von humanen Enteroviren in Tab. 69 zeigte, dass die Proben 63 und 64 sowohl in der Kultur als auch in der RT-nested-PCR positiv waren. Bei der Bestimmung der Erregerkonzentration der Probe 63 konnte mit der Zellkultur ein Titer von $10^{1,7}$ KID₅₀/ml ermittelt werden und lag

somit eine Zehnerpotenz über dem der PCR. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Probe stark inhibiert war.

Für die Probe 64, die ebenfalls inhibiert war, ergab sich im Testsystemen PCR eine Viruskonzentration von $10^{0.54}$ Äq. KID₅₀ml wohingegen sie im Zellsystem A549 $10^{1.7}$ KID₅₀/ml betrug. Die MD 8-Probe Nr.17 war in beiden Nachweissystemen virusnegativ.

 Tab. 69: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in Gelnhausen-Haller (Mülldeponie)

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
64	Impinger-Loch	0,47	1,7	1,7	1,7	2,7
63	Impinger-Sieb	0,56	-	0,7	1,7	0,7
17	MD 8	-	-	-	-	-

Äq. log KID50/mlVirustiter der Probe in der PCRlog KID50/mlVirustiter der Probe in der Zellkultur-Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar

Probe inhibiert Probe stark inhibiert

4.6.5 Kläranlage Stuttgart Mühlhausen

In der Kläranlage wurden Sanierungsarbeiten durchgeführt. Es wurden drei Messungen am 12.11., 03.12.98 und 11.02.99 durchgeführt. Die personenbezogenen Messungen erfolgte an Arbeitern, die sich frei im Bereich der Baustelle bewegten und somit sich keiner eindeutigen Tätigkeit zuordnen ließen.

Standort I

Hier wurde vorgeklärtes Abwasser über dicke Schläuche in die biologische Anlage geleitet. Es war in diesem Bereich eine deutliche Geruchsemission wahrzunehmen. Die Probenmengen des Horizontal-Zyklons betrugen 63 ml (Nr. 45) und 58,5 ml (Nr. 46). Nach der Sammlung mit dem PGP-System zeigte sich, dass die Gelatinefilter der Proben 145 und 146 gerissen waren.

Standort II

Die Sammler wurden am Rand des Vorklärbeckens aufgestellt. Aufgrund der geringen Außentemperatur war die Aerosolfahne des Beckens deutlich zu sehen und trieb direkt auf die Sammler zu. Der Horizontal-Zyklon-Sammler fiel aus, da das Sammelmedium im Zyklon eingefroren war. Die Proben der personenbezogenen Messung (Gelatinefilter) waren nach den Probenahmen sehr staubig.

Standort III

Die Messung fand bei leichtem Schneefall am Wasserlauf, der das Vorklärbecken mit der biologischen Reinigungsstufe verbindet, statt. Auch hier war eine deutliche Geruchsemission wahrzunehmen. Da es sich bei Arbeiter II um einen starken Raucher handelte, war das Gelatinefilter (Nr. 167) nach der Sammlung deutlich gelb gefärbt.

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Standort I:		
HZ, Nr. 45	(()	0.5
XM-2, Nr. 35	66,8	8,3
MD 8, Nr. 18		
HZ, Nr. 46		
XM-2, Nr. 36	50.1	11 4
MD 8, Nr. 19	50,1	11,4
PGP Arbeiter I-III, Nr. 145, 146, 147		
Standort II:		
XM-2, Nr. 39		
MD 8, Nr. 20	90 C	1 4
Impinger-Loch, Nr. 85	80,0	-1,4
Impinger-Sieb, Nr. 83		
PGP Arbeiter I-III, Nr. 163, 164, 165		
XM-2, Nr. 40		
MD 8, Nr. 21	78.9	-1.6
Impinger-Loch, Nr. 88	10,9	1,0
Impinger-Sieb, Nr. 84		
Standort III:		
MD 8, Nr. 22	63 7	12
Impinger-Loch, Nr. 34	05,7	1,2
Impinger-Sieb, Nr. 98		
MD 8, Nr. 23		
Impinger-Loch, Nr. 100	68,5	1,0
Impinger-Sieb, Nr. 87		
PGP Arbeiter I, II, Nr. 166,167	55,5	1,2

Tab. 70: Probenumfang der Luftkeimmessungen in Stuttgart Mühlhausen (Klärwerk)

4.6.5.1 Kultureller Virusnachweis

Die Ergebnisse des kulturellen Virusnachweises in Tab. 71 zeigen, dass nur vier der untersuchten Proben positiv waren. Die Virusmengen lagen zwischen 5 und 50 KID₅₀/ml. Die Detektion war in allen vier Proben nur in einer Zelllinie möglich (VERO oder BGM). In keinem der Ansätze konnte Virus in den Zellsystemen A549 und MA104 nachgewiesen werden. Alle Proben, die unter Verwendung des XM-2, HZ und MD 8-Sammlers gezogen worden waren, blieben ohne cpe in den angebotenen Zellkulturen. Die vier parallel angesetzten Messungen mit den Spezial-Impingern ergaben, dass in zwei Fällen nur der Loch-Impinger und in den beiden anderen der Sieb-Impinger kulturfähige Viren gesammelt hatte.

Mit Ausnahme der Probe 88 konnte im jeweiligen Zellsystem erst nach der Passage ein cpe detektiert werden. Bei der Probe 83 war er in der Zelllinie VERO traubig und unterschied sich deutlich von anderen.

				V	ERO			Ι	BGM				A549			WA104 KID ₅₀ / log MI Iog RID ₅₀ / m1 - - - - -				
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Men- ge A	Men- ge B	Verd.	KID ₅₀ / ml	log KID ₅₀ / m ³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ / ml	log KID ₅₀ / m ³	log KID ₅₀ /ml	Verd	KID ₅₀ / ml	log KID ₅₀ / m ³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ / ml	log KID ₅₀ / m ³	log KID ₅₀ /ml
45 H	30	690	74	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 X	30	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46 H	30	690	69,5	58,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 X	30	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39 X	30	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85 L	30	30	1000	989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83 S	30	30	1000	989	0	5	1,35	6,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 X	30	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88 L	30	30	1000	989	-1	50	2,35	6,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84 S	30	30	1000	989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 L	30	28	1000	989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98 S	30	30	1000	989	-	-	-	-	0	5	1,35	6,87	-	-	-	-	-	-	-	-
23 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 L	30	28	1000	989	-	-	-	-	0	5	1,38	7,37	-	-	-	-	-	-	-	-
87 S	30	30	1000	989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SG Sa L Imp	.mn ing	nelgei er-Lo	rät ch	P PGI X XM	P-GSP 1-2		Verd. V Vol. Du	√erdünnuı ırchflussra	ngsstu ate [l/1	fe nin]	log H log H	(1D ₅₀ /ml ((1D ₅₀ /m ³)	grau Virus	unterleg titer pro	gt) Virus 1 m ³ Lu	stiter des Is ft	olates	nach de	er Plaqu	eisolierung
S Imp	inge	er-Sie	eb	H HZ			A Volu	men des S	Samme	elmediu	ns [ml]			KID ₅	₆₀ /ml Vi	irustiter dei	Prob	e in der	Zellkult	ur
M MI) 8-	Samr	nler	t Sam	melzei	t [min.]	B Volu	men des u	ntersu	ichten Sa	ammelm	nediums [n	nl]	> grä	ößer bzw	v. gleich				

Tab. 71: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Stuttgart Mühlhausen (Klärwerk)

4.6.5.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die Ergebnisse der RT-nested-PCR zur Bestimmung der Inhibition sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Probe Nr. 145 blieb im LightCycler ohne Signal. Der Kurvenverlauf entsprach dem der Negativkontrolle der nested-PCR und wurde daher nicht ausgewertet. Die PGP-GSP-Proben 163, 166 und 167 waren praktisch stark, die Proben 147, 164 und 165 weniger stark inhibiert. Die Gelatinefilter der Proben 163 und 167 waren sehr stark mit Staub bzw. Nikotin verschmutzt. Alle MD 8- und HZ-Proben erwiesen sich als praktisch nicht inhibiert. Es wurden zwischen 10^{4,41} und 10^{6,13} Äq. KID₅₀/ml des zugesetzten Equinen-Rhinovirus (10⁵ KID₅₀/ml) detektiert. Bei den Proben des XM-2-Sammlers waren zwei Proben (Nr. 35 und 36) praktisch nicht inhibiert, bei zwei weiteren Proben (Nr. 39 und 40) musste jedoch mit einer Hemmung der PCR-Reaktion gerechnet werden. Ähnlich verhielt es sich bei den Proben der beiden Spezial-Impinger. Auch hier waren die meisten Proben inhibiert.

Aus Tab. 72 geht außerdem hervor, dass in keiner der untersuchten Proben mit der RT-nested-PCR humane Enteroviren und Polioviren nachgewiesen werden konnte.

		Equines-	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
45	HZ	5,53	-	n.n.	nein
35	XM-2	5,40	-	n.n.	nein
18	MD 8	5,09	-	n.n.	nein
46	HZ	6,13	-	n.n.	nein
36	XM-2	5,95	-	n.n.	nein
19	MD 8	4,90	-	n.n.	nein
145	PGP-GSP	kein Fluor	eszenzsignal	n.n.	nein
146	PGP-GSP	4,21	-	n.n.	nein
147	PGP-GSP	3,70	+	n.n.	nein
39	XM-2	3,13	+	n.n.	nein
20	MD 8	4,80	-	n.n.	nein
85	Impinger-Loch	3,35	+	n.n.	nein
83	Impinger-Sieb	3,29	+	n.n.	nein
163	PGP-GSP	-0,42	++	n.n.	nein
164	PGP-GSP	2,89	+	n.n.	nein
165	PGP-GSP	3,72	+	n.n.	nein
40	XM-2	4,19	+	n.n.	nein
21	MD 8	4,41	-	n.n.	nein
88	Impinger-Loch	3,23	+	n.n.	nein
84	Impinger-Sieb	3,33	+	n.n.	nein

Tab. 72: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Stuttgart Mühlhausen (Klärwerk)

		Equines-	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
22	MD 8	5,33	-	n.n.	nein
34	Impinger-Loch	6,12	-	n.n.	nein
98	Impinger-Sieb	3,11	+	n.n.	nein
23	MD 8	4,64	-	n.n.	nein
100	Impinger-Loch	3,91	-	n.n.	nein
87	Impinger-Sieb	3,80	+	n.n.	nein
166	PGP-GSP	1,57	++	n.n.	nein
167	PGP-GSP	0,10	++	n.n.	nein

Fortsetzung Tab. 72: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Stuttgart Mühlhausen (Klärwerk)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- **n.n.** Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert

4.6.5.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Nachweissysteme zeigt die nachfolgende Tab. 73. Demnach waren in Kultur nur die Proben 83, 88, 98 und 100 mit einem Titer von $10^{0,7}$ bzw. $10^{1,7}$ KID₅₀/ml positiv. Der molekularbiologische Erregernachweis war in keiner Probe dieses Standortes möglich. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass einige der untersuchten Proben inhibiert waren.

Tab. 73: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in Mühlhausen (Klärwerk)

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
45	HZ	-	-	-	-	-
35	XM-2	-	-	-	-	-
18	MD 8	-	-	-	-	-
46	HZ	-	-	-	-	-
36	XM-2	-	-	-	-	-
19	MD 8	-	-	-	-	-
39	XM-2	-	-	-	-	-
20	MD 8	-	-	-	-	-
85	Impinger-Loch	-	-	-	-	-
83	Impinger-Sieb	-	0,7	-	-	-
40	XM-2	-	-	-	-	-
21	MD 8	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 73: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von Humanen Enteroviren aus den Luftproben in Mühlhausen (Klärwerk)

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
88	Impinger-Loch	-	1,7	-	-	-
84	Impinger-Sieb	-	-	-	-	-
22	MD 8	-	-	-	-	-
34	Impinger-Loch	-	-	-	-	-
98	Impinger-Sieb	-	-	0,7	-	-
23	MD 8	-	-	-	-	-
100	Impinger-Loch	-	-	0,7	-	-
87	Impinger-Sieb	-	-	-	-	-

 8/
 Impinger-Sieb

 Äq. log KID₅₀/ml
 Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

- Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar

Probe inhibiert

4.6.6 Müllverbrennungsanlage (MVA) Stuttgart

In den Müllverbrennungsanlagen wurden beide Messungen (18.08. und 03.09.98) im Bereich des neuen Müllbunkers, der kein Dauerarbeitsplatz darstellt, durchgeführt. Hier werden alle Abfälle angeliefert, gelagert und geschreddert. Die Luft war sehr staubig und stickig. Für die dort Beschäftigten besteht in diesem Bereich Maskenpflicht.

Γab. 74: Probenumfang der	·Luftkeimmessungen in der MVA	Stuttgart
---------------------------	-------------------------------	------------------

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Impinger-Loch, Nr. 57		
Impinger-Sieb, Nr. 58	75	26.4
XM-2, Nr. 43	15	20,4
MD 8, Nr. 27		
Impinger-Loch, Nr. 55		
Impinger-Sieb, Nr. 56	67,4	28
XM-2, Nr. 44		
Impinger-Loch, Nr. 52		
Impinger-Sieb, Nr. 53	94,9	23,3
XM-2, Nr. 31		
Impinger-Loch, Nr. 51		
Impinger-Sieb, Nr. 54	06.1	23.5
XM-2, Nr. 32	70,1	23,3
MD 8, Nr. 28		

4.6.6.1 Kultureller Virusnachweis

Die Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung der Proben dieses Standortes sind Tab. 75 zu entnehmen. Auch hier zeigte sich, dass aus den Proben, die unter Verwendung des MD 8-Sammlers und XM-2 gesammelt wurden, keine Erreger nachgewiesen werden konnten. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Probe 51 gefunden. Sie betrug in den Zellsystemen VERO, BGM und A549 mindestens 5000 KID₅₀/ml. Die Isolate erreichten nach der Plaqueisolierung einen Titer zwischen 10^7 und 10^8 KID₅₀/ml. Bei den parallelen Messungen mit den beiden Impingern zeigte der Loch-Impinger in einem und der Sieb-Impinger in zwei Messdurchgängen die höhere Sammelleistung.

Schon nach kurzer Inokulation der Proben Nr. 27, 28, 31, 32 und 43 waren die Zellkulturen verpilzt. Außerdem waren die beiden Proben 27 und 28 sehr stark mit Staubpartikeln belastet, wodurch die mikroskopische Auswertung erschwert war. Bei der Virusvermehrung der Isolate der Proben 51 und 57 wurde erst nach einer Inkubation von sechs Tagen ein cpe in den Kulturen MA104 bzw. A549 sichtbar. Im Zellsystem A549 konnte ein cpe der Isolate 51 und 53 schon nach zwei Tagen detektiert werden.

						V	ERO			BGM				A549				Μ	A104	
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Menge A	Menge B	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml
57 L	30	30	1000	990	-1	50	2,35	6,75	0	5	1,35	7,12	0	5	1,35	8,62	0	5	1,35	7,50
58 S	30	30	1000	990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55 L	30	30	1000	990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 S	30	30	1000	990	0	5	1,35	6,75	0	5	1,35	7,75	-	-	-	-	-1	50	2,35	7,37
44 X	30	905	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52 L	30	30	1000	988	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53 S	30	30	1000	988	-1	50	2,35	7,12	-1	50	2,35	7,87	-1	50	2,35	6,87	-1	50	2,35	8,12
31 X	30	905	50	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51 L	30	30	1000	988	-3	>5000	>4,35	7,50	-3	>5000	>4,35	8,00	-3	>5000	>4,35	6,62	-2	500	3,35	7,00
54 S	30	30	1000	988	-	-	-	-	-2	500	3,35	7,62	-	-	-	-	0	5	1,35	8,00
32 X	30	905	50	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 75: Kulturelle	Virusisolierung aus	den Luftproben in	der MVA Stuttgart
---------------------	---------------------	-------------------	-------------------

Sammelgerät SG

Impinger-Loch L

Impinger-Sieb S

- MD 8-Sammler Μ
- Χ XM-2
- Sammelzeit [min] t

Verd. Verdünnungsstufe

Vol.Durchflussrate [l/min]AVolumen des Sammelmediums [ml]

Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml] B

KID50/mlVirustiter der Probe in der Zellkulturlog KID50/mlVirustiter pro 1 m3 Luftlog KID50/ml(grau unterlegt)Virustiter des Is Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

> größer bzw. gleich

4.6.6.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die nachfolgende Tab. 76 zeigt die Ergebnisse der im LightCycler durchgeführten Nachweise des zugesetzten Equinen-Rhinovirus und der humanen Enteroviren. Die höchste Wiederfindung zwischen $10^{6,6}$ und $10^{5,12}$ Äq. KID₅₀/ml des zugesetzten Spikes (10^5 KID₅₀/ml) wurde für die Proben des XM-2 ermittelt. Neben den XM-2-Proben waren auch die MD 8- und ein Teil der Impinger-Proben praktisch nicht inhibiert. Eine starke Inhibition der PCR-Reaktion wiesen hingegen die Impinger-Proben 54 bis 58 auf.

Bei den Versuchen zum Nachweis humaner Enteroviren konnte in fünf der untersuchten Proben der Erreger detektiert werden. Bei allen positiven Proben handelte es sich um Proben der Spezial-Impinger. Die höchsten Viruskonzentrationen mit $10^{3,74}$ und $10^{2,87}$ Äq. KID₅₀/ml wurden in den Proben 51 und 53 ermittelt. Alle positiven Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und sind in Abb. 96 dargestellt. Die spezifische Bande war in allen Ansätzen deutlich zu erkennen. Der spezifische Nachweis von Poliovirus ergab nur für die Probe 51 ein positives Signal bei 283 bp (s. Abb. 99).

		Equines-	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
57	Impinger-Loch	2,97	++	0,53	nein
58	Impinger-Sieb	2,75	++	n.n.	nein
43	XM-2	5,12	-	n.n.	nein
27	MD 8	4,03	-	n.n.	nein
55	Impinger-Loch	2,82	++	n.n.	nein
56	Impinger-Sieb	2,41	++	1,39	nein
44	XM-2	5,48	-	n.n.	nein
52	Impinger-Loch	4,95	-	n.n.	nein
53	Impinger-Sieb	5,54	-	2,87	nein
31	XM-2	6,44	-	n.n.	nein
51	Impinger-Loch	5,17	-	3,74	ja
54	Impinger-Sieb	2,17	++	1,40	nein
32	XM-2	6,60	-	n.n.	nein
28	MD 8	5,72	-	n.n.	nein

Tab. 76: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in der MVA Stuttgart

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- n.n. Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert



Bahn 1: Probe 51 Bahn 2: Probe 53 Bahn 3: Probe 54 Bahn 4: Probe 56 Bahn 5: Probe 57 M: 100 bp Marker

Abb. 96: Amplifikate der zweiten PCR aller im LightCycler als Enterovirus-positiv deklarierten Proben des Standortes MVA Stuttgart

4.6.6.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Beim Vergleich der Ergebnisse der Zellkultur und der PCR in Tab. 77 zeigte sich, dass alle in der Kultur positiven Impinger-Proben auch in der PCR positive Signale hatten. Die beiden Proben Nr. 58 und 55 waren in beiden Nachweissystemen ohne positive Resultate, wobei die Proben stark inhibiert waren. Die Quantifizierung der humanen Enteroviren lieferte für die Proben 57, 56 und 54 im Zellkultursystem höhere Werte als in der PCR. Dabei ist wiederum die starke Inhibition des PCR-Nachweises in diesen Proben zu berücksichtigen. Bei Probe 53 verhielt es sich in umgekehrter Weise. Hier war der ermittelte Virustiter in der PCR höher als in der Zellkultur. Entsprechende Werte konnte mit beiden Nachweissystemen für die Probe Nr. 51 bestimmt werden. Die PCR-Reaktion war dabei praktisch nicht inhibiert.

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml						
57	Impinger-Loch	0,53	1,7	0,7	0,7	0,7						
58	Impinger-Sieb	-	-	-	-	-						
43	XM-2	-	-	-	-	-						
27	MD-8	-	-	-	-	-						
55	Impinger-Loch	-	-	-	-	-						
56	Impinger-Sieb	1,39	0,7	0,7	-	1,7						
44	XM-2	-	-	-	-	-						
52	Impinger-Loch	-	-	-	-	-						
53	Impinger-Sieb	2,87	1,7	1,7	1,7	1,7						
31	XM-2	-	-	-	-	-						

 Tab. 77: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in der MVA Stuttgart

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
51	Impinger-Loch	3,74	>3,7	>3,7	>3,7	2,7
54	Impinger-Sieb	1,40	-	2,7	-	0,7
32	XM-2	_	-	-	-	-
28	MD 8	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 77: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in der MVA Stuttgart

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

größer bzw. gleich
 Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar
 Probe stark inhibiert

4.6.7 Abbruchgelände Augsburg

Die Probenahme am 19.05.99 fand auf dem Abbruchgelände der ehemaligen Textilfabrik statt. Da der Innenbereich der Fabrik massiv mit Taubenkot kontaminiert war, stand eine Untersuchung von Luft- und Substratproben auf Chlamydien (*Chl. Psittacii*) im Vordergrund. Gleichzeitig wurden Proben für einen virologischen Nachweis gezogen. Der Probenumfang des Horizontal-Zyklon-Sammlers betrug 79 ml (Nr. 47) und 217 ml (Nr. 48). Die personenbezogenen Messungen mit dem PGP-GSP-System erfolgten beim Reinigen der zu demontierenden Anlage und Fegen des Hallenbodens. Aufgrund der starken Staubentwicklung trugen die Arbeiter Atemschutzmasken. Das Filter der Probe Nr. 158 war nach der Sammlung stark verschmutzt.

Tab.	78:	Probenu	ımfang	der I	Luftkein	messung	g in	Augsburg	(Abbr	uchgelände))
							2		· · ·		· .

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
HZ, Nr. 47		
XM-2, Nr. 41	51,9	18,1
MD 8, Nr. 24		
HZ, Nr. 48		
Impinger-Sieb, Nr. 86	55,6	19,3
XM-2, Nr. 42		
PGP Arbeiter I, II Nr. 157, 158	55,6	19,3

4.6.7.1 Kultureller Virusnachweis

Der kulturelle Erregernachweis gelang, wie aus Tab. 79 hervorgeht, nur aus der Probe 47, die mit dem HZ gezogen wurde. Der Virustiter von -1,3 $\text{KID}_{50}/\text{m}^3$ war durch den hohen Luftdurchsatz des Sammlers bedingt. Der cpe wurde erst nach der Passage der VERO Zellen sichtbar. Das Isolat erreichte nach der Plaqueisolierung einen Titer von 10⁷ $\text{KID}_{50}/\text{ml}$.

						V	ERO]	BGM		A549					Μ	[A104	
Probe																				
Nr/			Menge	Menge			log	log												
SG	t	Vol.	Α	В	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	KID ₅₀ /m ³	KID ₅₀ /ml
47 H	30	690	92	79	0	5	0,05	7,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41 X	30	905	50	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 M	30	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 H	60	690	230	217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86 S	52	30	1000	987	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 X	50	905	50	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 79: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Augsburg (Abbruchgelände)

Sammelgerät SG

Η ΗZ

XM-2 Χ

MD 8-Sammler Μ

S Impinger-Sieb

Sammelzeit [min.] t

Durchflussrate [l/min] Vol.

Verd. Verdünnungsstufe

Volumen des Sammelmediums [ml] Α

Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml] В

KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur **log KID₅₀/m³** Virustiter pro 1 m³ Luft

log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

4.6.7.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Aus den Ergebnissen in Tab. 80 geht hervor, dass die Proben, die mit den "*high-volume*"-Sammlern, dem MD 8 und dem PGP-GSP-System gezogen wurden, eine hohe Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus aufwiesen. Es wurden $10^{4,02}$ bis $10^{5,64}$ Äq. KID₅₀/ml des Spikes detektiert. Die Impinger-Probe Nr. 86 war hingegen stark inhibiert. Es wurden nur $10^{1,61}$ Äq. KID₅₀/ml des zugesetzten Equinen-Rhinovirus wieder gefunden.

Alle Proben dieses Standortes waren in der RT-nested-PCR zum Nachweis von Poliovirus und humaner Enteroviren negativ.

<u> </u>		_			-
		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
47	HZ	5,46	-	n.n.	nein
41	XM-2	5,30	-	n.n.	nein
24	MD 8	4,52	-	n.n.	nein
48	HZ	5,44	-	n.n.	nein
86	Impinger-Sieb	1,61	++	n.n.	nein
42	XM-2	5,64	-	n.n.	nein
157	PGP-GSP	4,02	-	n.n.	nein
158	PGP-GSP	4,82	-	n.n.	nein

 Tab. 80: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Augsburg (Abbruchgelände)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

n.n. Virus nicht nachweisbar

- Probe nicht inhibiert

+ Probe inhibiert

++ Probe stark inhibiert

4.6.7.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Tab. 81 fasst die Ergebnisse des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises zusammen. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme der Impinger-Probe 47, alle Proben dieses Standortes sowohl in der Zellkultur als auch in der PCR negativ waren. Die Probe 47, die in der Kultur einen Titer von $10^{0.7}$ KID₅₀/ml hatte, war die einzige Probe des HZ, aus der im Rahmen dieser Arbeit der Virusnachweis gelang.

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
47	HZ	-	0,7	-	-	-
41	XM-2	-	-	-	-	-
24	MD 8	-	-	-	-	-
48	HZ	-	-	-	-	-
86	Impinger-Sieb	-	-	-	-	-
42	XM-2	-	-	-	-	-

 Tab. 81: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von Humanen Enteroviren aus den Proben in Augsburg (Abbruchgelände)

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

- Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbar

Probe stark inhibiert

4.6.8 Kanalisation Stuttgart

Am 17.08.99 wurden ausschließlich personenbezogene Luftkeimmessungen mit Ex-geschützten Pumpen (2 l/min.) durchgeführt. Die Beschäftigten waren in der Kanalisation mit dem Reinigen der Abwasserrinne beschäftigt. Unter Tage betrug die Temperatur 20,5 °C und die relative Luftfeuchte 82,6 %. Der schlammige, intensiv riechende Aushub wurde mittels Seilwinde nach oben befördert und auf einem Kleinlaster abgekippt. Aufgrund des Spritzwassers während der Tätigkeiten wurden Polycarbonat-Filter verwendet. Die Probennummern lauteten Nr. 76-80 und 82. Das Sickerwasser des Aushubs wurde ebenfalls untersucht (Nr. 81). Die Proben wurden am selben Tag aufgearbeitet.

4.6.8.1 Kultureller Virusnachweis

Der kulturelle Virusnachweis erfolgte nur aus der Sickerwasserprobe Nr. 81. Bei der Inokulation der Probe zeigte sich eine hohe Belastung mit Bakterien, wodurch die Verdünnung -1 für die Passage verwendet werden musste. Der Erregernachweis gelang in der Linie A549. Es ergaben sich ein Titer von 50 KID₅₀/ml. Das Isolat erreichte nach der Virusvermehrung einen Titer von $10^{6,25}$ KID₅₀/ml.

4.6.8.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Mit Ausnahme der Sickerwasserprobe 81 wurden an diesem Standort nur Polycarbonat-Filter molekularbiologisch untersucht, die mit dem PGP-GSP-System beprobt waren. Die Ergebnisse sind in Tab.82 aufgelistet. Demnach waren mit Ausnahme der Probe Nr. 78 alle Proben dieses Standortes inhibiert bzw. stark inhibiert. Es wurden $10^{2,9}$ bis $10^{3,76}$ Äq. KID₅₀/ml des zugesetzten Equinen-Rhinovirus (10^5 KID₅₀/ml) detektiert.

Bei der Untersuchung zum Nachweis humaner Enteroviren zeigte nur die Sickerwasserprobe bei 86,9 °C einen Peak (s. Abb. 97). Anhand des mitgeführten Standards ergab sich eine Viruskonzentration von 10^{2,43} Äq. KID₅₀/ml. Die Schmelztemperatur der Positivkontrolle lag hingegen bei 88 °C. Die Auftrennung des im LightCycler positiven Amplifikates im Agarosegel (s. Abb. 98) zeigte, dass das gebildete Produkt mit einer Schmelztemperatur von 86,9 °C als spezifisch zu betrachten war. Keine der untersuchten Proben lieferte in der RT-nested-PCR zum Nachweis von Poliovirus ein positives Resultat.

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
76	PGP-GSP	3,19	+	n.n.	nein
77	PGP-GSP	3,76	+	n.n.	nein
78	PGP-GSP	3,92	-	n.n.	nein
79	PGP-GSP	2,90	++	n.n.	nein
80	PGP-GSP	2,97	++	n.n.	nein
82	PGP-GSP	3,05	+	n.n.	nein
81	Sickerwasser	3,58	+	2,43	nein

Tab.	82:	Moleku	larbiol	ogische	r Virusna	achweis	aus den	Proben	in de	er Kana	lisation
	~- •	111010110	aloioi	obisene	1100011		add dell	11000	111 000	or realing	110401011

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- **n.n.** Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert

4.6.8.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

Von diesem Standort wurde nur die Sickerwasserprobe 81 in beiden Systemen untersucht. Die kulturelle Isolierung gelang in der Zelllinie A549, wobei ein Titer von $10^{1,7}$ KID₅₀/ml ermittelt wurde. Er lag somit unter dem mit der PCR kalkulierten Wert, wobei eine Hemmung der PCR-Reaktion bei der Beurteilung der Resultate berücksichtigt werden muss.

4.6.9 Kläranlage Stuttgart Plieningen

In der Kläranlage Plieningen fanden zwei Messtermine statt (25.08. und 28.09.99). Beide Messungen wurden während Reinigungsarbeiten der leergepumpten Belebtschlammbecken durchgeführt. Dabei wurden die Wände, der Boden und die Belüftungskerzen von zwei Mitarbeitern (mit Atemschutzmasken) der Kläranlage, die sich im Becken befanden abgespritzt. Die Ausrichtung der Sammler war an beiden Messterminen problematisch, da sich der Wind ständig drehte. Beide standortbezogenen Messungen wurden am Rand des zu reinigenden Beckens durchgeführt. Der Horizontal-Zyklon schied 125 ml (Nr. 95), 180 ml (Nr. 94), 220 ml (Nr. 121) und 107 ml (Nr. 120) ab. Die Proben 90 bis 95, 115 und 116 wurden bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag aufgearbeitet. Aus arbeitstechnischen Gründen betrug die Sammelzeit bei den Proben Nr. 90 bis 97 nur 45 min.

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Standort I (25.08.99):		
Impinger-Loch, Nr. 90		
XM-2, Nr. 96	63,2	21,9
MD 8, Nr. 92		
HZ, Nr. 95		
Impinger-Loch, Nr. 91		
XM-2, Nr. 97	49.2	26.3
MD 8, Nr. 93	47,2	20,5
HZ, Nr. 94		
PGP Arbeiter I, II, Nr. 159, 160	66,8	21,9
Standort II (28.09.99):		
XM-2, Nr. 117	76.8	174
MD 8, Nr. 115	70,0	17,4
HZ, Nr. 121		
Impinger-Loch, Nr. 123		
XM-2, Nr. 118	64.6	17.6
MD 8, Nr. 116	04,0	17,0
HZ, Nr. 120		
PGP Arbeiter I, Nr. 153, 155	65.2	174
PGP Arbeiter II, Nr. 154, 156	05,2	17,т
PGP Arbeiter I, II, Nr. 161, 162	49,2	26,3

Tab. 83: Probenumfang der Luftkeimmessungen in Plieningen (Klärwerk)

4.6.9.1 Kultureller Virusnachweis

An diesem Standort gelang in drei Proben der kulturelle Virusnachweis. Die Ergebnisse sind in Tab. 84 dargestellt. Demnach waren die Proben 90, 96 und 91 positiv, wobei der Nachweis in jeweils einem der beiden Zellsysteme VERO und BGM erfolgte. Der Virustiter von $10^{-0.2}$ KID₅₀/m³ der Probe 96 war durch den hohen Luftdurchsatz des XM-2-Sammlers bedingt. Die Isolate hatten nach der Plaquereinigung einen Titer von ca. 10^7 KID₅₀/ml.

Der kulturelle Virusnachweis aus der Probe des XM-2 (Nr. 96) war erst nach der Passage möglich. Bei der Überprüfung der ZKÜ der Verdünnungsstufe 0 auf das Vorhandensein von Rotaviren mit dem Enzym-Immunoassay Ridascreen (s. 3.7.2), zeigten die Proben 91 und 92 einen positiven Farbumschlag. In beiden Fällen war ein cup des Doppelansatzes eindeutig positiv, wobei die Probe 91 auch im zweiten Ansatz einen leichten Farbumschlag aufwies. Die Überstände wurden zusätzlich im EIA nach dem unter 3.2.3 beschriebenen Protokoll untersucht. Das Ergebnis war negativ. Es konnten keine gefärbten Infektionsherde detektiert werden.

						V	ERO			BGM			A549				MA104			
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Menge A	Menge B	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml
90 L	45	30	1000	989	0	5	1,18	7,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96 X	45	905	50	39	-	-	-	-	0	5	-0,20	7,25	-	-	-	-	-	-	-	-
92 M	45	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95 H	45	690	136	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91 L	45	30	1000	989	-1	50	2,18	6,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97 X	45	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93 M	45	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94 H	45	690	191	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117 X	60	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115 M	60	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121 H	60	690	231	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123 L	60	30	1000	989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118 X	60	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116 M	60	30	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120 H	40	690	118	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 84: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Plieningen (Klärwerk)

Sammelgerät SG

Impinger-Loch L

XM-2 Х

- MD 8-Sammler Μ
- ΗZ Η
- Sammelzeit [min.] t
- Vol. Durchflussrate [l/min]

- Volumen des Sammelmediums [ml] Α
- B Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml]

Verd. Verdünnungsstufe

KID₅₀/**ml** Virustiter der Probe in der Zellkultur **log KID**₅₀/**m**³ Virustiter pro 1 m³ Luft

log KID₅₀/ml (grau unterlegt) Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

4.6.9.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung sind in Tab. 85 zusammengefasst. Auffallend war, dass am Standort I (25.08.99), mit Ausnahme der beiden Proben Nr. 95 und 160, alle Proben inhibiert bzw. stark inhibiert waren. Anders verhielt es sich bei der Messung am 28.09.99. am Standort II. Hier waren nur die PCR-Reaktionen der Proben der "highvolume"-Sammler gehemmt. Die geringste Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus mit $10^{0.96}$ Äq. KID₅₀/ml wurde für die PGP-GSP-Probe 162 ermittelt. In allen anderen untersuchten Proben wurden zwischen $10^{2,21}$ und $10^{4.49}$ Äq. KID₅₀/ml detektiert.

Bei der RT-nested-PCR zur Detektion humaner Enteroviren hatte sich gezeigt, dass alle untersuchten Proben ohne spezifisches Signal waren. Die Probe 96 hatte im LightCycler einen Peak bei einer Schmelztemperatur von 85 °C (s. Abb. 97). Das Amplifikat blieb jedoch im Agarosegel ohne spezifische Bande. Das gebildete Produkt war als "Schmierbande" sichtbar (s. Abb. 98). Der molekularbiologische Nachweis von Poliovirus war ebenfalls in allen untersuchten Proben dieses Standortes negativ.

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
90	Impinger-Loch	3,02	++	n.n.	nein
96	XM-2	3,22	++	n.n.	nein
92	MD 8	2,98	++	n.n.	nein
95	HZ	4,25	-	n.n.	nein
91	Impinger-Loch	2,21	++	n.n.	nein
97	XM-2	2,89	++	n.n.	nein
93	MD 8	2,56	++	n.n.	nein
94	HZ	3,25	+	n.n.	nein
159	PGP-GSP	3,04	++	n.n.	nein
160	PGP-GSP	4,49	-	n.n.	nein
161	PGP-GSP	2,78	++	n.n.	nein
162	PGP-GSP	0,96	++	n.n.	nein
117	XM-2	3,22	-	n.n.	nein
115	MD 8	3,60	-	n.n.	nein
121	HZ	3,37	-	n.n.	nein
123	Impinger-Loch	3,66	-	n.n.	nein
118	XM-2	3,18	+	n.n.	nein
116	MD 8	4,00	-	n.n.	nein
120	HZ	2,62	+	n.n.	nein
153	PGP-GSP	4,21	-	n.n.	nein
155	PGP-GSP	4,14	-	n.n.	nein
154	PGP-GSP	4,13	-	n.n.	nein
156	PGP-GSP	4,28	-	n.n.	nein

Tab. 85: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Plieningen (Klärwerk)

Virustiter der Probe in der PCR Âq. log KID₅₀ml n.n. Probe nicht inhibiert + Probe inhibiert ++

Virus nicht nachweisbar Probe stark inhibiert

4.6.9.3 Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises

In der nachfolgenden Tab. 86 sind die Ergebnisse der beiden Nachweissysteme nochmals zusammengefasst. Die kulturelle Virusisolierung war demnach in den Proben 90, 96 und 91 in jeweils nur einem Zellsystem möglich. Der PCR-Nachweis war, wie bereits erwähnt, in allen Luftproben negativ, wobei mehr als die Hälfte aller Proben inhibiert bzw. stark inhibiert waren.

Tab. 86: Vergleich des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises von humanen Enteroviren aus den Luftproben in Plieningen (Klärwerk)

Proben Nr.	Sammelgerät	PCR Äq. log KID ₅₀ /ml	VERO log KID ₅₀ /ml	BGM log KID ₅₀ /ml	A549 log KID ₅₀ /ml	MA104 log KID ₅₀ /ml
90	Impinger-Loch	-	0,7	-	-	-
96	XM-2	-	-	0,7	-	-
92	MD 8	-	-	-	-	-
95	HZ	-	-	-	-	-
91	Impinger-Loch	-	1,7	-	-	-
97	XM-2	-	-	-	-	-
93	MD 8	-	-	-	-	-
94	HZ	-	-	-	-	-
117	XM-2	-	-	-	-	-
115	MD 8	-	-	-	-	-
121	HZ	-	-	-	-	-
123	Impinger-Loch	-	-	-	-	-
118	XM-2	-	-	-	-	-
116	MD 8	-	-	-	-	-
120	HZ	-	-	-	-	-

Äq. log KID50/mlVirustiter der Probe in der PCRlog KID50/mlVirustiter der Probe in der Zellkultur-Virus nicht nachweisbar bzw. isolierbarProbe inhibiertProbe stark inhibiert

4.6.10 Mülldeponie Stetten

Die Messung auf der Mülldeponie wurde am 30.09.99 bei leichtem Regen durchgeführt und musste aufgrund stärker werdenden Niederschlags nach einer Sammelzeit von 42 min. abgebrochen werden. Die Sammler wurden in der Nähe des Bohrlochs unmittelbar neben dem schwarzen, nassen, chemisch riechenden Aushub platziert. Die Probenmenge des Horizontal-Zyklons betrug 150 ml. Gleichzeitig wurde der Betreiber des Bohrgerätes mit dem PGP-GSP-System beprobt.

Tab. 87: Probenum ang der Luftkeimmessung in Stetten (Depor
--

Probenbezeichnung	RF [%]	T [°C]
Impinger-Loch, Nr. 124		
XM-2, Nr. 119	84,3	17,1
HZ, Nr.122		
PGP, Arbeiter, Kabine offen, Nr. 168	84,3	17,1

4.6.10.1 Kultureller Virusnachweis

Wie aus Tab. 89 hervorgeht, konnte in keiner der kulturell untersuchten Proben dieses Standortes Virus nachgewiesen werden.

4.6.10.2 Molekularbiologischer Virusnachweis

Die Versuche zur Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus ergaben, dass mit Ausnahme der PGP-GSP-Probe 168, eine RT-nested-PCR in allen gesammelten Proben möglich war. In Probe 168 konnte das Rhinovirus praktisch nicht nachgewiesen werden. Es wurde nur 1 Äq. KID₅₀/ml des Spikes wieder gefunden.

Beim molekularbiologischen Nachweis von Poliovirus und humaner Enteroviren hatte sich gezeigt, dass alle untersuchten Proben dieses Standortes, wie bereits auch in der Zellkultur, negativ waren. Mit Ausnahme der HZ-Probe 122 waren alle Proben inhibiert bzw. stark inhibiert

		Equines-F	Rhinovirus	humane Enteroviren	Poliovirus
Proben Nr.	Sammelgerät	Äq. log KID ₅₀ /ml	Inhibition	Äq. log KID ₅₀ /ml	Signal in PCR
124	Impinger-Loch	2,98	+	n.n.	nein
119	XM-2	2,16	+	n.n.	nein
122	HZ	3,90	-	n.n.	nein
168	PGP-GSP	-1,52	++	n.n.	nein

Tab. 88: Molekularbiologischer Virusnachweis aus den Luftproben in Stetten (Deponie)

Äq. KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

- n.n. Virus nicht nachweisbar
- Probe nicht inhibiert
- + Probe inhibiert
- ++ Probe stark inhibiert

					VERO				BGM			A549				MA104				
Probe Nr/ SG	t	Vol.	Menge A	Menge B	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml	Verd.	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /m³	log KID ₅₀ /ml
124 L	42	30	1000	998	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119 X	42	905	50	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
122 H	[42	690	161	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 89: Kulturelle Virusisolierung aus den Luftproben in Stetten (Deponie)

SG Sammelgerät

L Impinger-Loch

- X XM-2
- H HZ
- t Sammelzeit [min.]
- Vol. Durchflussrate [l/min]

A Volumen des Sammelmediums [ml]

B Volumen des untersuchten Sammelmediums [ml]

Verd. Verdünnungsstufe

KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

 $\log \text{KID}_{50}/\text{m}^3$ Virustiter pro 1 m³ Luft

log KID₅₀/ml (grau unterlegt)

Virustiter des Isolates nach der Plaqueisolierung

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Außenversuche

Bei der Inokulation der aufgearbeiteten Luftproben wurden keine toxischen Effekte in den verwendeten Zellkultursystemen beobachtet. Insgesamt wurden 115 Proben in der Zellkultur untersucht, von denen 46 positiv waren, indem sie cytopathische Effekte hervorriefen. Dabei konnten in der Zelllinie VERO in 33, BGM in 38, A549 in 27 und MA104 in 26 Proben Virus detektiert werden. Aus Tab. 90 geht hervor, dass die Virusisolierung aus den MD 8-Proben in keinem Fall und aus den Proben der beiden "*high-volume*"-Sammlern jeweils nur in einem Fall möglich war. Die Proben, die mit den Spezial-Impingern gesammelt wurden, waren zu 75 % und die Substratproben zu 81 % in der Zellkultur positiv. Es wurden dabei Titer von 10^{0,7} bis 10^{3,7} KID₅₀/ml bestimmt. Die höchsten Konzentrationen wurden an den Standorten Kaltental und Müllverbrennungsanlage (MVA) ermittelt.

Die molekularbiologische Untersuchung der Proben zur Bestimmung der Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus ergab, dass mit Ausnahme der Probe 145 die Nukleinsäureextraktion und eine anschließende Amplifikation in allen Proben gelungen war. Die Quantifizierung des Equinen-Rhinovirus anhand des mitgeführten Standards zeigte, dass die Proben die RT-nested-PCR-Reaktion in unterschiedlichem Maß inhibierten. So war beispielsweise die durch Nikotin gelb gefärbte PGP-GSP-Probe Nr. 167 sehr stark inhibiert, wohingegen Probe Nr. 1 praktisch nicht inhibiert war. Es wurden 10¹ bzw. 10^{5,41} Äq. KID₅₀/ml der zugesetzten Spikes (10⁵ KID₅₀/ml) wieder gefunden.

Der PCR-Nachweis aller anderen im Rahmen dieser Arbeit zu bestimmenden Viren zeigte, dass in keiner der 160 untersuchten Proben Hepatitis A- und Hepatitis B-Virus, Hanta- und Rotavirus nachgewiesen werden konnte. Die in Tab. 90 aufgelisteten positiven Ergebnisse ergaben sich unter Verwendung der RT-nested-PCR zum Nachweis von humanen Enteroviren und Poliovirus. Demnach konnten in ca. 19 % aller untersuchten Proben humane Enteroviren nachgewiesen werden. Die anhand der mitamplifizierten Standards (Polio Sabin S) quantifizierte Virusmenge betrug dabei bis zu 10^{3,53} Äq. KID₅₀/ml. Der Nachweis war aus den Proben der Spezial-Impinger und den Substratproben möglich. Der qualitative Nachweis von Poliovirus gelang aus sechs der untersuchten Proben, wobei es sich dabei um Luftproben handelte, die mit einem der beiden Spezial-Impinger gezogen worden waren.

Sammler	Probenanzahl	positiv in Kultur (cpe)	positiv in humane Enterovirus-PCR	positiv in Poliovirus-PCR
MD-8	26	0	0	0
XM-2	23	1	0	0
HZ	9	1	0	0
Impinger	41	31	21	6
Abwasser	15	12	9	0
Sickerwasser	1	1	1	0
PGP	45	kein Nachweis	0	0

Tah	90.	Zusammen	fassuno	der	Ergehnisse	der	Außenversuche
1 av.	JU.	Lusammen	lassung	uu	Ligeomsse	uci	Aubenversuene

Bei der Gegenüberstellung des kulturellen und molekularbiologischen Erregernachweises zeigte sich, dass zwei Proben in der PCR positiv waren, wohingegen sie in der Zellkultur ohne cpe waren. Entsprechend waren 17 Proben in Kultur positiv, wobei der molekularbiologische Nachweis ohne Signal im LightCycler blieb. Bei vier Proben entsprachen sich die ermittelten Titer beider Testsysteme. Für sieben Proben konnten mit der PCR und für 18

Proben mittels der Zellkultur höhere Titer bestimmt werden. Für die Interpretation der Daten muss dabei jedoch die Hemmung der PCR-Reaktion einiger Proben berücksichtigt werden.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen zeigen Besonderheiten, die bei der Auswertung mit dem LightCycler auftraten. Vier Proben wurden exemplarisch herausgenommen. Die Probe 64 war sowohl in der Schmelzkurvenanalyse als auch in der Gelelektrophorese eindeutig Enterovirus-positiv. Im LightCycler zeigten die Proben 81 und 99 im Vergleich zur Positivkontrolle eine Verschiebung des Schmelzpunktes um 1 °C. Die Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate ergab für die Probe 81 eine Enterovirus-spezifische Bande, wohingegen sie für die Probe 99 ausblieb. Eine weitere Verschiebung des Schmelzpunktes um 1,5 °C der Probe 96 im LightCycler ergab im Agarosegel weder eine spezifische noch unspezifische Bande.



Abb. 97: Schmelzkurven der Zweiten PCR von humanen Enteroviren der Proben 64, 81, 96 und 99



Bahn 1: Probe 81 Bahn 2: Probe 64 Bahn 3: Probe 96 Bahn 4: Probe 99 M: 100 bp Marker

Abb. 98: Amplifikate der zweiten PCR von humanen Enteroviren im LightCycler der Proben 81, 64, 96 und 99

In den nachfolgenden beiden Abbildungen 99 und 100 sind die Amplifikate der zweiten PCR der Polio-spezifischen RT-nested-PCR einiger Luftproben exemplarisch dargestellt. Von allen untersuchten Proben zeigten die Proben 38, 51, 60, 65, 67 und 72 eine spezifische Bande bei 283 bp.



Bahn	1: Probe 37	Bahn 12: Probe 48
Bahn	2: Probe 38	Bahn 13: Probe 49
Bahn	3: Probe 39	Bahn 14: Probe 50
Bahn	4: Probe 40	Bahn 15: Probe 51
Bahn	5: Probe 41	Bahn 16: Probe 52
Bahn	6: Probe 42	Bahn 17: Probe 53
Bahn	7: Probe 43	Bahn 18: Probe 54
Bahn	8: Probe 44	Bahn 19: PK
Bahn	9: Probe 45	Bahn 20: PK
Bahn	10: Probe 46	Bahn 21: NK
Bahn	11: Probe 47	M: 100 bp Marker

Abb. 99: Amplifikate der zweiten PCR von Poliovirus der Luftproben 37-54

2 7 0 11 27 14	Bahn 1: Probe 59	Bahn 16: Probe 74
2 / 9 14 2/ M	Bahn 2: Probe 60	Bahn 17: Probe 75
A BOONDARA BEARD PERSONAL ARCO	Bahn 3: Probe 61	Bahn 18: Probe 76
	Bahn 4: Probe 62	Bahn 19: Probe 77
	Bahn 5: Probe 63	Bahn 20: Probe 78
	Bahn 6: Probe 64	Bahn 21: Probe 79
	Bahn 7: Probe 65	Bahn 22: Probe 80
	Bahn 8: Probe 66	Bahn 23: Probe 81
	Bahn 9: Probe 67	Bahn 24: Probe 82
	Bahn 10: Probe 68	Bahn 25: Probe 83
	Bahn 11: Probe 69	Bahn 26: Probe 84
	Bahn 12: Probe 70	Bahn 27: PK
	Bahn 13: Probe 71	Bahn 28: NK
	Bahn 14: Probe 72	M: 100 bp Marker
	Bahn 15 [.] Probe 73	-

Abb. 100: Amplifikate der zweiten PCR von Poliovirus der Luftproben 59-84

Die Ergebnisse der Sequenzierung einiger Plaque-gereinigter Isolate ist nachfolgend dargestellt. Mit Ausnahme der Isolate 81 (Sickerwasser) und 102 und 108 (Abwasser) handelte es sich bei allen anderen Isolaten um Viren, die aus Luftproben isoliert worden waren. Der Vergleich der einzelnen Sequenzen gegen die Datenbank zeigte, dass es sich bei allen Isolaten aus Luft- und Abwasserproben um Poliovirus vom Typ 1 handelte. Das Isolat aus der Sickerwasserprobe 81 konnte als Echovirus identifiziert werden. Bei genauer Betrachtung der Sequenzen der Poliovirus-Isolate lassen sich jedoch einige Unterschiede erkennen. So unterscheiden sich die Proben 53, 54 und 56 in zahlreichen Sequenzabschnitten deutlich von den restlichen Isolaten. Die beiden Proben 102 und 38 unterschieden sich hingegen in weit aus wenigeren Sequenzbereichen.

		1				50
Probe	102	.CCTTCCGTA	TCTAGAC.CA	CAAAAC.AAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	38	.CCTTCCGTA	TCTAGAC.CA	CAAAAC.AAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	53		A	TAAATAAAGG	TNTCACCNNC	ACCAAAGT
Probe	54		GCA	TAAATAAAGG	ATAATACGGC	NACCCAAAGT
Probe	56		A	TAAATAAAGG	ATTC.ACGCN	GACCCAAAGT
Probe	81				TAGAC	AACTCAGTGA
Probe	33	CCTTCCGTAA	CTTAGACGCA	CAAAAC.AAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	37	CCTTCCGTAA	CTTAGACGCA	CAAAACCAAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	51		.TTAGACGCA	CAAAACCAAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	63				TCAAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	65		CGCA	CAAAACCAAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	72		GCA	CAAAACCAAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
Probe	108		.TTAGACGCA	CAAAACCAAG	TTCAATAGAA	GGGGGTACAA
		51				100
Probe	102	ACATTAC.	.AC.ACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC	CGGTGATG
Probe	38	ACATTAC.	.AC.ACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC	CGGTGATG
Probe	53	AGTCGGTTCC	GCCACAGGAC	TTGCGTCGTT	ACGACAGG.C	CAATCACTGG
Probe	54	AGTCGGTTCC	GC.CAAAGAC	TTGCG.CTTT	ACGACAGG.C	CAATCACTGG
Probe	56	AGTCGGTTCC	TCGCAAAGAC	TTGCG.CTTT	ACGACAGG.C	CAATCACTGG
Probe	81	GCCAACTGA.	.GCAATGACC	AAGCA.C.TT	CTGTTGCCCC	GGACCAAG
Probe	33	ACCA.GTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
Probe	37	ACCA.GTACA	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
Probe	51	ACCA.GTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCCAC	CGGTGATG
Probe	63	ACCA.GTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.CATT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
Probe	65	ACCACGTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
Probe	72	ACCACGTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
Probe	108	ACCACGTAC.	CACCACGAAC	AAGCA.C.TT	CTGTTTCC.C	CGGTGATG
		101				150
Probe	102	101 T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG	CACGGATC	150 CGTTATCCG.
Probe Probe	102 38	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC CACGGATC	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe	102 38 53	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT	CACGGATC CACGGATC TAGCCGCATT	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG. CAGGGGCCCGG
Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT	CACGGATC CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG
Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT	CACGGATC CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG
Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTAGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAGG	CACGGATC CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTACCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTAGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAGG TGGTTGAAAG	CACGGATC CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTACCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTAGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CGTTATCCG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTACCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTACCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAGG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTACCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 63	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA C.TGCTAGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTAGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG AGGTTGGAA AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.51 CTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.TGTATAGA 1.TGTATAGA 1.TGTATAGA 	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.51 CTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCTACCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TATCAATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA C.TTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT AGGTTGGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.51 CTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTAGCTCAA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC CG.ACCTCGG AC.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG.
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA 1.51 CTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTAGCTCAA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC	CACGGATC C.ACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC CG.ACCTCGG AC.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 27	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.TGTATAGA T.TGTATAGA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTAGCTCAA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC CG.ACCTCGG AC.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT ACCACCATGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.GGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC GAAACCTAGT GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC CG.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.GGATTCTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC GAAACCTAGT GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC CG.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.GGATTCTA AGGATTCTA AGGATTCTA AGGATTCTA AGGATTCTA AGGATTCTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTAGCTCAA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACCGGATC AC.ACCTCGG AC.ACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGCCG. CGTCG. CGCCGCCG. CGCCGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.GGATTCTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGAT AGGTTGGGAT AGGTTGAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCAT GAAGCCAT TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC TAGGCTCTTC GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGCATCG AC.ACCTCGG AC.ACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTCGC. CGTCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	101 T.TGTATAGA T.TGTATAGA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTGACCA TTTGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA T.TGTATAGA A.GGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA AGGATTCTTA	C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA CCTGCC.CCA C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG C.TGCTTGCG TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA TGTACTTCGA	TGGTTGAAAG AGGTTGGAAG AGGTTGGAT AGGTTGGGAT CGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG TGGTTGAAAG GGTTGAAAG GAAGCCA.T GAAGCCA.T GAAGCCA.T GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT GAAGCCCAGT	CACGGATC TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT TAGCCGCATT AGAAAACGTC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGGATC CG.ACGCATCG AC.ACCTCGG AC.ACCTTGT AC.ACCTTGT ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG ACCACCTCGG	150 CGTTATCCG. CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CAGGGGCCGG CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGTTATCCG. CGTCG. CGCCG. CGTCG. CGTCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. CGCCG. C
		201				250
---	---	---	--	--	---	---
Probe	102	GCGTTGCGCT	CAGCA.TC.A	ACCCCAGA.T	GTAGCTTAGG	CTGATG.A.T
Probe	38	GCGTTGCGCT	CAGCA.TC.A	ACCCCAGA.T	GTAGCTTAGG	CTGATG.A.T
Probe	53	GCGTCCCATG	GCGTTA	GCCATAG	GTAGGCCG	CCAACGCAGC
Probe	54	GCGTCCCATG	GCGTTA	GCCATAG	GTAGGCCG	CCAACGCAGC
Probe	56	GCGTCCCATG	GCGTTA	GCCATAG	GTAGGCCG	CCAACGCAGC
Probe	81	GTGTTTCGCT	CCGCAC.A	ACCCCAGT	GTAGATCAGG	CCGATG.AGC
Probe	33	GCGTTGCGCT	CAGCACTCTA	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	37	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	51	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	63	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	65	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	72	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
Probe	108	GCGTTGCGCT	CAGCACTC.A	ACCCCAGAGT	GTAGCTTAGG	CTGATG.AGT
		0 5 1				200
Ducho	100		ПСЛСССССС		лссспссспп	
Probe	20	CIGGACAICC	.ICACCGGIG	ACGGIGG.CC	AGGCIGCGII	GGCGGC.I
Probe	53	CIGGACAICC	. ICACCGGIG	ACGGIGG.CC	AGGCIGCGII	
Probe	54	CTGGACCACC	GTCACCGGTG	AGGGAT.ICC	AGACICATCA	GCCTAAGCTA
Probe	56	CTGGACCACC	GTCACCGGTG	AGGGATGICC	AGACICATCA	GCCTAAGCTA
Probe	81	CACCACACTC	CCCACGGGCG	ACCGTGGTGG	TGGCTGCGCT	GGCG GCCT
Probe	33	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCG. GCCT
Probe	37	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
Probe	51	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
Probe	63	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
Probe	65	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
Probe	72	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
Probe	108	CTGGACATCC	CTCACCGGTG	ACGGTGGTCC	AGGCTGCGTT	GGCGGCCT
		301				350
Probe	102	301 AC.TATGG	TAACGCCATG	GGACGC	.TAGTTGT	350 GAACAAGGTG
Probe Probe	102 38	301 AC.TATGG AC.TATGG	TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe	102 38 53	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG
Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGGG.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT T AGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GA.CATGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT T AGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GA.CATGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGGG ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GA.CATGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT AACAAGGTC
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCATCGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT AAOO C.TGAATGTC
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. TGAA.GAGC. TGAA.GAGC.	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT CAACAAGGTT GAACAAGGTT CAACAAGGTC C.TGAATGTC C.TGAATGTC
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. GTACTGGCCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT GAACAAGGTT CAACAAGGTT CAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GTCGCTTTCA
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT	TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC	.TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CACCAAGGTG CCCCTCCA
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33	301 AC.TATGG AC.TATGG. CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. CGAA.GAGC. GTACTGGGCT GTACTGGGCT CGAA.GAGCC	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGTAAGAATC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTG CTGAATGTC GTCGCTTTCA GTCGCTTTCA GTCGCTTTCA CCTGAATGCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT CGAA.GAGCC TGAA.GAGCC	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA TATTGAGCTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC CATAAGAATC CATAAGAATC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTC CAACAAGGTC CAACAAGGTC C. TGAATGTC GTCGCTTTCA GTCGCTTTCA GTCGCTTTCA CCTGAATGCG CCTGAATGCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT CGAA.GAGCC TGAA.GAGCC TGAA.GAGCC	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GA.CATGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTT GAACAAGGTT CAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC GAACAAGGTC CTGAATGCC CCTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT TGAA.GAGCC TGAA.GAGCC TGAA.GAGCC	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GA.CATGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GCTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 75 108 102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG GCCATGGG. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. ACCTATGGC. CTACTGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACTGGGCT GTACAGACC TGAA.GAGCC TGAA.GAGCC TGAA.GAGCC	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TACGCCATG TACGCCATG TATTGAGCTA TCTCGAAGTA TCTCGAAGTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC	.TAGTTGT .TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG CACCAAGGTG CTGAATGCC CTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG
Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe Probe	102 38 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72 108 102 38 53 54 53 54 56 81 33 37 51 63 65 72	301 AC.TATGG AC.TATGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTCTGGGG CACTATGGC. ACCTATGCC. ACCTATGCC. ACCTATGCC. ACCTATGCC. ACCTATGC. A	TAACGCCATG TAACGCCATG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG TTGAGTGCTG GTAACCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TAACGCCATG TATGAGCTA CTCCGAAGTA TCTCCGAAGTA TCTCCGAAGTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA TATTGAGCTA	GGACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC AGCGCAACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC GGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CGACGC CATAAGAATC CATAAGCGGA ATTGGTAGTC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC CATAAGAATC	.TAGTTGT ATCGAAGA ATCGAAGA ATCGTAGAGA ATCGTAGAGA .TTCAATACT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT .TAGTTGT CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC CTCCGGCC	350 GAACAAGGTG GAACAAGGTG TTCCGAGGTG TTCCGAGGTG GACCAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CAACAAGGTG CAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG GAACAAGGTG CATGAATGCG CTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG CCTGAATGCG

		401				450
Probe	102	GCTAATCC.A	ACCTCGGGGC	AGGTGG.CAC	AAACCATTGA	TTGGC.TGT.
Probe	38	GCTAATCC.A	ACCTCGGGGC	AGGTGG.CAC	AAACCATTGA	TTGGC.TGT.
Probe	53	ACCACGCAAG	CAGTCTATAC	GACATCACCG	GGGAAACAGA	ATCGCTTGTT
Probe	54	ACCACGCAAG	CAGTCTATAC	AACATCACCG	GGGAAACAGA	AGTGCTTGTT
Probe	56	ACCACGCAAG	CATTCGATAC	AACATCACCG	GGGAAACAGA	AGTGCTTGTT
Probe	81	GCTAATCCTA	ACTGCGGAGC	AGATACCCAC	ATGCCAGTGG	GCAGTCTGT.
Probe	33	GCTAATCCCA	ACCTCGGGGC	AGGTGGTCAC	AAACCAGTGA	TTGGCCTGT.
Probe	37	GCTAATCCCA	ACCTCGGGGC	AGGTGGTCAC	AAACCGATGA	TTGGCCTGT.
Probe	51	GCTAATCCCA	ACCTCGGGGC	AGGTGGTCAC	AAACCAGTGA	TTGGCCTGT.
Probe	63	GCTAATCCCA	ACCTCGGGGC	AGGTGTTCAC	AAACCAGTGA	TTGGCCTGT.
Probe	65					
Probe	72					
Probe	108	GCTAATCCCA	ACCTCGGGGC	AGGTGGTCAC	AAACCAGTGA	TTGGCCTGT.
		451				500
Probe	102	CGTAACGC.C	AATCCGTG	GCGGAA.CCG	AC.TACTTGG	TGTCCTGTTT
Probe	38	CGTAACGC.C	AATCCGTG	GCGGAA.CCG	AC.TACTTGG	TGTCCTGTTT
Probe	53	CGTGGTGGTA	CTGGTTTGTA	CCCCCTTCTA	TTGAACTTGG	TTTGTGTGCG
Probe	54	CGTGGTGGTA	CTGGTTTGTA	CCCCCTTCTA	TTGAACTTGG	TTT.TGTGCG
Probe	56	CGTGGTGGTA	CTGGTTTGTA	CCCCCTTCTA	TTGAACTTGG	TTT.TGTGCG
Probe	81	CGTAACGGGC	AA.CTCTGCA	GCGGAA.CCG	AC.TACTTTG	GG
Probe	33	CGTAACGCGC	AA.GTCCGTG	GCGGAA.CCG	AC.TACTTTG	GGTGTCCGTG
Probe	37	CGTAACGCGC	AA.GTCCGTG	GCGGAA.CCG	AC.TACTTTG	GGTGTCCGTG
Probe	51	CGTAACGCGC	AA.GTCCGTG	GCGGAA.CCG		
Probe	63	CGTAAGGCGC	AAAGCCCGTG	GCGGATTCCG	ACATACTTTG	GGT
Probe	65					
Probe	72					
Probe	108	CGTAACGCGC	AA.GTCCGTG	GCGGAA.CCG	AC.TACTTTG	GGTGTCCGTG
		501				550
Probe	102	CTTTTATTTA	TGTGGTGCTA	TGG	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •
Probe	38	CTTTTATTTA	TGTGGTGCTA	TGG		
Probe	53	TCTAAGTTAC	GGG.AAGGAG	GTATAAAACA	.GGCGCACAA	TTGGTATNGT
Probe	54	TCTAAGTTAC	GGGGAAGGGA	GTATAAAACA	AGGCGCACAA	• • • • • • • • • • •
Probe	56	TCTAAGTTAC	GGG.AAGGGA	GTATAAAACA	NGGC	
Probe	81	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	
Probe	33	TTTCCTTTAT	ΤΤ			
Probe	37	TTTCCTTT				
Probe	51					
Probe	63					
Probe	65			• • • • • • • • • • •		
Probe	72	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
Probe	108	ΤΤ				

5 Diskussion

Im April 1999 trat die Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordung-BioStoffV) in Kraft. Ein wesentlicher Punkt der BioStoffV ist die Gefährdungsbeurteilung der Tätigkeiten und die daraus resultierenden Anforderungen an die Schutzmaßnahmen. Dabei wird zwischen "gezielten" und "nicht gezielten" Tätigkeiten unterschieden. Gezielte Tätigkeiten liegen dann vor, wenn der biologische Arbeitsstoff (Mikroorganismen, Zellkulturen und Endoparasiten, die beim Menschen Infektionen, sensibilisierende oder toxische Wirkung hervorrufen können) zumindest der Spezies, also der Art nach bekannt ist, die Tätigkeit auf diesen biologischen Arbeitsstoff ausgerichtet ist und die Exposition der Beschäftigten im Normalbetrieb abgeschätzt werden kann. Diese Tätigkeiten sind in der Regel Arbeiten im Bereich der Biotechnologie oder im Labor. Alle anderen Tätigkeiten zählen zu den nicht gezielten Tätigkeiten (z.B. Arbeiten im Bereich der Abfallbeseitigung), deren Gefährdungsbeurteilung sich teilweise als schwierig erweist, da nicht genügend Informationen über Erregervorkommen und Häufigkeit zur Verfügung stehen. So ist beispielsweise derzeit wenig über das Vorkommen von humanpathogenen Viren im luftgetragenen Zustand an Standorten von Kläranlagen, der Kanalisation und auf Mülldeponien bekannt. Weiterhin stehen keine Standardmethoden zur Sammlung, Aufarbeitung und zum Nachweis von Viren aus der Luft zur Verfügung.

Das Ziel der durchgeführten Untersuchung bestand demnach darin, zu überprüfen, ob es mit Hilfe verschiedener Luftkeimsammler möglich ist, luftgetragene humanpathogene Viren an solchen Standorten der Abfall- und Abwasserentsorgung nachzuweisen und wenn möglich diese zu quantifizieren. Hierzu wurden alle Proben auf dasselbe Endvolumen aufkonzentriert. Die im Anschluss daran durchgeführte Virusdetektion und -quantifizierung erfolgte sowohl in verschiedenen Zellkultursystemen als auch mit molekularbiologischen Methoden.

5.1 Methodik der Versuchsdurchführungen

5.1.1 Probenahme

Zur Isolierung luftgetragener Viren wurden mehrere Luftkeimsammler eingesetzt, die nach unterschiedlichen physikalischen Prinzipien Partikel abscheiden. Im Einzelnen waren dies die beiden Spezial-Impinger (Loch- und Sieb-Impinger), der MD 8-Sammler, das PGP-GSP-System, der XM-2 und der HZ. Mit Ausnahme der beiden Filtrationssammler, die mit Einwegmaterialien (Filtern) bestückt wurden, stellte die Zwischendesinfektion der restlichen Sammelgeräte nach jedem einzelnen Messdurchgang bei Außenmessungen ein Problem dar. Für die beiden "high-volume"-Sammler (XM-2, HZ) und den Sieb-Impinger war eine Desinfektion nicht nur unter Feldbedingungen, sondern auch im Labor erschwert. Aufgrund der Bauweise und der verwendeten Materialien der Einlasssysteme hätten sie nur durch Begasung desinfiziert werden können. FANNIN et al. (1985) berichten vom Autoklavieren und BRENNER et al. (1988) vom Einsatz von Chemikalien und der Begasung ihrer Sammler nach jeder Luftkeimmessung im Labor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wäre ein solches Vorgehen nicht möglich gewesen, da die Standorte der Luftkeimmessungen zum Teil weit vom Labor entfernt lagen und somit an jedem Probenahmetermin nur ein Messdurchgang hätte durchgeführt werden können. Um jedoch eine Kontamination möglichst gering zu halten, wurde im Fall der "high-volume"-Sammler für jede Messung ein steriles Sammelgefäß verwendet. Der Zylinder für die Sammelflüssigkeit, das Einlassrohr und die Siebplatte des Sieb-Impingers wurden nach jedem Messtermin chemisch desinfiziert. Anders verhielt es sich beim Loch-Impingern. Dieses Gerät konnte problemlos autoklaviert werden.

Die Handhabung aller eingesetzten Geräte sowie der Sammelproben ist prinzipiell einfach, wobei für den Transport des XM-2 zwei Personen notwendig sind, wodurch die Beweglichkeit im Gelände eingeschränkt ist. Ein Vorteil dieses Gerätes ist jedoch, dass die Proben während der Sammlung automatisch auf 5 °C gekühlt werden. Im Gegensatz zu allen anderen Geräten kann der Luftdurchsatz des HZ und XM-2 während der Messung nicht kontrolliert werden. Dies erwies sich beim parallelen Einsatz aller Sammelgeräte unter Praxisbedingungen als problematisch. Aufgrund mangelnder Stromversorgung z.B. an Standorten auf Mülldeponien ließ die Leistungen der Unterdruckpumpen nach, was eine Reduktion der Luftdurchsätze zur Folge hatte. Anhand der zwischengeschalteten Rotameter konnten diese Abweichungen erfasst, zum Teil reguliert und für die Auswertung entsprechend berücksichtigt werden.

Um die Effektivität der verschiedenen Geräte zur Abscheidung luftgetragener Viren unter Praxisbedingungen miteinander vergleichen zu können, wurden möglichst alle Sammler parallel betrieben. Dieser Ansatz ist in der Literatur bei der Sammlung von Virusaerosolen bisher nicht beschrieben. Es werden viel mehr mehrere Sammler am selben Standort betrieben, wobei sich die Sammelzeiten und Messzeitpunkte unterscheiden (MACK et al., 1986; PFIRR-MANN, 1994; BOURGUEIL et al., 1992a). In einer Untersuchung von BOURGUEIL et al. (1992a) zur aerogenen Übertragung von Coronaviren innerhalb von Tierstallungen wurde ein Zyklon-Sammler und die Sedimentation verwendet. Mit der Sedimentation konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Ein direkter Vergleich der beiden Sammelprinzipien ist aber eigentlich nicht zulässig, da in dieser Studie die Sammlung mit dem Zyklon 15 min. und mittels der Sedimentation 60 min. betrug. Des Weiteren wurden die Viren im Falle des Zyklon-Sammlers in 30 ml abgeschieden, wohingegen die Abscheidung bei der Sedimentation in 10 ml erfolgte, wobei eine Zuordnung zu einem definierten Luftvolumen nicht möglich war.

Um die Effektivität der verschiedenen Sammelgeräte unter Praxisbedingungen vergleichen zu können, wurde für alle Geräte der standortbezogenen Luftkeimmessung nicht nur der selbe Standort, sondern auch die selbe Messdauer von 30 min. gewählt. Auf diese Weise waren alle Luftkeimsammler möglichst weitgehend demselben Virusaerosol ausgesetzt. Unter Praxisbedingungen sind Mikroorganismen in der Luft nicht gleichmäßig verteilt, sondern unterliegen starken zeitlichen und räumlichen Schwankungen in der Konzentration. Diese sind unter anderem von den Windverhältnissen und den durchgeführten Tätigkeiten abhängig. z.B. Radladerarbeiten am Standort. Weiterhin repräsentieren die Ergebnisse bei einer Messdauer von 30 min. die Aerosolzusammensetzung an einen Standort besser als dies bei sehr kurzen Messungen der Fall ist. Zu lange Messzeiten haben jedoch zur Folge, dass pro Arbeitstag nur wenige Wiederholungen durchgeführt werden können. Die Auswertung der Literatur zeigte, dass die gewählten Sammelzeiten in den Untersuchungen sehr unterschiedlich ausfielen. SETTNISCH et al. (1982) setzten ihre Messungen über einen Zeitraum von 3 h an, wohingegen WALLIS et al. (1985) nur 2 min. lang sammelten. Im Allgemeinen werden jedoch Sammelzeiten zwischen 15 und 60 min. gewählt (TELTSCH und KATZENELSON, 1978; PFIRRMANN, 1994; MACK et al., 1986; SELLERS und HERNIMAN, 1972 und 1974).

Der Erhalt der Infektiosität der Viren kann durch Sammelstress gefährdet werden, der sowohl vom Luftdurchsatz und der Sammelzeit als auch vom Abscheideprinzip abhängt. In einer umfassenden Studie zur virusabscheidenden Wirkung des Spezial-Impingers stellte RIEF-BRENNER (1986) fest, dass bei einem Luftdurchsatz von 45 bzw. 180 l/min und einer Sammelzeit von 1 h keine Inaktivierung der eingesetzten Referenzviren auftrat. Ähnliche Untersuchungen führte HÄNEL (1987) zu Virusisolierung mit dem KSF 70 durch. Ein 30-

minütiger Betrieb des Sammlers bei 15 l/min führte bei keinem der verwendeten Testviren zu einem Titerabfall im Sammelmedium. Aufgrund dieser früheren am eigenen Institut durchgeführten Untersuchungen war mit einer Schädigung von Viren während der Sammlung mit den Spezial-Impingern nicht zu rechnen. Anders verhielt es sich bei der Sammlung nach dem Prinzip der Filtration. Hohe Luftdurchsätze und lange Sammelzeiten führen zu einer Dehydration und damit zu einer irreversiblen Schädigung von Mikroorganismen. Da unter Verwendung des MD 8-Sammlers in der vorliegenden Arbeit weder mit der Zellkultur noch mit der PCR Virus nachgewiesen werden konnte, lag der Verdacht einer solchen Schädigung nahe. JASCHHOF et al. (1991) hingegen gelang die Isolierung von luftgetragenem Influenzavirus A. Die Sammelzeit betrug dabei 15 min. bei einer Durchflußrate von 120 l/min, die demnach 6mal höher gewählt war als in der vorliegenden Untersuchung. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass es sich bei der durchgeführten Untersuchung um "indoor"-Messungen handelte, wodurch eine höhere Viruskonzentration in der Luft zu vermuten ist, als es bei Freilandmessung der Fall ist. Weiterhin war die Virusisolierung nach der 3. Bruteipassage aus nur einer Probe möglich. Neben dem MD 8-Sammler wurde ein weiterer Filtrationssammler, das PGP-GSP-System, eingesetzt. Vergleichsstudien stehen nicht zur Verfügung, da das System bisher noch nicht zur Sammlung von Viren eingesetzt wurde. Aufgrund des sehr geringen Volumenstroms von 3,5 l/min, wurden ausschließlich Langzeitmessungen von 1 h durchgeführt.

Die Sammelmedien wurden so gewählt, dass die Viruspartikel während bzw. nach dem Sammelvorgang stabilisiert wurden, so dass sie über längere Zeit (gekühlt) in diesem Medium ihre Infektiosität behalten konnten. Weiterhin sollten diese Medien weder die Zellkulturen bei der späteren Inokulation der Probe schädigen noch die RT-PCR Reaktion inhibieren können. Für die beiden Spezial-Impinger wurde phosphat-gepufferte Salzlösung entsprechend zahlreichen Studien (STOLZE und KAADEN, 1989; DONALDSON et al., 1970; RIEF-BRENNER, 1986; BOURGUEIL et al., 1992a; HÜBSCHLE, 1980) als Grundmedium gewählt. Die Sammelflüssigkeiten der "high-volume"- und des MD 8-Sammlers waren zu gleichen Anteilen aus Zellkulturmedium (DMEM) und PBS zusammengesetzt, um den Verhältnissen der Virusnachweissysteme (Zellkulturen) gerecht zu werden. Im Gegensatz zu den Impinger-Proben fand bei der im Anschluss durchgeführten Probenaufarbeitung kein vollständiger Mediumwechsel statt, bedingt durch die Dichtegradientenultrazentrifugation. Es wurde viel mehr ein Großteil des ursprünglichen Mediums während der Zentrifugationsschritte beibehalten. Da die Filter des PGP-GSP-Systems nur molekularbiologisch untersucht wurden, war die Zugabe von DMEM nicht notwendig. PFIRRMANN (1994) verwendete in ihrer Untersuchung für die Sammlung von Virusaerosolen DMEM als Basismedium. RIEF-BRENNER (1986) empfiehlt ebenfalls den Einsatz von DMEM, wobei ein Anteil von 50 % als ausreichend angesehen wird.

Proteinzusätze haben auf Viren eine stabilisierende Wirkung, indem sie Proteasen, Hydrolasen und Lipasen neutralisieren (HÜBSCHLE, 1980; HORZINEK, 1972) und besonders behülte Viren schützen, indem sie die luftgetragenen Partikel daran hindern, die Oberfläche des Aerosoltröpfchens zu erreichen, wo sie inaktiviert werden (STOLZE und KAADEN, 1989). Aus diesem Grund wurde den Sammelmedien im Falle der Spezial-Impinger vor der Sammlung, bei den "*high-volume*"-Sammlern hingegen direkt nach der Sammlung BSA hinzugesetzt. Die Zugabe von Protein vor der Sammlung hatte zur Folge, dass dem Medium Schaumhemmer zugesetzt werden musste. Die Wahl fiel dabei auf Olivenöl (PFIRRMANN, 1994; SCHMIDT, 1994), das im Gegensatz zu anderen Substanzen (HÄNEL, 1987) nicht toxisch auf die Zellkultur wirkt. Der Zusatz von BSA zum Sammelmedium der beiden "*highvolume*"-Sammler war aufgrund der hohen Luftdurchsätze mit 905 bzw. 690 l/min. und damit verbundener Schaumbildung nicht möglich. Hierzu müsste ein wirksamerer Entschäumer eingesetzt werden, dessen Effektivität, Virus inaktivierende Wirkung und mögliche Zelltoxizität vorab zu testen wäre. Alle beaufschlagten Filter wurden nach den Probenahmen in Lösung gebracht, da eine Studie von JASCHHOF (1993) gezeigt hatte, dass eine Lagerung der Filter in gequollenem Zustand die Stabilität der gesammelten Viruspartikel erhöht.

Da die Stabilität luftgetragener Viren hauptsächlich durch die beiden Umweltparameter Temperatur und relative Luftfeuchte (RH) beeinflusst wird (BOURGUEIL, 1992a; ARUN-DEL et al., 1986), wurden sie während jeder Probenahme ermittelt und dokumentiert. Es ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen den Parametern und dem Vorkommen von Virus in den Luftproben herstellen. TELTSCH und KATZENELSON (1978) dokumentierten ebenfalls diese Daten, setzten sie aber nur in Zusammenhang mit ihren Bakterienbefunden während der Verregnung von Abwasser. Die Isolierung von MKS-Virus innerhalb eines Tierstalls gelang SELLERS und PARKER (1969). Dabei zeigte sich, dass mit niedrigen Temperaturen von 8,5 bis 18,5 °C und hoher RH mit 72 bis 100 % äußerst günstige Bedingungen zur Stabilisierung der Viren im Tierstall herrschten. CARDUCCI et al. (1999) zeichneten alle Umweltparameter auf, wobei sie in ihrer Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen den einzelnen Werten und den Befunden herstellten. Neben der Temperatur und der RH ist der Erfolg, luftgetragene Viren nachzuweisen, auch von der Entfernung des Messpunktes von der Emissionsquelle entscheidend (SETTNISCH et al., 1982). Aus diesem Grund wurden die Sammler in unmittelbarer Nähe positioniert und die Ausbreitung der Aerosole bzw. die Windrichtung während der Messung überprüft (s. 3.6).

Neben den Luftproben wurden an Standorten der Abwasserentsorgung (z.B. Abwasserlauf Kaltental) zum Teil auch **Substratproben** entnommen. Auf diese Weise sollte ein Zusammenhang zwischen Aerosol und möglicher Aerosolquelle hergestellt werden können. Auf die einzelnen Befunde wird unter 5.2.5.2 näher eingegangen. Ein ähnlicher Ansatz wurde von TELTSCH et al. (1980), CARDUCCI et al. (1995 und 2000) und MOORE et al. (1979) gewählt. Der Virusnachweis erfolgte dort sowohl in Luft- als auch in Abwasserproben.

5.1.2 Aufarbeitung der Sammelflüssigkeiten

Die Aufarbeitung der Sammelflüssigkeiten wurde in Anlehnung an die Methoden zum Virusnachweis aus Abwasser durchgeführt. Das Hauptziel der Probenaufarbeitung war es, durch Volumenreduktion eine Aufkonzentrierung der im Probenmaterial enthaltenen Partikel zu erreichen. Da pathogene Virusaerosole in der Umwelt nur in geringen Konzentrationen vorkommen (CARDUCCI et al., 1995), ist eine Konzentrierung der Erreger von besonders großer Bedeutung. In einer Studie von McGARRITY und DION (1978) zur Detektion von luftgetragenem Polyoma-Virus gelang den Autoren nur nach Aufkonzentrierung der Proben die Virusisolierung. Ähnlich verhielt es sich bei Untersuchungen von GANTZER et al. (1998 und 1997) beim Nachweis von humanen Enteroviren aus Abwasser. Der molekularbiologische Virusnachweis war nur in konzentrierten Proben erfolgreich, bzw. es waren mehr Proben nach der Aufarbeitung virus-positiv.

Weitere Ziele der Probenaufarbeitung waren die Abtrennung zelltoxisch und inhibitorisch wirksamer Substanzen und ein einheitliches Endvolumen für die Analyse, um den Vergleich unterschiedlicher Sammelgeräte zu erleichtern. Eine solche Aufarbeitung musste jedoch so gestaltet sein, dass die Viren nicht geschädigt werden (STRAUB et al., 1994a). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Arbeitsschritte unter Verwendung mit Virus versetzten Sammelflüssigkeiten auf Virusschädigung überprüft. Als Repräsentant für unbehüllte Viren wurde Polio Sabin S und stellvertretend für behüllte Viren wurde Felines-Herpesvirus eingesetzt. Polioviren werden in zahlreichen Studien zur Beurteilung des Anreicherungsverhaltens von Viren verwendet (JOTHIKUMAR et al., 1993; ABBASZADE-

GAN et al., 1993; REYNOLDS et al., 1998). Hierbei steht der relativ einfache Nachweis dieser Viren im Vordergrund. Unter dem Gesichtspunkt des begrenzten Nachweises der Erreger in Umweltproben und virus-spezifischer Unterschiede in den Wiederfindungsraten empfehlen DUMKE und FEUERPFEIL (1997) die Einbeziehung weiterer Virusarten.

In einem ersten Schritt wurden, mit Ausnahme der in Lösung befindlichen beaufschlagten Filter, alle Luftkeim- und Substratproben zur Abtrennung von groben Schmutzpartikeln durch ein 12 µm Membranfilter **vorfiltriert**. Die hierzu durchgeführten Vorversuche unter Verwendung mit Virus versetzten Impinger-Sammelflüssigkeiten und Abwasser hatten gezeigt (s. Tab. 43), dass mit keinem Virusverlust durch Adsorption an das Filtermaterial zu rechnen war. GILGEN et al. (1997) beschreiben ebenfalls eine Vorfiltration ihrer Wasserproben, um das Zusetzen der im Anschluss verwendeten Nylonmembran (Adsorptionstechnik) mit Feststoffen zu vermeiden. Bei nativen Proben kann jedoch ein Verlust nicht vollständig ausgeschlossen werden, da möglicherweise an Schmutzpartikel adsorbierte Viruspartikel vom Filtermaterial zurückgehalten werden. PFIRRMANN (1994) stellte fest, dass das Vorkommen luftgetragener Viren stark mit dem Staubgehalt der Luft korreliert ist.

Nach der Vorfiltration wurden die Proben in einem ersten Konzentrationsschritt einer Ultrafiltration unterzogen, die häufig zur Partikelkonzentrierung aus Wasser eingesetzt wird (GENTHE et al., 1991; DIVIZIA et al., 1998; GILGEN et al., 1997; VAN OLPHEN et al., 1991). Die Vorversuche zum Einsatz des Ultrafiltrationsmoduls mit einer 100 kD Membran ergaben, dass die eingesetzten Referenzviren die Membran nicht durchdringen konnten. In keinem der Ansätze wurde Virus im Filtrat detektiert. Da es sich bei den verwendeten Viren um sehr kleine Partikel handelt, konnte ein Virusverlust aller anderen in dieser Arbeit nachzuweisenden Viren ebenfalls ausgeschlossen werden. Obwohl das Probenvolumen um den Faktor 60 reduziert wurde, zeigte sich nicht in allen untersuchten Retentaten eine Titererhöhung um mindestens eine Zehnerpotenz (s. Tab. 44 Ansatz 1, 3 und 5). Die unter-schiedlich ausfallenden Ergebnisse sind möglicherweise auf die Bildung von Virusaggregaten oder durch den Einschluss von Viren in Mizellen (Olivenöl kann eine Membran mit 100 kD nicht passieren und wird demnach mit aufkonzentriert) oder durch Virusverluste im Filtrationssystem (Restflüssigkeiten) bedingt. In Anlehnung an die Studien von PFIRRMANN (1994), FANNIN et al. (1985) und MACK et al. (1986) wurden die Retentate in einem weiteren Vorversuch ultrabeschallt. Die Ergebnisse (Tab. 45) zeigten, dass mit dieser Behandlung keine Titererhöhung erzielt werden konnte. Die Vorversuche ergaben, dass mit der Ultrafiltration große Probenmengen ohne nennenswerte Virusverluste aufgearbeitet werden konnten. STRAPPE (1991) hingegen berichten von geringeren Wiederfindungen. Unter Verwendung einer 50 kD Membran wurden nur 48 % der eingesetzten Viren detektiert, wohingegen mit der Hydroextraktion 60 % wieder gefunden wurden. Die geringe Wiederfindung mit 48 % war vermutlich durch auftretende Scherkräfte während der Ultrafiltration bedingt, die sich negativ auf die Viren auswirkten.

Die Aufarbeitung der Proben der beiden "*high-volume*"-Sammler sollte aufgrund der geringeren Probenmenge mit dem Zentrifugenkonzentrator JumboSep erfolgen. In einem Vorversuch wurden mit Virus versetzte Proben unter Verwendung einer 100 und 300 kD-Membran zentrifugiert. Die Ergebnisse zeigten, dass in beiden Versuchsansätzen der Titer im Retentat stieg und die Filtrate virus-frei waren (s. Tab. 50). Da bei der Aufarbeitung unter Verwendung der 300 kD-Membran das in der Sammelflüssigkeit enthaltene BSA teilweise abgetrennt werden konnte und die Zentrifugationszeiten kürzer als beim Einsatz der 100 kD-Membranscheibe waren, wurden für die Aufarbeitung die 300 kD-Membranen gewählt. Nachdem ein Teil der Proben aufgearbeitet war, wurden die mehrfach verwendeten Membranscheiben anhand kontaminierter Proben auf ihre Tauglichkeit hin überprüft. Da hierbei Testvirus im Filtrat detektiert wurde (s. Tab. 51), musste mit einem Virusverlust während der Aufarbeitung gerechnet werden. Die Verluste waren vermutlich auf Undichtheit der Steckverbindung zwischen Membranscheibe und Zentrifugenbecher zurückzuführen und würden das virus-freie Filtrat beim Einsatz neuer Membranen erklären. Ursprünglich handelt es sich bei diesem System um Einwegeinheiten. Möglicherweise waren die Virusverluste jedoch auch durch die Ausschlussgröße der Membran begründet. In einer Studie von SCHWAB et al. (1991) wurden Zentrifugenkonzentratoren mit 100 und 300 kD eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass bei einer 100 kD-Membran mehr als 99 % Polio- und Hepatitis A-Virus, dagegen bei 300 kD nur 70 % Polio- und 98 % Hepatitis A-Virus wieder gefunden wurden. SHIEH et al. (1997), GILGEN et al. (1997) und TSAI et al. (1994) verwendeten in ihren Studien zur Aufarbeitung von Abwasser ebenfalls Zentrifugenkonzentratoren mit 100 kD-Membranen. Um die Virusverluste möglichst gering zu halten wurden im Rahmen dieses Projektes alle weiteren HZ- und XM-2-Proben unter Verwendung eines kleinen Ultrafiltrationsmoduls mit einer Ausschlussgröße von 100 kD, wie unter 3.5.7.2 beschrieben, konzentriert.

Nachdem die Proben der beiden Spezial-Impinger mittels der Ultrafiltration auf ein Volumen von ca. 15 ml aufkonzentriert waren, wurden die Retentate einer Ultrazentrifugation unterzogen. Ziel dieses Aufarbeitungsschrittes war es, die Ölemulsion zu brechen und unter Verwendung eines Gradienten eine weitere Konzentrierung der Erreger zu erreichen. Da die Ultrazentrifugation mittels Gradienten in der Literatur vor allem zur Reinigung von Viren eingesetzt wird (SHIEH et al., 1991; IJAZ et al., 1994 und 1987; WILDE et al., 1990; DeLEON et al., 1990), konnten vermutlich auch im Probenmaterial enthaltene toxische und inhibitorische Substanzen abgetrennt werden. In den unter 3.5.3 beschriebenen Vorversuchen wurde sowohl Saccharose als auch Percoll als Trennmittel verwendet. In vergleichenden Studien von BUSTOS et al. (1991) und CARRASCOSA et al. (1985) konnten unter Verwendung von Percoll bessere Ergebnisse erzielen. Bei der Reinigung von Rubella-Virus lag die Wiederfindung mit Percoll bei 72 %, wohingegen mit Succrose nur 8,6 % wieder gefunden wurden (BUSTOS et al., 1991). Ähnlich verhielt es sich bei der Reinigung von Afrikanischem-Schweinefieber-Virus. Unter Verwendung von Percoll war die Wiederfindung infektiöser Viruspartikel 20-mal höher als beim Einsatz von Succrose (CARRASCOSA et al., 1985). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der eigenen Untersuchung (Tab. 46), dass die Ultrazentrifugation mit einem Saccharosegradienten sehr gut geeignet war, die beiden eingesetzten Testviren aus der Ölemulsion im Gradienten mit der höchsten Dichte anzureichern. In dieser Phase wurden die höchsten Viruskonzentrationen detektiert, wohingegen sie in den restlichen Schichten relativ gering ausfielen. Um möglichst viele Viren zu gewinnen, wurde neben der gesamten 60 % Saccharose ein ml der darüber liegenden 10 % Saccharose-Lösung mit entnommen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Ölemulsion durch die Ultrazentrifugation gebrochen werden kann. Das Olivenöl lagerte sich hautartig an der Oberfläche ab. Da Percoll gegenüber dem Einsatz von Saccharose keine Vorteile lieferte, wurde Saccharose für die Aufarbeitung aller Umweltproben als Trennmittel eingesetzt. Um den für die Zellkultur toxischen Zucker aus den entnommenen Gradienten abzutrennen, wurden die Lösungen in einen weiteren Zentrifugenkonzentrator (Ultrafree-15) mit einer Ausschlussgröße von 100 kD überführt. Vorversuche hatten gezeigt, dass unter Verwendung des Ultrafree-15 in keinem der untersuchten Filtrate Virus gefunden wurde (s. Tab. 52) und damit bei diesem Schritt nicht mit einem Virusverlust zu rechnen war.

Zur Aufarbeitung der mit dem MD 8-Sammler beaufschlagten Gelatinefilter konnte keine optimale Methode etabliert werden. Aufgrund der Ergebnisse in Abb. 88 wurden alle in Lösung befindlichen Filter mit Versen-Trypsin-Lösung versetzt und für ca. 10 min. bei 37 °C vollständig gelöst. Aus der Grafik geht hervor, dass bei dieser Behandlung mit keiner schädigenden Wirkung zu rechnen war. Ein Titerverlust zeichnete sich für Felines-Herpesvirus erst

nach einer Inkubation von 30 min. ab, wohingegen der Titer des eingesetzten Poliovirus über einen Zeitraum von 1 h konstant blieb. Die Aufarbeitung wurde mit dem Zentrifugenkonzentrator Centriprep-500 durchgeführt, obwohl die Vorversuche in Tab. 48 ergaben, dass mit Virusverlusten im Filtrat zu rechnen war. Der Virustiter im Filtrat war umso höher, je höher die Konzentration in der Ausgangslösung war. Die Virusverluste waren durch die Ausschlussgröße von 500 kD bedingt. Die Verwendung geringerer Porengrößen war jedoch aufgrund der relativ dickflüssigen Probensuspension nicht möglich. Bei der Aufarbeitung der MD 8-Gelatinefilter konnte demnach nicht mit einer Aufkonzentrierung aller im Probenmaterial enthaltenen Viren gerechnet werden. Die Gelatinefilter des PGP-GSP-Systems konnten wegen des geringeren Gelatineanteils hingegen problemlos mit dem Ultrafree-15 (100 kD) aufgearbeitet werden.

5.1.3 Inokulation der Zellkulturen

In zahlreichen Studien wurde zur Isolierung **humaner Enteroviren** aus Umweltmaterialien nur eine einzige Zelllinie eingesetzt (s. Tabelle 5). Dabei wird meist BGM als Standardzelllinie verwendet (PINA et al., 1998; STRAUB et al., 1995). Da sich jedoch nicht alle humanen Enteroviren in BGM vermehren ist der Einsatz mehrerer Zellsysteme sinnvoll (HAMPARIAN et al., 1985; ABBASZADEGAN et al., 1993). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit neben BGM entsprechend den Studien von KOPECKA et al. (1993) bzw. POZO et al. (1998) zusätzlich die beiden Zellsysteme VERO und A549 zur Virusisolierung aus Luft- und Substratproben verwendet. Da der kulturelle Virusnachweis sehr arbeits- und zeitintensiv ist, werden meist nicht mehr als drei Zellkultursysteme eingesetzt. Trotz des Einsatzes verschiedener Zellsysteme kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass allen humanen Enteroviren die Vermehrung ermöglicht ist.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die verschiedenen Zellsysteme nicht nur eingesetzt, um möglichst vielen Viren die Vermehrung zu ermöglichen, sondern auch um die Sensitivitäten des kulturellen und molekularbiologischen Virusnachweises vergleichen zu können. Dies ist nach Aussage von GANTZER et al. (1998) nur dann möglich, wenn für die Virusisolierung mehrere Zellsysteme verwendet werden.

Neben den verwendeten Zellsystemen spielt vor allem der angesetzte Beobachtungszeitraum eine wichtige Rolle für die Effizienz der Virusisolierung. Die Virusausbeute wird durch jede weitere Passage erhöht. In dieser Untersuchung wurde aufgrund der zahlreichen Proben der von WALTER (2000) empfohlenen Kompromiss von zwei Kulturpassagen gewählt. Die Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung aus den Proben der Außenmessungen ergaben, dass in sieben Substratproben (98, 104, 105 und 108 bis 111) und zehn Luftkeimproben (47, 59, 66, 68, 75, 83, 96, 98 und 100) der cpe erst nach der zweiten Zellpassage sichtbar wurde. In den Studien von ROSE et al. (1986), GANTZER et al. (1998), ABBASZADEGAN et al. (1999) und GRABOW et al. (2000) zur erfolgreichen Isolierung von Viren aus Abwasser und Grundwasser wird ebenfalls von zwei weiteren Zellpassagen berichtet. BRENNER et al. (1988) konnten hingegen weder aus Luft- noch aus Abwasserproben Virus in BGM isolieren. Da die Autoren nur ein Zellsystem mit den Umweltproben inokulierten und außerdem keine Zellpassage durchführten, bleibt es fraglich, ob das Probenmaterial tatsächlich frei von cytopathogenen Viren war.

Viren lassen sich anhand der Morphologie des cpe unterschiedlichen Virusarten zuordnen, wobei dies nur aus gereinigten Isolaten möglich ist, da der cpe bei ungereinigten Wildstämmen nicht in gleichmäßiger, vergleichbarer Form auftritt. Eine Zuordnung der Isolate nach der unter 3.7.3 beschriebenen Plaquereinigung wurde in dieser Untersuchung nicht durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass Unterschiede in der Morphologie des cpe erkennbar waren. Dabei fielen z.B. die Abwasserproben 106 und 109 in der Linie A549 besonders auf. Die Probe 106 bewirkte nach acht Tagen die ersten Veränderungen. Die Infektionsherde waren in kleinen Gruppen abgekugelter Zellen über dem gesamten Zellrasen verteilt und breiteten sich nur langsam aus. Der erste cpe der Probe 109 zeigte sich nach 3-tägiger Inkubation, wobei er sich langsam netzartig über den Rasen ausbreitete. Es war daher zu vermuten, dass es sich um zwei unterschiedliche Virusisolate handelte. PFIRRMANN (1994) gelang in ihrer Studie die eindeutige Zuordnung der gereinigten Isolate zur Gruppe der *Picornaviridae* anhand der Morphologie des cpe.

Da sich in den zur Virusisolierung eingesetzten Zellkulturen nicht nur humane Enteroviren vermehren können, ist eine Identifizierung der Isolate notwendig. Eine Studie von CARDUCCI et al. (2000) zeigte beispielsweise, dass sich auch Reoviren in BGM vermehren. Von allen untersuchten Luftproben erwiesen sich 46 % als Reovirus-Isolate. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Teil der plaquegereinigten Isolate am Institut für Virologie der medizinischen Hochschule Hannover sequenziert. Die Resultate (s. 4.7) werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Außenversuche diskutiert.

Insgesamt muss bei der Bewertung der Ergebnisse, die mit der Inokulation von Probenmaterialien in Zellsystemen gewonnen wurden, darauf hingewiesen werden, dass sich mit dieser Methode nur Viren nachweisen lassen, die zum einen infektiös und zum anderen durch Ausbildung eines cpe sichtbar sind. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Viruspartikel während des Sammelprozesses und der Probenaufarbeitung geschädigt wurden und somit nicht erfasst werden konnten. Dies hat zur Folge, dass bei kulturell ermittelten Resultaten mit einer Unterschätzung der tatsächlichen Virusbelastung im Probenmaterial zu rechnen ist.

Die kulturelle Isolierung von **Rotaviren** bringt einige Probleme mit sich. Zum einen sind, bedingt durch eine langsame Replikationsrate (BARARDI et al., 1999), lange Beobachtungszeiträume notwendig. Dies führt dazu, dass mehrere Zellpassagen durchgeführt werden müssen. WYATT et al. (1983) berichten beispielsweise von drei bis 14 Passagen zum Virusnachweis aus Stuhlproben. Des Weiteren zeigte die Studie, dass sich viele Rotaviren nicht in der Zellkultur bzw. ohne sichtbaren cpe vermehren.

Entsprechend den Angaben in der Literatur wurden zum kulturellen Nachweis von Rotaviren alle Proben mit der Zelllinie MA104 inokuliert. Um die möglicherweise im Probenmaterial enthaltenen Rotaviren zu aktivieren, wurde jede Probe, wie auch von STRAPPE (1991) und WYATT et al. (1983) beschrieben, vor der Inokulation in der Zellkultur mit Trypsin versetzt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen riefen 26 aller untersuchten Substrat- und Luftproben in der Zellkultur einen cpe hervor. Um jedoch auch die Rotaviren zu detektieren, die sich möglicherweise ohne sichtbaren cpe in der Zellkultur vermehrten, wurde zusätzlich ein immunologischer Erregernachweis durchgeführt. Beim unter 3.2.3 beschriebenen EIA handelte es sich um ein sehr sensitives und hochspezifisches Nachweissystem, das jedoch aufgrund der Inokulation der Probe in der Zellkultur sehr zeitintensiv war. Als Alternative sollte ein kommerziell erhältliches Testkit verwendet werden. Eine Studie von CUBITT (1991) hatte gezeigt, dass Kits empfindlich und spezifisch genug sind, um Rotaviren aus Wasser zu detektieren. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Sensitivitäten des EIA (s. 3.2.3) und des kommerziellen Kits Ridascreen (ELISA) miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass der EIA fünf Zehnerpotenzen sensitiver war als der Ridascreen (s. 4.1). Eine ähnliche Untersuchung führten GENTHE et al. (1991) durch. Auch hier war der EIA um denselben Faktor empfindlicher als zwei parallel getestete Testkits, die nach dem Prinzip der Latex-Agglutination und dem ELISA arbeiteten. Die Autoren führten dies auf die Virusvermehrung während der Inkubation der Probe in der Zellkultur zurück, wodurch die Menge des Antigens ansteigt. Dieser Sachverhalt konnte in der eigenen Untersuchung bestätigt werden, da eine Überprüfung aller Zellkulturüberstände im Ridascreen nach der Inokulation in der Zellkultur zeigte, dass die Ergebnisse im Photometer denen des EIA entsprachen (s. 4.1). Der Ridascreen war demnach zum Virusnachweis aus Umweltproben, deren Viruskonzentrationen meist sehr gering sind (GERBA und ROSE, 1990) nicht geeignet, wohingegen er zur Detektion von Rotaviren in Kulturüberständen eingesetzt werden konnte.

Entsprechend dem kulturellen Nachweis von humanen Enteroviren vermehren sich in der Zelllinie MA104 nicht nur Rotaviren. PFIRRMANN (1994) stellte beispielsweise in ihrer Studie zum Virusnachweis aus der Luft an Standorten der Müllentsorgung fest, dass es sich bei allen Isolaten, die in MA104 detektiert werden konnten, um Coxsackieviren vom Typ B handelte. Um möglichst alle Rotavirus-positiven Zellkulturen (mit oder ohne cpe) eindeutig identifizieren zu können, wurden in der eigenen Untersuchung alle Kulturüberstände sowohl vor der Zellpassage als auch nach der Passage im Ridascreen getestet. Dabei zeigten die Abwasserproben 109, 112 und 113 einen leichten und die Luftproben 91 und 92 einen eindeutig positiven Farbumschlag. Zur Sicherheit wurden diese Proben im EIA überprüft, wobei das Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise waren die Resultate im Ridascreen als falsch positiv zu bewerten oder es wurde ein Rotavirus im Probenmaterial detektiert, das sich nicht oder nur sehr schlecht in Kultur vermehren ließ.

Die kulturelle Isolierung von **Hepatitis A-Virus** und **Hantaviren** erweist sich ebenfalls als relativ schwierig. Die meisten Hepatitis A-Viren vom Wildtyp vermehren sich, wenn überhaupt, dann nur sehr langsam und ohne sichtbaren cpe in der Zellkultur und werden daher meist immunologisch nachgewiesen (TICEHURST et al., 1987). Für die Isolierung wird von sehr langen Inkubationszeiten von bis zu zwei Monaten mit entsprechend vielen Passagen berichtet (GRAFF et al., 1993). Ähnlich verhält es sich beim kulturellen Nachweis von Hantaviren. Auch hier ist eine monatelange Adaptation des Virus an die Zellkultur nötig (SCHMITZ, 1996).

Aus diesen Gründen sollte für die eigene Untersuchung ein immunologischer Erregernachweis (EIA) entwickelt werden. Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Versuche zeigten, dass die Bestimmung der Virustiter (Hantavirus und Hepatitis A-Virus) nach den durchgeführten Protokollen (EIA) nicht möglich war (4.1). Dies war wahrscheinlich durch die relativ kurzen Inkubationszeiten von acht bzw. neun Tagen bedingt. Des Weiteren bestand die Möglichkeit, dass das zum Hantavirus Nachweis verwendete polyklonale Serum eine zu geringe Affinität besaß, wodurch die Antikörper durch die zahlreichen Waschschritte entfernt wurden. Dass eine Virusvermehrung stattgefunden hatte, konnte in beiden Fällen bestätigt werden, da die PCR positive Ergebnisse lieferte. Aufgrund der langen Beobachtungszeiträume und der Tatsache, dass sich langsam vermehrende Viren bei der Isolierung unterdrückt werden (PINA et al., 1998), und den zu erwartenden geringen Viruskonzentrationen in Luftproben wurde der Erregernachweis mit molekularbiologischen Methoden durchgeführt.

Der Nachweis von **Hepatitis B-Virus** erfolgte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls nur in der nested-PCR, da eine Virusisolierung nur im Tierversuch möglich ist (KNUTSSON und KIDD-LJUNGGREN, 2000).

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Erfolg der kulturellen Virusisolierung aus Probenmaterialien ist die inokulierte Probenmenge (HAMPARIAN et al., 1985). Sie unterscheidet sich in den verschiedenen Veröffentlichungen erheblich. TELTSCH und KATZENELSON (1978) inokulierten beispielsweise 20 ml zum Nachweis luftgetragener humaner Enteroviren, PUIG et al. (1994) hingegen nur 250 μ l aufkonzentrierter Abwasserproben zur Isolierung von Adenoviren. Um die Sensitivität des kulturellen und molekularbiologischen Erregernachweises vergleichen zu können, wurde für die eigene Untersuchung in beide Nachweissysteme dieselbe Probenmenge von 200 μ l eingesetzt. Eine größere Menge wäre nicht sinnvoll gewesen, da dies eine Verdünnung der bereits aufkonzentrierten Probe vorausgesetzt hätte. Die Inokulation von großen Probenmengen führt nur dann zu einer Steigerung der Sensitivität, wenn die im Probenmaterial enthaltenen Erreger nicht stark genug konzentriert werden können.

Bei der Inokulation der Proben wurden in keinem Ansatz zytotoxische Erscheinungen beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass im Probenmaterial enthaltene zelltoxische Substanzen während der Probenaufarbeitung erfolgreich entfernt werden konnten, oder das untersuchte Probenmaterial war schon zu Beginn nicht stark mit solchen Substanzen belastet. In Bezug auf die Abwasserproben war erst genanntes zu vermuten, da PINA et al. (1998) und SHIEH et al. (1997) von Problemen beim kulturellen Nachweis von humanen Enteroviren bzw. Rotaviren aus Abwasser berichten. Die Proben mussten nach der Inokulation von ca. einer Stunde wieder entfernt werden. In der Studie von PFIRRMANN (1994) bereiteten die aufgearbeiteten Luftproben zytotoxische Probleme. Die Luftproben wurden deshalb in das Zellkulturmedium gegeben, damit 1:10 verdünnt, und nach zwei Stunden wieder entfernt. Die zelltoxischen Erscheinungen wurden dabei durch Substanzen hervorgerufen, die zur Aufarbeitung der Proben verwendet wurden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung bewusst auf den Einsatz solcher Zusätze verzichtet.

Bei der Inokulation der Umweltproben in der Zellkultur zeigte sich weiter, dass in manchen Proben Probleme durch Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien auftraten. Auffallend war, dass es sich ausschließlich um Proben handelte, die nicht mittels der Ultrazentrifugation aufgearbeitet wurden. Die mit Bakterien verunreinigten Proben (81, 102, 108, 109 und 111 bis 113) waren Sicker- und Abwasserproben, wohingegen die Kontamination mit Pilzen in Luftproben, die mit dem MD 8-Sammler (1 bis 4, 27 und 28) und dem XM-2 (29 bis 32 und 43) gezogen worden waren, in Erscheinung traten. Aus diesem Sachverhalt lassen sich unterschiedliche Schlüsse ziehen. Da bei der Ultrafiltration mittels Gradienten die Viren in eine andere Phase übertreten, war zu vermuten, dass andere Mikroorganismen auf diese Weise abgetrennt wurden. Das würde erklären, warum in Proben der beiden Spezial-Impinger keine Kontaminationen auftraten. Eine weitere Erklärung hätte darin bestanden, dass die Sammler MD 8 und XM-2 Pilze mit einer höheren Effizienz aus Luft abscheiden als die beiden Spezial-Impinger. Daten, die im Rahmen einer anderen Untersuchung am Institut gewonnen wurden bestätigten das allerdings nicht, so dass dies nicht als Grund gesehen werden kann.

5.1.4 Molekularbiologischer Virusnachweis

Vor dem eigentlichen Erregernachweis wird die **Nukleinsäureextraktion** durchgeführt und dient nicht nur zum Aufschluss der Viruspartikel, sondern ist auch maßgebend für die Effizienz der RT-PCR verantwortlich. Dabei gilt es, im Probenmaterial enthaltene Nukleinsäuren zu konzentrieren und Inhibitoren, die die Effektivität der PCR-Reaktion herabsetzen, zu entfernen (s. 2.4.6.2.1 und 2.4.6.2.2). Da in der vorliegenden Arbeit sowohl DNA- als auch RNA-Viren nachzuweisen waren, sollte eine Extraktionsmethode gewählt werden, mit der beide Nukleinsäuretypen in einem Reaktionsschritt isoliert werden können. Daneben sollte die Methode möglichst standardisierbar sein, um die Ergebnisse untereinander und für die Quantifizierung mit dem externen Standard vergleichen zu können. Kommerziell erhältliche Extraktionskits werden immer häufiger zur Isolierung von Viren aus Umwelt- und klinischen Probenmaterialien eingesetzt (SELLWOOD et al., 1998; ARNAL et al., 1998; KRAMVIS et al., 1996; HÄFLINGER et al., 1997; GILGEN et al., 1997) und zeichnen sich besonders durch schnelle Durchführbarkeit und einfache Handhabung aus, wodurch das Risiko einer Kontamination herabgesetzt wird.

Für die Untersuchung wurden vier verschiedene Extraktionskits ausgewählt und im Bezug auf die RNA-Isolierung mit der häufig verwendeten GITC-Phenol-Chloroform-Methode verglichen. Die Effizienz der Methoden wurde anhand einer definierten Virusmenge (10⁴ KID₅₀/ml) untersucht. Dabei wurde eine Virussuspension in DMEM mit den beiden Referenzviren Polio Sabin S (RNA) und Aujeszky-Virus (DNA) verwendet. Die Ergebnisse (Tab. 38 bis 42) zeigten, dass mit allen Kits für die Extraktion von DNA ähnliche Resultate erzielt wurden. Anders verhielt es sich bei der Isolierung von RNA. Hier traten Sensitivitätsunterschiede von mehr als einer Zehnerpotenz auf. Unter Verwendung des High Pure Viral Nucleic Acid Kit lag die rechnerisch ermittelte Empfindlichkeit bei 1,4 Äq. KID₅₀, wohingegen sie mit dem InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Batchverfahren) und der Phenol-Chloroform-Methode nur 35 Äq. KID₅₀ betrug. Bei der praktischen Durchführung der Extraktionen traten folgende Schwierigkeiten auf: Unter Verwendung des InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Protokoll IV) musste der Probenansatz in zwei Arbeitsschritten auf die Säule aufgetragen werden, was zu einer Erhöhung des Kontaminationsrisikos führte. Das Trägermaterial des InViSorb Spin DNA Micro Kit III (Batchverfahren) ließ sich nur schwer und in manchen Ansätzen erst nach minutenlangem Vortexen resuspendieren. Ein Nachteil des QIAamp DNA Mini Kit war, dass sich die Probenmengen vor und nach der Extraktion entsprachen, wodurch es zu keiner Konzentrierung der Nukleinsäuren kam. Die Phenol-Chloroform-Extraktion war sehr zeitaufwendig und schwierig zu standardisieren, da einzelne Phasen entnommen werden mussten. Außerdem mussten die Reaktionsgefäße häufig geöffnet werden, wodurch das Kontaminationsrisiko stieg. Das High Pure Viral Nucleic Acid Kit zeichnete sich durch eine hohe Effizienz zur Isolierung von Nukleinsäuren aus ZKÜ, geringes Risiko einer Kontamination und durch einfache und rasche Handhabung aus und wurde daher zur Extraktion der Nukleinsäuren aus den Proben der Außenmessungen eingesetzt. Der Vorversuch zur Aufarbeitung der PGP-Gelatinefilter hatte außerdem gezeigt, dass sowohl DNA als auch RNA problemlos aus gelatinehaltigen Proben mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit extrahiert werden konnte (s. 4.5.5).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche zur Nukleinsäureextraktion gaben jedoch keine Aussage über die Effektivität der unterschiedlichen Extraktionskits, im Probenmaterial enthaltene Hemmstoffe zu entfernen. Hierzu hätten exemplarisch Luft- und Abwasserproben mit definierten Virusmengen versetzt werden müssen. PUIG et al. (1994) überprüften beispielsweise drei verschiedene Extraktionsmethoden anhand von mit Virus versetzter Abwasserproben. Durch solche Versuche lassen sich jedoch keine allgemein gültigen Aussagen treffen, da sich Umweltmaterialien in ihrer Zusammensetzung erheblich voneinander unterscheiden und wenig über die Beschaffenheit inhibitorisch wirkender Substanzen bekannt ist. Anders verhält es sich bei klinischen Proben und Nahrungsmitteln. So ist die PCR-hemmende Wirkung von Proteinase in Milch (POWELL et al., 1994), Harnstoff in Urin (KHAN et al., 1991) und Hämoglobin im Blut (AKANE et al., 1994) bekannt und kann gezielt unter Verwendung bestimmter Reinigungsschritte entfernt bzw. minimiert werden. Aus diesen Gründen wurde in der eigenen Untersuchung auf wenig aussagekräftige Vorversuche zur Effizienz der Abtrennung von Inhibitoren aus Abwasser- und Luftproben verzichtet. Es wurde vielmehr ein System entwickelt, um die Restinhibition in jeder einzelnen Probe quantifizieren zu können. Dies war deshalb besonders wichtig, da zum einen die Ergebnisse des molekularbiologischen Erregernachweises nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmt werden sollten, und zum anderen sollte die Sensitivität des kulturellen und molekularbiologischen Nachweises aus Umweltproben miteinander verglichen werden.

Hierzu wurden alle Proben mit einer definierten Menge an Equinem-Rhinovirus versetzt, die Nukleinsäuren in einer ersten Versuchsreihe in der RT-nested-PCR amplifiziert und anschließend anhand des mitgeführten externen Standards quantifiziert. Auf diese Weise konnte die Wiederfindung und damit die Effektivität des molekularbiologischen Nachweises (von der Extraktion der Nukleinsäure bis zur Amplifikation in der zweiten PCR) bestimmt werden. In den meisten Veröffentlichungen wird die Inhibition überprüft, indem ein Aliquot der Probe mit einer definierten Menge eines des zu detektierenden Virus versetzt wird. KOPECKA et al. (1993) kontaminierten Klärschlammproben und ABBASZADEGAN et al. (1993) Grundwasserproben mit 10³ KID₅₀ Poliovirus beim Nachweis von humanen Enteroviren. LEISIN-GER und METZLER (1997) überprüften die Inhibition, indem sie ihre Abwasserproben mit jeweils 10³ KID₅₀ der nachzuweisenden Viren versetzten. Im Allgemeinen gilt eine Probe als gehemmt, wenn in der PCR kein Signal erscheint. Auf diese Weise sollen falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keines der nachzuweisenden Viren als Inhibitionskontrolle eingesetzt werden, da sonst die Quantifizierung nicht möglich gewesen wäre. Eine Studie von ABBASZADEGAN et al. (1999) zeigt, dass die Inhibition nicht nur die beiden Enzyme der RT-PCR (Taq-DNA-Polymerase und Transkriptase) betrifft, sondern auch die Anlagerung der Primer beeinträchtigt. Es waren 11,3 % der untersuchten Grundwasserproben beim Nachweis von humanen Enteroviren, 7,3 % bei der Untersuchung auf Hepatitis A-Virus und 13,3 % aller auf Rotavirus getesteten Proben inhibiert. Dieser Sachverhalt und die Tatsache, dass verschiedene PCR-Systeme meist mit unterschiedlicher Effektivität arbeiten, macht deutlich, dass die Bestimmung der Wiederfindung mit dem Equinen-Rhinovirus nur Näherungs- und keine Absolutwerte liefern konnte und insofern relativiert werden musste.

Bei der Bestimmung der Wiederfindung ergaben sich weitere Schwierigkeiten. Für die Ermittlung der Standardkurve (Regression) standen drei Messwerte (Peakflächen) zur Verfügung. Beim Vergleich der erwarteten Viruskonzentrationen und den kalkulierten Virusmengen, die sich aus der Modellgleichung und den im LightCycler ermittelten Peakflächen ergaben, wurden Abweichungen von bis zu ¼ Zehnerpotenz beobachtet (s. Anhang: Ergebnistabellen zur Bestimmung der Inhibition). Diese Abweichungen waren wahrscheinlich durch Pipettierfehler, die sich bei dem geringen zu pipettierenden Volumen von 2 µl leicht ergaben, bei der Durchführung der zweiten PCR bedingt. Bei der Betrachtung der in den einzelnen Proben ermittelten Equinen-Rhinovirus-Konzentrationen wurde deutlich, dass in zahlreiche Proben (z.B. Nr. 5, 38 oder 46) mehr Virus detektiert werden konnte als ursprünglich zugesetzt wurde. Die Ergebnisse lagen zum Teil mehr als eine Zehnerpotenz über dem maximal möglichen Wert von 10⁵ KID₅₀/ml. Diese Schwankungen ergaben sich durch die zahlreichen Arbeitsschritte während der Nukleinsäureextraktion und der RT-nested-PCR. Um die systematisch bedingten Schwankungen von einer Zehnerpotenz und die Abweichungen von ¹/₄ Zehnerpotenz bei der Ermittlung der Standardkurve bei der Beurteilung der Inhibition bzw. Wiederfindung zu berücksichtigen, wurde sie anhand der im LightCycler bestimmten Peakflächen durchgeführt. Eine Probe galt als nicht inhibiert ("-"), wenn die ermittelte Peakfläche der Probe größer bzw. gleich der des Standards 2 war und als inhibiert ("+"), wenn die Peakfläche größer bzw. gleich des Standards 1 war. Lag die Peakfläche der Probe unter dem Wert des Standard 1, so wurde sie als stark inhibiert ("++") betrachtet. Obwohl sich bei der Bestimmung der Wiederfindung gewisse Ungenauigkeiten ergaben, lieferten die Ergebnisse mehr Informationen über den Erfolg des molekularbiologischen Erregernachweises aus Umweltproben als es in den meisten Veröffentlichungen der Fall ist. Dort wird in der Regel lediglich nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip überprüft, ob eine Probe inhibiert ist oder nicht.

Die Resultate zur Wiederfindung des zugesetzten Equinen-Rhinovirus aus den untersuchten Abwasserproben und dem Sickerwasser zeigten, dass keine der Proben vollständig inhibiert war. Der molekularbiologische Nachweis war demnach in allen Proben möglich, wobei die PCR-Reaktion in acht Proben praktisch nicht inhibiert, in sechs Proben inhibiert und nur in drei Proben stark inhibiert war. Die Ergebnisse wiesen auf eine erfolgreiche Abtrennung von Inhibitoren aus Abwasser während der Probenaufarbeitung und Nukleinsäureisolierung hin. LEISINGER und METZLER (1997) konnten mit ihrer Methode ebenfalls in Abwasser enthaltene Hemmstoffe entfernen. Beim Vergleich von Verdünnungsreihen einer definierten Virusmenge in Abwasser und Leitungswasser ergaben sich keine Unterschiede. Die Auswertung erfolgte dabei im Agarosegel. PINA et al. (1998) versetzten alle in der PCR negativen Abwasserproben mit Polio- und Adenovirus (10^4 KID₅₀), um falsch negative Resultate auszuschließen. Es zeigte sich, dass alle kontaminierten Proben das spezifische Signal im Agarosegel lieferten, wobei einige Proben aufgrund von verbleibenden Inhibitoren nur in der Verdünnung (1:10) positiv waren.

Die Bewertung der Aufarbeitung von Luftproben zur Entfernung von Inhibitoren gestaltete sich schwierig, da in der Literatur keine vergleichenden Untersuchungen beschrieben sind. Weiterhin ist nicht bekannt, ob und wie hoch die Luft mit solchen Stoffen kontaminiert ist. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung zeigten, dass die PCR-Reaktion, wie auch schon bei den Abwasserproben, prinzipiell in allen standortbezogenen Luftproben möglich war. Eine Ausnahme stellte die Impinger-Probe 64 dar, die auf der Mülldeponie Gelnhausen-Haller während Radladerarbeiten gezogen wurde. Diese Probe war praktisch vollständig inhibiert. Es konnte nur 1 KID₅₀/ml des zugesetzten Equinen-Rhinovirus detektiert werden. Anfangs wurde vermutet, dass möglicherweise Huminsäuren, deren inhibitorische Wirkung und Vorkommen in Erde hinreichend beschrieben ist (WILSON, 1997) in der Probe enthalten sein könnten. Während der Messung war der Radlader mit Erdarbeiten beschäftigt. Aus der Abb. 95 geht jedoch hervor, dass in Probe 64 der Nachweis von humanen Enteroviren möglich war, wodurch die nahezu vollständige Inhibition der Probe ausgeschlossen werden konnte. Daher lag die Vermutung von Virusverlusten oder Pipettierfehlern während der Nukleinsäureextraktion oder des PCR-Nachweises nahe. Um dies abzuklären hätte der Nachweis der Inhibitionskontrolle wiederholt werden müssen.

Die meisten Proben, die unter Verwendung des HZ, XM-2 und MD 8-Sammlers gezogen worden waren, waren nach der Probenaufarbeitung praktisch frei von PCR-hemmenden Stoffen. Es wurde für nur fünf der 26 MD 8-, neun der 23 XM-2- und für zwei der neun untersuchten HZ-Proben eine inhibitorische bzw. starke inhibitorische Wirkung ermittelt. Anders verhielt es sich bei den Proben der beiden Spezial-Impinger. Von insgesamt 41 untersuchten Proben wirkten 28 hemmend auf die PCR-Reaktion. Alle ermittelten Rhinovirus-Konzentrationen wurden dahingehend analysiert herauszufinden, ob das Ausmaß der Inhibition vom Standort, vom eingesetzten Sammelgerät oder der Probenaufarbeitung abhängig war. Es ließen sich keinerlei Zusammenhänge herausarbeiten, wodurch die Fragen, die den Grund für die Inhibition hätten erklären können, unbeantwortet bleiben mussten.

Die Hälfte aller Proben der personenbezogenen Messungen war praktisch nicht inhibiert. Bei den die PCR-Reaktion hemmenden Proben fielen die Nr. 162, 163, 166, 167 und 168 besonders auf. Es konnten maximal nur 37 $\text{KID}_{50}/\text{ml}$ der zugesetzten 10⁵ $\text{KID}_{50}/\text{ml}$ Equinen-Rhinoviren detektiert werden. Die Proben 163 und 167 wurden im Bereich der Kläranlage Mühlhausen in Stuttgart beprobt und waren in beiden Fällen sehr stark mit Staub bzw. Nikotin verschmutzt. Diese Verschmutzung erklärte höchstwahrscheinlich die geringe Wiederfindung. Für die restlichen Proben konnten keine Besonderheiten während der Sammlung oder Aufarbeitung beobachtet werden.

Die Tatsache, dass in fast allen untersuchten Substrat- und Luftproben der molekularbiologische Erregernachweis möglich war und 50 % der Proben die PCR-Reaktion praktisch nicht inhibierte, zeigte, dass sowohl die etablierten Methoden zur Probenaufarbeitung als auch der High Pure Viral Nucleic Acid Kit zur Extraktion geeignet waren, um Virusnukleinsäuren aus Luft- und Abwasserproben nachzuweisen.

In dem unter 3.3.5 beschriebenen Vorversuch sollte geklärt werden, ob die Sensitivität unter Verwendung von Hybridisierungssonden im LightCycler ausreichend war um diese Methode zum molekularbiologischen Erregernachweis aus Umweltproben einzusetzen. Der Vorteil dieses Formates gegenüber der Verwendung von SYBR Green I bestand darin, dass keine unspezifischen Produkte in das Signal mit einflossen. Dadurch konnte die Quantifizierung direkt mit einem mitgeführten externen Standard erfolgen. Der Nachteil war jedoch die relativ geringe Sensitivität, die besonders für die Umweltanalytik von großer Bedeutung ist.

Exemplarisch wurde in der eigenen Untersuchung die Bestimmung der Nachweisgrenze der Hybridisierungstechnik mit dem Equinen-Rhinovirus durchgeführt. Die Ergebnisse in den Abbildungen 6 und 7 zeigen, dass die Nachweisgrenze mit 7 Äq. KID₅₀ pro PCR-Ansatz im Bereich der Empfindlichkeit der kulturellen Virusisolierung lag. Im Vergleich dazu konnte nach Optimierung der RT-nested-PCR eine Sensitivität von 10⁻³ Äq. KID₅₀ pro PCR-Ansatz ermittelt werden, die damit deutlich unter der des kulturellen Nachweises lag. KOPECKA et al. (1993) und TICEHURST et al. (1987) zeigten in vergleichenden Studien zum Nachweis von humanen Enteroviren bzw. Hepatitis A-Virus ebenfalls, dass die Empfindlichkeit der Hybridisierungstechnik unter der der Zellkultur lag. Beim Vergleich zwischen Hybridisierung und nested-PCR zum Nachweis von Hepatitis B-Virus erwies sich die nested-PCR um vier Zehnerpotenzen sensitiver (LU-COTTE et al., 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse und den in Luftproben zu erwartenden geringen Virusgehalten wurde für diese Arbeit das Prinzip der nested-PCR gewählt und für alle nachzuweisenden Viren etabliert bzw. optimiert. Bei der Beurteilung der Sensitivitäten der einzelnen PCR-Systeme musste folgendes berücksichtigt werden: Um die PCR-Produkte anhand eines externen Standards quantifizieren zu können, musste sowohl die erste als auch die zweite PCR-Reaktion in der logarithmischen Phase beendet werden, denn befand sich die Reaktion bereits in der Sättigungs- bzw. Plateauphase, konnten keine konzentrationsabhängigen Unterschiede mehr erkannt werden. Dies zeigt sich beispielsweise in Abb. 10. Die erste Amplifikation war dort über 30 Zyklen erfolgt, wodurch die Kurven aller Konzentrationen in der zweiten PCR zum selben Zeitpunkt in die Steigungsphase übergingen, d.h. dieselben Ausgangskonzentrationen an PCR-Produkt aufwiesen. Vergleicht man dagegen die Kurvenverläufe in Abbildung 18 und 32, wird dieser Sachverhalt besonders deutlich. Die erste PCR wurde mit Ausnahmen der Hantavirus- und Rotavirus-PCR nach 20 Zyklen beendet.

Ein Vorteil der Amplifikation im LightCycler bestand darin, dass die Bildung der PCR-Produkte auf dem Bildschirm beobachtet werden konnte. Dies bot die Möglichkeit, die Reaktion jedes einzelnen PCR-Laufes anhand der Kurvenverläufe der mitgeführten Standards oder Positivkontrollen individuell zu beenden. Hieraus ergaben sich die im Methodenteil beschriebenen unterschiedlichen Zyklenzahlen zwischen 22 und 30. Da die Sensitivität einer PCR unter anderem von der Anzahl der Zyklen abhängig ist, war eine Senkung der Empfindlichkeit durch den Reaktionsabbruch nach 20 Zyklen möglich. Bei der Quantifizierung mittels externen Standards musste demnach mit einem Verlust der Sensitivität gerechnet werden. Um die maximale Empfindlichkeit der zweiten PCR zu erhalten, wurden zum Nachweis von Hepatitis B- und Rotaviren 30 Zyklen amplifiziert. Die Quantifizierung aller positiven Befunde sollte in einer zweiten Reaktion erfolgen. Zum Nachweis von Hantaviren war eine Quantifizierung nicht vorgesehen. Ein weiterer Aspekt, der bei der Diskussion der Sensitivitäten berücksichtigt werden muss, ist die Tatsache, dass die Bestimmung der Sensitivitäten in dieser Untersuchung aus ZKÜ bzw. DNA-Standard erfolgt war. Die Nachweisgrenzen lieferten also keine Aussage über die Effektivität des Nachweissystems aus Umweltmaterialien. Die Literaturübersicht in Tab. 4 zeigt, dass bei den meisten Studien die Bestimmung der Sensitivität aus Virussuspensionen in relativ "reinem" Zustand, also ohne Inhibitoren erfolgte. Dies ist beispielsweise ZKÜ (BEAULIEUX et al., 1997; PUIG et al., 1994; HÖRLING et al., 1995), Puffer (GANTZER et al., 1997; SCHWAB et al., 1991) oder gereinigte Nukleinsäure (KOPECKA et al., 1993; GOUVEA et al., 1990; DOUGLAS et al., 1993). Des weiteren führt die meist rechnerisch bestimmte Nachweisgrenze zu einer Überschätzung der Methode, da davon ausgegangen wird, dass alle Arbeitsschritte ohne Verluste von Nukleinsäuren durchgeführt werden. Da die Nukleinsäureextraktion, wie bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle beim PCR-Nachweis spielt, wurde in einigen Studien (REYNOLDS et al., 1998; ABBASZADEGAN et al., 1993; WILDE et al., 1990; TICEHURST et al., 1987) die Sensitivität der Nachweise zusätzlich aus Probenmaterial definiert. In den meisten Fällen ist dabei mit einer Reduktion der Empfindlichkeit zu rechnen (SELLWOOD et al., 1998; REYNOLDS et al., 1998; WILDE et al., 1990).

Da im Rahmen dieser Arbeit die Größenordnung der Inhibition in jeder einzelnen Probe bestimmt wurde, wurde die maximale Sensitivität der PCR-Systeme anhand relativ "reiner" Virussuspensionen bestimmt. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt mit den in der Literatur angegebenen Nachweisgrenzen verglichen (vergleiche hierzu Tab. 4). Für den Nachweis von humanen Enteroviren wurde eine rechnerische Sensitivität von 10^{-2} Äg. KID₅₀ (0,0084) pro PCR-Ansatz ermittelt. Setzt man dieses Ergebnis in Zusammenhang mit den in Tab. 3 dargestellten Werten, ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze von ca. einem bis 10 Viruspartikel. REYNOLDS et al. (1998), ABBASZADEGAN et al. (1993), SHIEH et al. (1997) und PUIG et al. (1994) berichten von ähnlichen Sensitivitäten ihrer PCR-Systeme. Die RT-nested-PCR zum Nachweis von Hepatitis A-Virus erwies sich in der eigenen Untersuchung ebenfalls als sehr sensitiv. Die rechnerisch bestimmte Nachweisgrenze lag zwischen einer und vier Genkopien pro PCR-Ansatz. Da etwa 60 Viruspartikel einer KID₅₀ entsprechen (JANSEN et al., 1985), ergibt sich daraus eine Empfindlichkeit von ca. 0,1 KID₅₀, pro Ansatz. SCHWAB et al. (1991) konnten 0,3 PFU pro 100 µl detektieren und LEISINGER und METZLER sogar eine bis 10 KID₅₀ aus einem Liter Leitungswasser. Der molekularbiologische Nachweis von Hantaviren erwies sich in der vorliegenden Arbeit als eine Zehnerpotenz sensitiver als die Zellkultur. KARIWA et al. (1995) und CHU et al. (1995) berichten von ähnlichen Empfindlichkeiten. Es gelang der Nachweis von 0,6 PFU bzw. einer FFU. HÖR-LING et al. (1995) erreichten mit 3.75×10^{-5} FFU pro ml weitaus höhere Empfindlichkeiten.

Obwohl zur Detektion von Rotaviren für die eigene Untersuchung zahlreiche Versuche zur Optimierung des Nachweissystems durchgeführt worden waren, konnte die Sensitivität nicht unter 2 Äq. KID₅₀ pro PCR-Ansatz gesenkt werden und war somit genauso empfindlich wie die kulturelle Virusisolierung. Die Nachweisgrenze des etablierten PCR-Nachweises darf jedoch nicht unterbewertet werden, da für den Sensitivitätsvergleich der beiden Nachweissysteme ein sehr gut an die Zellkultur adaptiertes Rotavirus verwendet wurde, was zur Folge hatte, dass es sich beim Nachweis in Kultur um ein hoch empfindliches Detektionssystem handelte. Um die Sensitivität des molekularbiologischen Nachweises zu steigern, hätten möglicherweise Versuche zur Optimierung der RT-Reaktion, die bei der Amplifikation von dsRNA der limitierende Faktor ist (GOUVEA et al., 1990; WILDE et al., 1990), zum Erfolg geführt.

Da 50 Viruspartikel einer KID₅₀ entsprechen (LeGUYADER et al., 1994), ergibt sich für die etablierte RT-nested-PCR zum Nachweis von Rotaviren eine Empfindlichkeit von 50 Partikeln. SCHWAB et al. (1991) berichten von 5 Partikeln (0,1 PFU/ 100 μ l) und PUIG et al. (1994) von ein bis 10 Partikeln pro PCR Ansatz. WILDE et al. (1990) definierten für ihre RT-PCR eine Empfindlichkeit von 500 Kopien pro Ansatz.

Die Sensitivität des PCR-Nachweises von Hepatitis B-Virus wurde anhand des Eurohep Standard No. 1 bestimmt, dessen Viruspartikelgehalt exakt definiert ist. Unter Verwendung dieses Standards ergab sich in der eigenen Untersuchung eine Nachweisgrenze von einer Genkopie pro Ansatz, die mit den von HAWKINS et al. (1994), VANDENVELDE et al. (1993) und KEUM et al. (1997) beschriebenen Sensitivitäten vergleichbar ist. DOUGLAS et al. (1993) berichten von einer Empfindlichkeit von 3 Partikeln pro ml, die anhand einer Verdünnungsreihe von Hepatitis B-Virus-DNA bestimmt wurde. Um diese niedrige Nachweisgrenze jedoch statistisch sicherzustellen, hätten die Untersucher 100 PCR-Reaktionen ansetzen müssen, von denen drei Ansätze ein positives Signal hätten liefern müssen. DOUGLAS et al. führten jedoch nur sechs Wiederholungen durch, von denen vier positiv waren. Es liegt die Vermutung nahe, dass entweder die Verdünnungsreihe nicht optimal angelegt war oder der Virusgehalt in der Ausgangslösung höher war als angenommen. HEERMANN et al. (1999) schildern die Schwierigkeiten bei der Quantifizierung von Hepatitis B-Virus. In der Studie zur Etablierung des Eurohep Standard No. 1 konnte gezeigt werden, dass sich bei der Quantifizierung ein und desselben Serums in verschiedenen Laboratorien sehr kontroverse Ergebnisse ergaben. Um die Nachweisgrenze des verwendeten PCR-Nachweises möglichst genau definieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit auf den definierten Standard zurückgegriffen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für alle nachzuweisenden Viren sehr empfindliche PCR-Systeme etabliert werden konnten, die sich, mit Ausnahme der Rotavirus-PCR, empfindlicher als der im Labor verwendete kulturelle Virusnachweis erwiesen.

Die Amplifikation im LightCycler bot gegenüber dem herkömmlichen Thermocycler einige Vorteile. Die bereits erwähnte Möglichkeit, die Bildung der PCR-Produkte zu beobachten, führte dazu, dass die Reaktion zu einem für die Quantifizierung günstigen Zeitpunkt abgebrochen werden konnte. Zum anderen konnten, um die Sensitivität zu steigern, im Bedarfsfall Reaktionszyklen hinzugefügt werden. Durch die Auswertung der Fluoreszenzsignale erübrigte sich die Detektion in der Gelelektrophorese, wodurch die Resultate schneller zur Verfügung standen, was besonders in der Routinediagnostik von Bedeutung ist. Die Reaktion in Glaskapillaren und die geringen Reaktionsvolumina von 20 ul führten ebenfalls zu weiterer Zeitersparnis. Die im Anschluss an die Amplifikation durchgeführte Schmelzkurvenanalyse ermöglichte die Detektion von Primerdimeren anhand unspezifischer Peaks. Die Bildung von Dimeren senkt die Empfindlichkeit der PCR, was besonders bei der Detektion von geringen Erregermengen zum Tragen kommt. So hatte sich beispielsweise gezeigt, dass unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kits die Bildung von Nebenprodukten herabgesetzt werden konnte (vergl. Abb. 9 und Abb. 17). Von ähnlichen Befunden berichtet KESSLER (2000) bei der Quantifizierung von Herpes-Simplex-Virus-DNA mit dem LightCycler.

Zur zusätzlichen Spezifitätsüberprüfung wurden alle Amplifikate der zweiten PCR in ein Agarosegel übertragen. Hierbei wurde deutlich, dass Unterschiede im LightCycler erkennbar waren, die in der Gelelektrophorese anhand der Signalstärke nicht aufgefallen wären. Aus Abb. 13 geht eindeutig hervor, dass bei einer MgCl₂-Konzentration vom 4 mM die nested-PCR am effektivsten verlief, wohingegen sich die Unterschiede der Amplifikate im Gel nicht

so deutlich abzeichneten (Abb. 14). Dies konnte zum einen durch die mangelnde Empfindlichkeit der Gelelektrophorese und zum anderen durch Pipettierfehler beim Beladen der Geltaschen bedingt sein.

Als Problem bei der Interpretation der Ergebnisse erwies sich die Tatsache, dass es zur Temperaturverschiebung bei der Bildung der Schmelzkurven kommen kann. Diese Verschiebung ist durch das Verhältnis zwischen der MgCl₂-Konzentration, der Templatemenge und der CYBR Green I-Konzentration bedingt. In Abb. 33 betrug die Schmelztemperatur des Ansatzes mit einer MgCl₂-Konzentration von 2 mM ca. 81 °C, wohingegen die restlichen Amplifikate bei ca. 82 °C schmolzen. Ähnlich verhielt es sich in Abb. 56. Bei einer Viruskonzentration von 10⁴ KID₅₀/ml wurde ein Produkt mit der Schmelztemperatur von 82 °C detektiert. Bei einer Konzentration von 10³ KID₅₀/ml betrug sie dagegen nur 81 °C. Die Überprüfung der Amplifikate im Agarosegel (Abb. 58) zeigte, dass es sich bei dem bei 81 °C schmelzenden Amplifikat um ein unspezifisches Produkt handelte. Ganz anders verhielt es sich in Abb. 78 und 79. Alle Amplifikate zeigten im Gel eine spezifische Bande, obwohl auch hier ein Temperaturunterschied von 1 °C auftrat. Die Tragweite dieses Sachverhaltes wird besonders bei der Auswertung der Außenmessungen in den Abbildungen 97 und 98 deutlich. Das PCR-Produkt der Probe 64 war mit einer Temperaturverschiebung von 1 °C nach der Überprüfung im Agarosegel als Enterovirus-positiv und die Probe 99 als negativ zu bewerten. Die Probe 96 war dagegen mit einer Verschiebung von 3 °C virus-negativ. Der unspezifische Peak stellte sich im Agarosegel als "Schmierbande" dar. Bei nicht ganz eindeutigen Ergebnissen ist es also unumgänglich, die Amplifikate des LightCyclers zur Sicherheit in ein Agarosegel zu übertragen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse musste beachtet werden, dass der Verlauf der Amplifikation nur im Zusammenhang mit den Schmelzkurven interpretiert werden konnte. Die Kurven der Amplifikation zeigten das Gesamtsignal der Fluoreszenz, d.h. das Signal von unspezifischen Produkten war in dieser Darstellung nicht von spezifischen zu unterscheiden. Ob eine Probe als positiv oder negativ zu bewerten war, konnte also nur anhand der Schmelzkurve beurteilt werden. Die Quantifizierung der PCR-Produkte unter Verwendung eines externen Standards wurde durchgeführt, indem aus der Flächen unter dem spezifischen Peak der einzelnen Standards 1 bis 3 eine Standardkurve (Regression) ermittelt wurde. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass eine solche Kurve umso genauer ist, je mehr Punkte für ihre Ermittlung eingesetzt werden. In dieser Untersuchung wurden nur drei Punkte bestimmt, weshalb die Ergebnisse als relativ ungenau einzustufen sind. Auf die Bedeutung des Abbruchs der PCR-Reaktion in der logarithmischen Phase soll an dieser Stelle noch einmal eingegangen werden. Aus Abb. 32 geht hervor, dass die PCR-Reaktion der Standards 1 bis 3 bereits ab Zyklus 24 in die Sättigungsphase überging. Die Schmelzkurvenanalyse in Abb. 31 zeigte, dass nach einer Amplifikation von 30 Zyklen keine Zusammenhänge zwischen Peakfläche und eingesetzter Erregermenge mehr hergestellt werden konnten. Vergleicht man hingegen die Ergebnisse in Abb. 17 und Abb. 18 (s. 4.4.1.4), verhält sich die Größe der Peakfläche proportional zur Virusmenge.

Eine exakte Quantifizierung setzt voraus, dass die Effizienz der PCR des Standards gleich der der Ziel-DNA ist. Da die Amplifikation der Ziel-DNA aus Probenmaterial und die des Standards aus ZKÜ erfolgte, der frei von Inhibitoren war, war die Effizienz beider PCR-Reaktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht absolut identisch. Die Quantifizierung stellte demnach nur einen Näherungswert dar und musste in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Inhibitionskontrolle bewertet werden. Durch zahlreiche Pipettierschritte und die rechnerisch bestimmten Erregermengen (über Verdünnungen) ergaben sich weitere mögliche Fehlerquellen, die bei der Beurteilung der Resultate berücksichtigt werden müssen.

5.2 Ergebnisse der Außenversuche und deren Bedeutung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden sowohl Substrat- als auch Luftproben an zehn verschiedenen Standorten der Abwasser- und Müllentsorgung gezogen. Dabei wurden standortund personenbezogene Messungen durchgeführt. Nachdem alle Proben aufgearbeitet waren, erfolgte die Virusdetektion. Die Proben der standortbezogenen Messungen wurden auf das Vorhandensein von humanen Entero- und Rotaviren mit der Zellkultur in vier verschiedenen Zellsystemen untersucht. Der spezifische Erregernachweis erfolgte mit der RT-nested-PCR. Auf alle anderen Viren wurde, aufgrund bereits beschriebener Probleme bei der kulturellen Virusisolierung, nur molekularbiologisch untersucht. Der Virusnachweis in den Proben der personenbezogenen Messungen wurde nur molekularbiologisch durchgeführt, da hier, bedingt durch die geringe Durchflußrate des PGP-GSP-Systems, nur sehr geringe Viruskonzentrationen erwartet wurden.

Es zeigte sich, dass in keiner der 160 untersuchten Proben Hepatitis A-und Hepatitis B-Virus, Hantavirus und Rotavirus mit der RT-nested-PCR detektiert werden konnte. Für den Nachweis von humanen Enteroviren ergaben sich sowohl in der Zellkultur als auch in der RTnested-PCR zahlreiche positive Proben. Des Weiteren konnte in einigen Proben Poliovirus mit der RT-nested-PCR detektiert werden.

5.2.1 Untersuchung auf Hantaviren

Da Hantaviren von infizierten Nagern über Speichel, Urin und Kot ausgeschieden werden (LEE et al., 1984, zitiert nach TENNSTEDT et al., 1994), steht ihr Vorkommen in engem Zusammenhang mit dem der als Reservoir fungierenden Nagetiere. Die Viren können über kontaminierte Stäube und Aerosole übertragen werden (KIM et al., 1994) und stellen demnach für Personen, die sich vermehrt in Wäldern, Feldern, Bauernhöfen oder in der Nähe von Wasser aufhalten, ein erhöhtes Infektionsrisiko dar (KULZER und HEIDLAND, 1994). An Standorten wie der Mülldeponie, der Kanalisation und Kläranlage war also potentiell mit dem Vorkommen von Hantaviren zu rechnen. Des Weiteren berichten PILASKI et al. (1991) und SCHUBERT et al. (1991) von der endemischen Verbreitung von HFRS in bestimmten Gebieten Deutschlands. Nach Angaben von PILASKI et al. (1991) wird der für den Menschen besonders pathogene Typ vorwiegend durch Rötelmäuse während der Sommermonate übertragen. Die Infektion über Kot von Wanderratten wird ebenfalls vermutet. Die Hantavirusnegativen PCR-Ergebnisse geben keinen Aufschluss darüber, ob an Standorten der Abwasserund Müllentsorgung grundsätzlich mit keiner Virusbelastung zu rechnen ist. Möglicherweise sind die negativen Resultate an den Standorten dieser Untersuchung nur durch eine geringe Nagerpopulation begründet.

5.2.2 Untersuchung auf Hepatitis A-Virus

Das Vorkommen von Hepatitis A-Virus in Abwasser (DIVIZIA et al., 1998; PINA et al., 1998; BOSCH et al., 1991; TSAI et al., 1994), Oberflächenwasser (LEWIS und METCALF, 1988; PINA et al., 1998) und Grundwasser (ABBASZADEGAN et al., 1999) ist in der Literatur hinreichend beschrieben. Die Viren werden in hohen Konzentrationen von 10⁸ bis 10⁹ KID₅₀/ml von infizierten Individuen mit dem Kot ausgeschieden (TICEHURST et al., 1987) und gelangen so über das Abwasser an Standorte der Kläranlage und Kanalisation. Das Hepatitis A-Virus zeichnet sich besonders durch eine hohe Stabilität in der Umwelt aus, so dass es STRAUB et al. (1994a) und GRAFF et al. (1993) sogar gelang, das Virus mit der PCR aus behandelten Klärschlämmen nachzuweisen. DIVIZIA et al. (1998) untersuchten Abwasserproben, die an verschiedenen Stellen des Klärprozesses in einer Kläranlage entnommen wurden. Dabei konnte mit der PCR in 80 % der Rohwässer und in 10 % der vorgeklärten Proben Hepatitis A-Virus detektiert werden. PINA et al. (1998) konnten neben humanen Enteroviren und Adenoviren auch in vier von 18 untersuchten Abwasserproben Hepatitis A-

Virus mit der PCR nachweisen. BOSCH et al. (1991) und TSAI et al. (1994) berichten ebenfalls von Hepatitis A-Virus positiven Abwasserproben. Bei der Untersuchung von geklärtem Siedlungswasser stellten LEISINGER und METZLER (1997) häufig Rota- und Enteroviren, Hepatitis A-Virus hingegen in keiner der untersuchten Proben fest.

Über ein erhöhtes Infektionsrisiko von Arbeitskräften, die im Bereich der Abwasserbehandlung tätig sind, wird in der Literatur an vielen Stellen diskutiert. BRUGHA et al. (1998) und DeSERRES und LALIBERTE (1997) berichten von einem erhöhten Risiko einer Hepatitis A-Virus Infektion für die Beschäftigten, es wird sogar eine Impfung Serum negativer Mitarbeiter empfohlen (BRUGHA et al., 1998). Im Gegensatz dazu stehen die Publikationen von LERMAN et al. (1999), LEVIN et al. (2000) und SALANO und COPELLO (1998). In ihren Studien konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein erhöhtes Risiko beobachtet werden.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit in neun von 15 Abwasserproben humane Enteroviren mit der RT-nested-PCR detektiert werden konnten, ist mit einer prinzipiellen Kontamination der Abwässer mit anderen enteritischen Viren wie Hepatitis A-Virus zu rechnen. Durch verschiedene Tätigkeiten wie Zuleiten und Mischen von Abwasser, bei der Beseitigung von Klärschlamm oder Reinigungsarbeiten können erregerhaltige Aerosole entstehen. Die Bildung von solchen Aerosolen ist auch bei der Beseitigung von fäkal kontaminierten Abfällen im Deponiebereich z.B. durch Radladertätigkeiten denkbar. In wie weit sie für eine Infektion verantwortlich sein können ist umstritten (WARLEN und HOFF, 1989). Da die Infektion fäkal-oral durch Schmutz- und Schmierinfektionen erfolgt, ist eine Aufnahme über kontaminierte Hände eher wahrscheinlich. Die erregerhaltigen Aerosole können ebenso wie das Spritzwasser Oberflächen mit Virus kontaminieren und sind somit bei der Verfrachtung der Erreger von Bedeutung.

In der eigenen Untersuchung konnte in keiner der Luft- und Substratproben Hepatitis A-Virus nachgewiesen werden. Die negativen Befunde konnten dadurch bedingt sein, dass für den Erregernachweis nur 15 ml Probenvolumen aufgearbeitet wurden. DIVIZIA et al. (1998) gelang der Nachweis nur dann, wenn 1,7 bis 2,3 l Abwasser aufkonzentriert wurden. TSAI hingegen konzentrierten die Erreger aus 100 ml und PINA et al. (1998) aus 500 ml Abwasser. Des Weiteren wurden die meisten Substratproben am Abwasserlauf in Kaltental (Stuttgart) entnommen. Aufgrund des allgemeinen Rückgangs von Hepatitis A-Virus in Europa (GRAFF et al., 1993) bestand demnach auch die Möglichkeit, dass tatsächlich kein Virus vorhanden war. Um eine fundiertere Aussage über das Vorkommen von Hepatitis A-Virus in Abwasser treffen zu können, hätten mehr Abwasserproben von unterschiedlichen Kläranlagen untersucht werden müssen. Da aber die eigentliche Zielsetzung der Untersuchung die Detektion von humanpathogenen Viren in der Luft war, sollte die Untersuchung der Substratproben nur eine Zusatzinformation über eine mögliche Emissionsquelle liefern

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass an den untersuchten Standorten mit einer Belastung der Luft mit Hepatitis A-Virus in hohem Umfang nicht zu rechnen ist, wobei eine Kontamination in einzelnen Fällen nicht vollständig auszuschließen ist.

5.2.3 Untersuchung auf Rotaviren

Über eine erfolgreiche kulturelle Isolierung von Rotaviren aus Abwasser berichten ROSE et al. (1986) und SMITH und GERBA (1982). Der Nachweis erfolgte in beiden Untersuchungen mit dem IFT. SMITH und GERBA (1982) ermittelten dabei Viruskonzentrationen zwischen 150 und 7488 positive Zellen pro 20 1 Abwasser. Der molekularbiologische Virusnachweis gelang TSAI et al. (1994) und LEISINGER und METZLER (1997). In der eigenen Unter-

suchung ergab sich im ELISA (Ridascreen), wie bereits erwähnt (5.1.3), für drei Abwasserproben eine positive Farbreaktion. Durch die im Anschluss durchgeführte RT-nested-PCR konnten die Resultate hingegen nicht bestätigt werden. Dies deutete darauf hin, dass die im ELISA positiven Ergebnisse als falsch-positiv zu bewerten waren. Es bestand jedoch rein theoretisch auch die Möglichkeit, dass mit den ausgewählten Primern ein Feldvirus nicht erfasst wurde, wohingegen der Nachweis mit dem ELISA möglich war. Die negativen Virusbefunde waren mit großer Wahrscheinlichkeit hauptsächlich dadurch begründet, dass, im Gegensatz zu den veröffentlichten Studien, mit 15 ml relativ geringe Mengen an Abwasser aufgearbeitet wurden. Wie bereits beim Nachweis von Hepatitis A-Virus erwähnt, war der Virusnachweis aus Abwasser nicht Gegenstand dieser Untersuchung und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Auf die Möglichkeit der aerogenen Verbreitung von Rotaviren wird hingewiesen (COOK et al., 1990; SATTAR et al., 1984), obwohl bisher keine Versuche unternommen wurden, natürlich vorkommende luftgetragene Rotaviren zu isolieren (IJAZ et al., 1994). Als enteritische Viren werden die Rotaviren von infizierten Individuen ausgeschieden und gelangen auf diese Weise vor allem in das Abwasser und damit möglicherweise auch in die Luft an Standorten der Abwasserentsorgung. Da Rotaviren die Hauptursache von Durchfallerkrankungen bei Kindern sind (DESSELBERGER, 1996), ist ein Eintrag auf z.B. Mülldeponien über kontaminierte Windeln denkbar. Wie bereits bei der eigenen Untersuchung der Substratproben waren im ELISA (Ridascreen) zwei Luftproben, die im Bereich einer Kläranlage gezogen worden waren, virus-positv. Das Resultat ließ sich ebenfalls mit der PCR nicht bestätigen. Es bestand demnach wieder die Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses im ELISA oder eines nicht-Erfassens eines Feldvirus durch die in der PCR verwendeten Primer. Die negativen Resultate konnten möglicherweise dadurch bedingt sein, dass mit Ausnahme des Standortes Abwasserlauf (Kaltental) und der Kläranlage in Stuttgart Mühlhausen alle Luftkeimmessungen während der wärmeren Monate durchgeführt worden waren. Da Rotavirusinfektionen gehäuft in den kühleren Monaten auftreten (COOK et al., 1990; GENDREL et al., 1999), das möglicherweise dadurch bedingt ist, dass Rotaviren bei mittlerer RH und niedrigen Temperaturen am stabilsten sind (IJAZ et al., 1994; SATTAR et al., 1984), bestand demnach die Möglichkeit, dass sich zum Zeitpunkt der eigenen Messungen keine Rotaviren in der Umwelt befanden.

5.2.4 Untersuchung auf Hepatitis B-Virus

Aufgrund einer seroepidemiologischen Studie in einer Kläranlage in Griechenland (ARVA-NITIDOU et al., 1998) wurden bei der eigenen Untersuchung alle Substrat- und Luftproben auf das Vorhandensein von Hepatitis B-Virus überprüft. Die Studie von ARVANITIDOU et al. (1998) hatte gezeigt, dass fünfmal mehr Mitarbeiter, die mit Abwasser in Kontakt kommen, anti-HBc (Antikörper) positiv waren als die entsprechende Kontrollgruppe. Die Klärwerker hatten sich wahrscheinlich über Hautläsionen oder über die Schleimhäute mit dem Erreger infiziert. Das Virus kann über Blut, blutige Körperflüssigkeiten, kontaminierte Hygieneartikel und Urin in das Abwasser gelangen. Hierzu wurden bisher keine Studien durchgeführt. In der eigenen Untersuchung konnte in keiner der Substratproben Hepatitis B-Virus mit der sehr empfindlichen nested-PCR detektiert werden.

Eine Kontamination von Flächen über Spritzwasser und Aerosole ist aber dennoch denkbar. Da in keiner der untersuchten Luftproben Hepatitis B-Virus nachgewiesen werden konnte, ist eine aerogene Verfrachtung jedoch eher unwahrscheinlich.

5.2.5 Untersuchung auf humane Enteroviren

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigten, dass in zahlreichen Substrat- und Luftproben humane Enteroviren unter Verwendung mehrerer Zellsysteme isoliert werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit den molekularbiologischen Resultaten diskutiert und mit den Befunden in der Literatur verglichen. Des Weiteren werden auf die Effizienz der unterschiedliche Sammler zum Nachweis von Virusaerosolen und die Bedeutung der Befunde eingegangen.

5.2.5.1 Humane Enteroviren in Luft

In der Literatur sind einige Studien zu finden, die sich mit dem Nachweis luftgetragener humaner Enteroviren im Bereich von Kläranlagen und bei der Verregnung von Abwasser beschäftigen. SETTNISCH et al. (1982) gelang die Virusisolierung in 10 von 31 untersuchten Proben aus der Luft in der Umgebung von belüfteten Abwasserreinigungsbecken. Die meisten positiven Befunde waren zwischen November und Dezember möglich. Eine ähnliche Untersuchung führten CARDUCCI et al. (1995) durch. Auch ihnen gelang die Isolierung humaner Enteroviren, wobei ein verstärktes Vorkommen während der Monate August bis November registriert wurde. TELTSCH und KATZENELSON (1978) untersuchten die Ausbreitung von Virusaerosolen bei der Verregnung von Abwasser. Vier der insgesamt 12 untersuchten Luftproben enthielten humane Enteroviren. Neben dem rein qualitativen Virusnachweis sind auch einige Untersuchungen beschrieben, in denen eine Ouantifizierung der detektierten Erreger erfolgte. PFIRRMANN und VANDEN BOSSCHE (1994) konnten sowohl auf einer Mülldeponie als auch in einer Müllverbrennungsanlage Enteroviren mit einer Konzentration von 4×10^3 KID₅₀/m³ detektieren. Auf dem Gelände einer Kläranlage ermittelten FANNIN et al. (1985) 4.7 x 10^{-3} bis 1.0 x 10^{-2} PFU/m³ und CARDUCCI et al. (2000) 1.07 x 10^{-4} bis 31,6 x 10⁻³ MPN/I Luft. Bei der Verregnung von Abwasser berichten TELTSCH et al. (1980) von 8,2 x 10^{-2} bis 1,4 x 10^{-1} Isolate/m³ und MOORE et al. (1979) von Konzentrationen zwischen 7,5 x 10⁻⁴ und 1,7 x 10⁻² PFU/m³. Mit Ausnahme der Untersuchung von PFIRR-MANN und VANDEN BOSSCHE (1994) wurden nur sehr geringe Viruskonzentrationen ermittelt. Für die meisten Studien wurde mit großen Durchflussraten von bis zu 600 l/min gearbeitet und der Wert der Viruskonzentrationen pro m³ bzw. 1 Luft abschließend heruntergerechnet.

Ein direkter Vergleich der Befunde unterschiedlicher Studien ist jedoch schwierig, da weder für die Sammlung noch für den Nachweis luftgetragener Viren Standardprotokolle formuliert wurden (SATTAR et al., 1997; IJAZ et al., 1987). Die Untersuchungen unterscheiden sich in den eingesetzten Sammelgeräten mit ihren unterschiedlichen physikalischen Abscheideprinzipien, den Sammelzeiten, der Zusammensetzung des Sammelmediums und vor allem in der Art der Probenaufarbeitung und der Virusdetektion.

Für die eigene Untersuchung wurden alle Proben nach der Aufkonzentrierung in einer ersten Untersuchungsphase in vier verschiedenen Zellkulturen inokuliert. Eine Probe galt als positiv, wenn sie nach einem Beobachtungszeitraum von ca. 14 Tagen cytopathische Effekte aufwies. Dabei musste jedoch berücksichtigt werden, dass die Ausbildung eines cpe nicht gleich bedeutend mit dem Nachweis eines humanen Enterovirus ist. Aus diesem Grund sollten die Isolate im Anschluss an die Plaquereinigung sequenziert werden, um die Identität der Isolate zu bestimmen. Außerdem wurden alle Proben mit der RT-nested-PCR auf das Vorhandensein von Enterovirus-RNA untersucht. Bei der kulturellen Virusisolierung zeigten 33 der 99 untersuchten Luftproben einen cpe in mindestens einer der eingesetzten Zelllinien. In BGM waren 26 Proben positiv, in A549 18 und in VERO 27, und 21 Proben wiesen in MA104 einen cpe auf. Unter Verwendung der Zellkultur wurden Konzentrationen zwischen 10^{1,34} und

mehr als $10^{4,35}$ KID₅₀/m³ Luft ermittelt (s. Tab. 91). Die höchsten Werte waren dabei in der Müllverbrennungsanlage und am Abwasserlauf Kaltental zu finden.

Zu Beginn lag der Verdacht nahe, dass die in der eigenen Untersuchung ermittelten Viruskonzentrationen möglicherweise deshalb höher als in der Literatur ausfielen, da neben den humanen Enteroviren zahlreiche andere cpe-verursachende Viren in den verwendeten Zellkulturen vermehrt wurden. Der im Anschluss durchgeführte molekularbiologische Enterovirusnachweis zeigte hingegen, dass keine der untersuchten Proben, die in der PCR positiv war, in der Zellkultur ohne cpe blieb. Die hohen Viruskonzentrationen in der eigenen Arbeit zeigten vielmehr, dass eine schonende Methode zur Aufarbeitung der Proben etabliert wurde, die neben der Konzentrierung der Viruspartikel auch zur Abtrennung von toxischen Substanzen führte. Dadurch konnten die Proben auf den Zellsystemen verbleiben und mussten nicht, wie bei PFIRRMANN (1994) beschrieben, wieder entfernt werden. Weiterhin wurden die Proben in mehrere Zellsysteme über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 14 Tagen inokuliert. Im Gegensatz dazu verwendeten TELTSCH et al. (1980) und CARDUCCI et al. (2000) nur eine Zelllinie für die Virusisolierung. Eine weitere Ursache für die hohen Viruskonzentrationen stellten wahrscheinlich die geringen Scherkräfte während der Luftkeimsammlung mit den Spezial-Impingern dar. Die Durchflußrate betrug dabei 30 l/min. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass mit dem Zyklon-Sammler und dem XM-2, die mit weit aus höheren Durchflussraten arbeiten, der Virusnachweis nahezu unmöglich war.

Der molekularbiologische Nachweis von humanen Enteroviren aus Luftproben ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Im Allgemeinen gilt die PCR als ein hoch empfindliches Nachweissystem und wird aufgrund dieser Sensitivität häufig der Zellkultur vorgezogen. Die eigene Untersuchung aller Proben der personen- und standortbezogenen Messungen mit der Enterovirus-RT-nested-PCR zeigte, dass von 33 cpe-verursachenden Proben 21 in der PCR positiv waren. Es gab hingegen keine Probe, die in der PCR positive Ergebnisse lieferte und in der Kultur ohne cpe blieb. Dieser Sachverhalt bestätigte die Effektivität des durchgeführten kulturellen Erregernachweises unter Einsatz mehrerer Zellkultursysteme und einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen bzw. zwei Passagen.

Weiterhin wird beim Vergleich der Quantifizierung der Viren mit der Zellkultur und der PCR-Technik in Tab.91 deutlich, dass mit dem kulturellen Erregernachweis meist höhere oder zumindest gleich hohe Viruskonzentrationen ermittelt werden konnten. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in den meisten dieser Proben die PCR-Reaktion inhibiert bzw. stark inhibiert war. Weiterhin wurden bei der Quantifizierung mit der Zellkultur möglicherweise andere cpe-verursachende (nicht Enteroviren) ebenfalls erfasst. Anders verhielt es sich bei den Proben 38, 37, 33, 67, 72 und 53. In diesen Proben konnten mit der PCR Viruskonzentrationen ermittelt werden, die bis zu einer Zehnerpotenz über denen der Kultur lagen. Möglicherweise wurde in der PCR ein Virus detektiert, das sich sehr langsam oder gar nicht in den verwendeten Zellsystemen vermehrte. Eine weitere mögliche Erklärung bestand darin, dass die PCR-Reaktion in diesen Proben effektiv ablaufen konnte, da mit Ausnahme der Probe 67 die PCR-Reaktion nicht inhibiert wurde. Die Versuche zur Bestimmung der Sensitivität der Enterovirus-RT-nested-PCR hatten gezeigt, dass die molekularbiologische Detektion rein rechnerisch zwei Zehnerpotenzen empfindlicher als der kulturelle Erregernachweis war.

Die Resultate der eigenen Untersuchung wiesen darauf hin, dass sowohl die Sammlung der Aerosole als auch die Aufarbeitung der Sammelflüssigkeiten zu keiner nennenswerten Inaktivierung der Viruspartikel geführt hatte. Weiterhin wurde deutlich, dass keines der beiden Nachweissysteme grundsätzlich zu bevorzugen ist. Es ist vielmehr wichtig, die Auswahl des Nachweisverfahrens entsprechend der eigenen Fragestellungen zu treffen. Der größte Vorteil der PCR gegenüber der Zellkultur liegt in der schnellen Durchführbarkeit und im Nachweis nicht kultivierbarer Viren. Der Vorteil der Zellkultur ist hingegen die Detektion und die gleichzeitige Isolierung vermehrungsfähiger Erreger.

Neben der molekularbiologischen Detektion von humanen Enteroviren wurden in der vorliegenden Arbeit alle Luftkeimproben auf das Vorhandensein von Poliovirus-RNA untersucht. Der Nachweis von luftgetragenem Poliovirus vom Typ 1 und 2 wird während der Verrieselung von Abwasser (TELTSCH et al., 1980; MOORE et al., 1979) und aus der Umgebungsluft von Kläranlagen (SETTNISCH et al., 1982) beschrieben. Der Nachweis von Poliovirus vom Wildtyp ist relativ unwahrscheinlich. Eine Studie von NAIRN und CLEMENTS (1999) hatte gezeigt, dass sich über einen Zeitraum von 21 Jahren keines der 3039 typisierten Isolate aus Patientenmaterialien als Poliovirus vom Wildtyp erwies. Die Studie wurde zwischen den Jahren 1977 und 1997 in Glasgow durchgeführt. Nur 13 % aller untersuchten Isolate waren Poliovirus vom Typ 1-3. GRABOW et al. (1999) untersuchten verschiedene Wässer in Südafrika auf das Vorhandensein von Poliovirus. Auch hier handelte es sich bei allen Isolaten um die Impfstämme Poliovirus 1 bis 3, wobei die Befunde dabei in engem Zusammenhang mit einer zuvor durchgeführten Impfaktion standen. In der Studie von PFIRRMANN (1994) zum Vorkommen luftgetragener Viren an Arbeitsplätzen in der Müllentsorgung und -verwertung konnte die Autorin aus keiner der untersuchten Proben Poliovirus isolieren. Die Isolate erwiesen sich als Coxsackievirus vom Typ B und Echoviren. Bei Luftuntersuchungen, die auf dem Gelände einer Kläranlage durchgeführt wurden, konnten FANNIN et al. (1985) ebenfalls nur Coxsackievirus B1 detektieren.

Die Tab. 91 zeigt die Befunde der eigenen Untersuchung. Dabei erwiesen sich die Proben 60, 67, 72 und 51 eindeutig als positiv, wohingegen die beiden Proben 65 und 38 im LightCycler einen schwachen, schwer zu interpretierenden spezifischen Peak ergaben. Erst nach der elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate konnten die beiden Proben als Poliovirus-positiv betrachtet werden (s. Abb. 99 und Abb. 100). Die Sequenzierung der in A549 plaquegereinigten Isolate der Proben 65, 38, 72 und 51 bestätigte dieses Ergebnis (s. 4.7), wobei sich die Sequenz der Probe 38 in zahlreichen Bereichen deutlich von den anderen unterscheidet. Da sowohl die PCR als auch die Sequenzierung der Isolate entsprechende Ergebnisse lieferten, konnte der Poliovirus-Befund in den Proben 65, 38, 72 und 51 als gesichert betrachtet werden. Aus der Tab. 91 geht außerdem hervor, dass die Proben 60 und 67 ebenfalls in der Poliovirus-spezifischen PCR positiv waren. Eine Identifizierung der in der Zellkultur isolierten Erreger wurde nicht durchgeführt.

Die Proben 33, 37 und 63 waren in der Poliovirus RT-nested-PCR eindeutig als negativ zu bewerten. Die Sequenzierung der in A549 isolierten Erreger ergab jedoch, dass es sich bei diesen Isolaten um Poliovirus handelte. Beim Vergleich der Sequenzbereiche konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Da eine vollständige Inhibition der PCR-Reaktion aufgrund des Nachweises des zugesetzten Equinen-Rhinovirus ausgeschlossen werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass im Probenmaterial möglicherweise sehr geringe Mengen an Poliovirus vorhanden waren, wodurch die Nachweisgrenze des verwendeten PCR-Systems unterschritten wurde. Erst nach einer Kultivierung bzw. Vermehrung in der Zellkultur hätte die Viruskonzentration für eine Detektion ausreichend hoch sein können. Es ist bekannt, dass das Poliovirus vom Typ 1-3 sehr gut an die Zellkultur angepasst ist und es somit leicht zur Verdrängung anderer Enteroviren kommen kann. Eine weitere mögliche Erklärung der negativen Poliovirus-PCR-Ergebnisse bestand darin, dass eine Kontamination während der Plaquereinigung mit dem im Labor verwendeten Virusstamm vorlag. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste das im Labor eingesetzte Poliovirus sequenziert werden.

Die Sequenzierung der Isolate der Proben 53, 54 und 56 ergab, dass es sich hierbei ebenfalls um Poliovirus handelte, wobei die Poliovirus-PCR negativ war. Beim Vergleich der Gensequenzen (s. 4.7) mit denen der bereits erwähnten Isolate zeigte sich jedoch, dass in verschiedenen Sequenzabschnitten deutliche Unterschiede auftraten. Würde es sich ebenfalls um eine Labor-Kontamination handeln, hätten sich keine Abweichungen ergeben.

Die Sequenzierung der Isolate hatte gezeigt, dass es sich in allen Fällen um Poliovirus vom Typ 1 handelte. Dieses Resultat war vermutlich darin begründet, dass zum Zeitpunkt der Probenahme noch die aktive Immunisierung mit Polio Sabin S (Typ 1-3) durchgeführt wurde.

Standort	Proben Nr.	Zellkultur [log KID ₅₀ /ml]	humane Enteroviren RT-nested-PCR [Äq. log KID ₅₀ /ml]	Poliovirus RT-nested- PCR	Inhibition
Wasserlauf Kaltental I	38	1,7 bis 2,7	3,53	ja	-
Kaltental II	61	0,7 bis 1,7	0,56	nein	++
	60	1,7 bis > 3,7	3,53	ja	++
Kaltental III	37	0,7 bis 1,7	2,13	nein	-
	62	0,7 bis 2,7	0,87	nein	++
	33	0,7 bis 1,7	2,75	nein	-
Mülldeponie	67	1,7 bis 2,7	3,51	ja	++
Bruchsal	65	0,7 bis 1,7	1,61	ja	++
	72	0,7 bis 1,7	2,06	ja	-
	70	0,7	0,72	nein	-
Kläranlage	73	0,7 bis 1,7	1,66	nein	++
München	74	0,7	0,54	nein	+
	69	1,7	1,28	nein	-
	75	0,7 bis 1,7	0,56	nein	++
Mülldeponie	64	1,7 bis 2,7	0,47	nein	++
Gelnhausen	63	0,7 bis 1,7	0,56	nein	+
	57	0,7 bis 1,7	0,53	nein	++
MVA	56	0,7 bis 1,7	1,39	nein	++
Stuttgart	53	1,7	2,87	nein	-
Statiguit	51	2,7 bis > 3,7	3,74	ja	-
	54	0,7 bis 2,7	1,40	nein	++

Tab. 91: Zusammenfassung der positiven Befunde der Luftproben aller Standorte (Proben mit
cpe aber ohne positives PCR-Signal sind dabei nicht dargestellt)

log KID₅₀/mlVirustiter der Probe in der ZellkulturÄq. log KID₅₀/mlVirustiter der Probe in der PCR

- Probe nicht inhibiert

+ Probe inhibiert +

++ Probe stark inhibiert

Für die Einschätzung des gesundheitlichen Risikos, das von luftgetragenen humanen Enteroviren ausgehen kann, ist die minimal infektiöse Dosis, d.h. die Erregermenge, die notwendig ist, um bei einem empfänglichen Individuum eine Infektion auszulösen, von entscheidender Bedeutung. Nach Angaben von SNOWDON et al. (1989) sind ein bis 200 Viruspartikel und nach HURST (1989) 1 PFU für eine Infektion notwendig. Im Rahmen einer Studie zur aerogenen Übertragung von Coxsackievirus A Typ 21 wird von einer minimalen Dosis von

> größer bzw. gleich

30 KID₅₀ berichtet (COUCH et al., 1970). Da eine Infektion mit humanen Enteroviren jedoch hauptsächlich über den fäkal-oralen Weg erfolgt, ist eine Infektion über z.B. kontaminierte Hände von besonderer Bedeutung. Virusaerosole können vom Ort ihrer Entstehung über mehrere Meter verfrachtet werden (SETTNISCH et al., 1982; TELTSCH und KATZEN-ELSON, 1978; CARDUCCI et al., 1995) und auf diese Weise andere Flächen wie z.B. Radladerkabinen, Geländer, Kleidung usw. kontaminieren. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion sowohl auf dem fäkal-oralen als auch dem aerogenen Weg wird nicht nur durch die minimal infektiöse Dosis sondern auch durch den Immunitätsstatus des einzelnen Menschen bestimmt. Deshalb können aus den erzielten Ergebnissen der eigenen Arbeit bezüglich der gesundheitlichen Gefährdung für das beschäftigte Personal an Standorten der Müll- und Abwasserbehandlung keine eindeutigen Rückschlüsse gezogen werden. Die Daten zeigen lediglich, dass die Möglichkeit einer Infektion mit humanen Enteroviren nicht ausgeschlossen werden kann. FANNIN et al. (1985) und CARDUCCI et al. (1999) schätzen dieses Risiko im Bereich von Kläranlagen als eher gering ein. Die Untersuchung von PFIRRMANN (1994) hatte gezeigt, dass das Vorkommen luftgetragener Viren mit dem Staubgehalt der Luft korreliert ist. Daher schlägt die Autorin neben allgemeinen Hygienemaßnahmen wie z.B. das Tragen und regelmäßige Wechseln von Arbeitskleidung, Ess-, Trink- und Rauchverbot, Händedesinfektion usw., vor allem staubreduzierende Maßnahmen vor. Dadurch kann der Infektionsdruck gemindert und einer gesundheitlichen Gefährdung des Personals vorgebeugt werden.

Die Untersuchung der gesammelten Luftproben gab nicht nur Auskunft über das Vorkommen und die Häufigkeit von humanen Enteroviren an den beprobten Standorten. Es ließen sich vielmehr auch Informationen zur Sammlung von luftgetragenen Viren unter Verwendung unterschiedlicher Sammelgeräte ableiten. Aus Tab. 90 geht hervor, dass beim Einsatz der beiden Filtrationssammler MD 8 und PGP-GSP weder mit der Zellkultur noch mit der RTnested-PCR luftgetragene Viren nachgewiesen werden konnten, obwohl die parallele Bestimmung mit anderen Geräten gezeigt hatte, dass zum Zeitpunkt der Messung virushaltige Aerosole anwesend waren. Die negativen Befunde der PGP-GSP-Proben waren möglicherweise durch die geringe Durchflußrate von 3,5 l/min. bedingt. Eine weitere Erklärung ist die Dehydration der Viren durch die langen Sammelzeiten. Sie führt zu einer irreversiblen Schädigung der Partikel, wobei der Stress der Austrocknung nicht für alle Viren gleich ist (WARREN et al., 1969). Das Prinzip der Dehydration erklärte jedoch nicht die negativen PCR-Ergebnisse, da die RNA auch im nicht infektiösen Partikel durch das Kapsid geschützt bleibt und so zu positiven PCR-Ergebnissen führen kann. JASCHHOF et al. (1991) gelang es mit dem MD 8 bei einer Sammelzeit von 15 min. und einer Durchflußrate von 120 l/min. Influenzavirus A aus der Raumluft einer Kinderklinik zu isolieren. Die Isolierung von humanen Enteroviren aus der Luft einer Kläranlage beschreiben SETTNISCH et al. (1982). Dabei wurde in Porzellannutschen eingespannter, befeuchteter Verbandsmull als Filtermaterial verwendet. Die Sammlung erfolgte für drei Stunden, in denen 3 m³ gezogen wurden.

Mit den beiden "*high-volume*"-Sammlern XM-2 und HZ wurden insgesamt 32 Proben gezogen. Trotz hoher Durchflussraten konnten nur in jeweils einer Probe Viren isoliert werden. Der molekularbiologische Nachweis war in allen Proben negativ. Für dieses Ergebnis gab es mehrere mögliche Erklärungen. Vielleicht führten die hohen Luftdurchsätze zu einem erhöhten Sammelstress, wodurch die Partikel inaktiviert wurden. Außerdem wurde den Sammelmedien erst nach der Sammlung Protein zugesetzt. Auf die stabilisierende Wirkung von Proteinzusätzen während der Sammlung wurde im Literaturteil (2.1.3) schon eingehend hingewiesen. Eine weitere Schutzfunktion könnte auch dem als Entschäumer zugesetzten Olivenöl zu den Sammelflüssigkeiten der beiden Spezial-Impinger zukommen. Der unter 3.5.5.2 beschriebene Vorversuch, in dem das Sammelmedium des XM-2 mit Polio Sabin S

versetzt und für 30 min. im Sammler betrieben wurde, hatte jedoch gezeigt, dass der Virustiter nach der Sammlung nicht abgenommen hatte. Dies ließ vermuten, dass der vorgeschaltete Impaktor des XM-2 keine Viren sammelt. Nach Angaben des Herstellers scheidet er im Partikelbereich zwischen 2 und 8 µm ab. BRENNER et al. (1988) verwendeten in ihrer Studie einen XM-2-Sammler, wobei die Virusisolierung in keiner Probe möglich war. Da jedoch auch alle untersuchten Abwasserproben virus-frei waren, bleibt unklar, ob der Sammler keine Viren abschied oder an diesem Standort keine Virusaerosole vorhanden waren. Die Sammlung luftgetragener Viren mit Zyklon-Sammlern ist in der Literatur jedoch hinreichend beschrieben. So wurden sie beispielsweise von TELTSCH et al. (1980) und TELTSCH und KATZENELSON (1978) erfolgreich zur Sammlung von humanen Enteroviren bei der Verregnung von Abwasser eingesetzt. Der von BOURGUEIL et al. (1992b) verwendete Zyklon-Sammler war hingegen nicht geeignet, um geringe Virusmengen zu sammeln.

Die besten Ergebnisse wurden mit den beiden Spezial-Impingern erzielt. Von 41 untersuchten Proben war aus 31 die kulturelle Virusisolierung erfolgreich. Der Impinger nach Prof. W. Müller wurde bereits von PFIRRMANN (1994) und MACK (1986) erfolgreich zum Nachweis luftgetragener Viren bei Außenmessungen eingesetzt. Eine umfassende Studie von RIEF-BRENNER (1986) zur Abscheideleistung der Spezial-Impinger zeigte ebenfalls, dass diese Geräte geeignet sind, Virusaerosole zu sammeln. Im Vergleich zum häufig verwendeten AGI-30 konnte durchschnittlich eine achtmal höhere Abscheidewirkung festgestellt werden. Das Prinzip des Impingement ist eine klassische Methode zur Sammlung von Virusaerosolen und wird am meisten angewendet (STOLZE und KAADEN, 1989). In der Literatur ist eine Vielzahl von Geräten beschrieben, die nach diesem Prinzip arbeiten. Sie wurden erfolgreich zur Isolierung von Newcastle-Disease (HUGH-JONES et al., 1973), MKS-Virus (SELLERS und PARKER, 1969), Schweine-Vesicular-Disease-Virus (SELLERS und HERNIMAN, 1974), Afrikanisches-Schweinefieber-Virus (WILKINSON et al., 1977) und zum Nachweis von humanen Enteroviren (SETTNISCH et al., 1982) eingesetzt.

5.2.5.2 Humane Enteroviren in Abwasser

Zum Vorkommen humaner Enteroviren in den unterschiedlichsten Wässern wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Quantifizierungen werden, wie aus Tabelle 1 und 2 hervorgeht, nur unter Verwendung der Zellkultur beschrieben. Im Abwasserbereich sind dabei Viruskonzentrationen von maximal 22,5 MPNCU/ 1 (GANTZER et al., 1998), 3,3 x 10³ MPNCU/ 1 (REYNOLDS et al., 1998), 8,3 x 10⁴ PFU/ 1 (GUTTMAN-BASS et al., 1987), 2962 PFU/ 20 1 (SMITH und GERBA, 1982), 14 PFU/ 20 ml (PINA et al., 1998) und 12 PFU/ 20 ml (PUIG et al., 1994) zu finden. Entsprechend dem Nachweis von luftgetragenen Viren ist auch der Vergleich der detektierten Viruskonzentrationen aus Wasser unterschiedlicher Studien dadurch erschwert, dass keine Standardprotokolle zur Aufarbeitung und zum Nachweis zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse sind auch hier von der Probenmenge, der Effizienz der Probenaufkonzentrierung, der Anzahl der eingesetzten Zellsysteme und vom Beobachtungszeitraum inklusive Zellpassagen abhängig.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung sind in Tab. 92 zusammengefasst. Bei der kulturellen Isolierung cpe-verursachender Viren zeigten von 16 untersuchten Substratproben (15 Abwasser- und eine Sickerwasserprobe) 13 Proben in mindestens einer Zelllinie einen cpe. Im Zellsystem VERO waren sieben, in A549 neun, in MA104 fünf und in BGM 11 Proben positiv. Für die Quantifizierung ergaben sich Viruskonzentrationen zwischen 5 und mehr als $10^{3,7}$ KID₅₀ pro 15 ml aufkonzentrierte Probenmenge, die somit über den in der Literatur beschrieben Werten lagen. Die hohen Konzentrationen waren wahrscheinlich hauptsächlich durch den Einsatz mehrerer Zellkultursysteme und den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen bei der kulturellen Virusisolierung bedingt. Entsprechend dem Nachweis von humanen Enteroviren aus Luftproben wird zu Isolierung aus Abwasser häufig nur eine Zelllinie eingesetzt (GANTZER et al., 1998; REYNOLDS et al., 1998; GUTTMAN-BASS et al., 1987). Des Weiteren wird auf eine Passage der Kulturen verzichtet (PINA et al., 1998; PUIG et al., 1994).

Um einen Zusammenhang zwischen Emissionsquelle und Virusaerosol herstellen zu können, werden häufig sowohl die Luft als auch das Abwasser auf Viren untersucht. TELTSCH et al. (1980) untersuchten bei ihren Außenmessungen zum Nachweis luftgetragener Enteroviren während der Verregnung von Abwasser neben der Luft auch das Abwasser selbst. Dabei konnten aus 71 % aller untersuchten Abwasserproben und 44 % aller Luftproben humane Enteroviren isoliert werden. Die detektierten Viruskonzentrationen betrugen dabei zwischen $6,0 \ge 10^{\circ}$ und $8,2 \ge 10^{4}$ PFU/1 Abwasser und $8,2 \ge 10^{-2}$ bis $1,4 \ge 10^{-1}$ Isolate pro m³ Luft. Für die Untersuchung wurden zwei Liter Abwasser aufkonzentriert. Eine ähnliche Studie führten MOORE et al. (1979) durch. Nach der Aufarbeitung von zwei Liter Probe konnten die Autoren Viruskonzentrationen von 2,3 x 10° bis 3,5 x 10^{2} PFU/ 1 bestimmen. CARDUCCI et al. (1995) gelang die kulturelle Isolierung humaner Enteroviren aus 58 % der Abwasser- und 25 % der Luftproben, die auf dem Gelände einer Kläranlage gezogen worden waren. Eine Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. In der eigenen Untersuchung konnte ebenfalls ein Zusammenhang hergestellt werden. Am Standort Kaltental und der Kläranlage München waren sowohl die Substrat- als auch die gesammelten Luftproben virus-positiv. Die ermittelten Viruskonzentrationen waren dabei im Abwasser höher als in den Luftproben.

Standort	Proben Nr.	Zellkultur [log KID ₅₀ /ml]	humane Enteroviren RT-nested-PCR [Äq. log KID ₅₀ /ml]	Poliovirus RT-nested- PCR	Inhibition
Wasserlauf	107	2,7 bis > 3,7	3,32	nein	-
Kaltental I	111	0,7 bis 1,7	-0,02	nein	-
Kaltental II	101	1,7 bis 2,7	-0,05	nein	+
	106	2,7 bis > 3,7	2,73	nein	+
Kaltental III	112	nicht isolierbar	nicht quantifizierbar	nein	-
	102	1,7 bis 2,7	1,92	nein	+
Kaltental IV	108	0,7	nicht quantifizierbar	nein	-
	110	0,7	nicht quantifizierbar	nein	-
Kläranlage München	114	nicht isolierbar	nicht quantifizierbar	nein	-
Kanalisation	81	1,7	2,43	nein	+

 Tab. 92: Zusammenfassung der positiven Befunde der Substratproben (Proben mit cpe aber ohne positives PCR-Signal sind dabei nicht dargestellt)

log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der Zellkultur

Äq. log KID₅₀/ml Virustiter der Probe in der PCR

> größer bzw. gleich

- Probe nicht inhibiert + Probe inhibiert ++ Probe stark inhibiert

Neben dem kulturellen Nachweis humaner Enteroviren aus verschiedenen Wässern wird die Detektion mit der RT-PCR in zahlreichen Studien beschrieben. Aus der Übersichtstabelle 2 wird deutlich, dass dabei im Gegensatz zur eigenen Untersuchung keine Quantifizierung vorgenommen wird. Ebenso verhält es sich bei den Studien, in denen sowohl die Virusisolierung in der Zellkultur als auch der molekularbiologische Erregernachweis eingesetzt wird (vergl. Tab. 5). In der vorliegenden Arbeit ergab sich für 10 der 16 getesteten Substratproben ein Enterovirus-spezifisches Signal in der RT-nested-PCR im LightCycler. Da der Standard jedoch für die Viruskonzentrationen zwischen 10² und 10⁴ KID₅₀/ml definiert war, konnten die geringen Erregermengen in den Proben 112, 108, 110 und 114 nicht quantifiziert werden. Eine Hemmung dieser PCR-Reaktionen konnte ausgeschlossen werden, da in den Proben keine Inhibition ermittelt wurde. Die Sequenzierung der Isolate 102, 108 und 81 ergab, dass es sich bei den beiden Isolaten aus Abwasser um Poliovirus und bei dem aus Sickerwasser um Echovirus handelte (s. 4.7). Die Poliovirus-spezifische PCR lieferte, wie es auch bei einigen Luftproben der Fall war und dort bereits diskutiert wurde, kein Signal.

Im Gegensatz zum Nachweis von humanen Enteroviren aus Luftproben sind, wie aus Tabelle 5 hervorgeht, in der Literatur zahlreiche Untersuchungen beschrieben, die sich mit dem kulturellen und molekularbiologischen Erregernachweis aus Wasser beschäftigen. In allen Studien sind mit der PCR mehr Proben virus-positiv als mit der kulturellen Methode. Dies wird meist auf die hohe Sensitivität des PCR-Nachweises zurückgeführt. Zum anderen werden mit der PCR Viren erfasst, die sich entweder nicht oder nur sehr langsam in Kultur vermehren, oder solche, die ihre Infektiosität verloren haben. Aus diesen Gründen kam es höchstwahrscheinlich dazu, dass auch in der eigenen Untersuchung mit der Enterovirusspezifischen PCR zwei Proben (112 und 114) virus-positiv waren, wohingegen in der Zellkultur nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen kein cpe sichtbar war. Der Vergleich der Ergebnisse, die sich bei der Quantifizierung mit der PCR und der Zellkultur ergaben machte deutlich, dass die PCR mit Ausnahme der Sickerwasserprobe 81 keine höheren Viruskonzentrationen lieferte. Die in der Literatur beschriebene Überlegenheit der PCR konnte demnach, wie bereits auch bei den parallelen Nachweisen aus Luftproben, nicht bestätigt werden. Bei genauer Betrachtung der Durchführung der Studien ist es nicht überraschend, dass mit der Zellkultur im Allgemeinen schlechtere Ergebnisse erzielt werden. Für die Virusisolierung wird meist nur eine Zelllinie verwendet (ABBASZADEGAN et al., 1999; GANTZER et al., 1998; PINA et al., 1998; PUIG et al., 1994; SELLWOOD et al., 1998). Des weiteren werden häufig kurze Beobachtungszeiträume gewählt. PINA et al. (1998) und PUIG et al. (1994) inkubierten ihre Abwasserproben beispielsweise nur fünf Tage. Eine Zellpassage wurde nicht durchgeführt.

Fasst man die Ergebnisse der eigenen Arbeit zusammen, zeigten von allen 32 in der PCR positiven Luft- und Substratproben nur die beiden Abwasserproben 112 und 114 keinen cpe in der Zellkultur. Dies machte deutlich, dass ein optimiertes kulturelles Nachweissystem, wie es für die Detektion humaner Enteroviren etabliert werden konnte, ebenso wie die PCR dazu geeignet ist, Viren qualitativ und quantitativ aus Umweltproben nachzuweisen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an zehn verschiedenen Standorten der Abwasser- und Müllentsorgung die Luft auf das Vorhandensein von potentiell humanpathogenen Viren untersucht. Neben dem Nachweis von Hepatitis B-Virus und Hantaviren stand dabei vor allem die Suche nach Hepatitis A-Virus, Rotaviren, humanen Enteroviren und Poliovirus im Vordergrund.

Zur Sammlung luftgetragener Viren wurden mehrere Luftkeimsammler parallel eingesetzt, die nach unterschiedlichen physikalischen Prinzipien Partikel abscheiden. Für standortbezogene Messungen waren die zwei Spezial-Impinger, der MD 8-Sammler und zwei "*high-volume*"-Sammler. Die personenbezogenen Messungen wurden mit dem personengetragenen Gefahrstoff-Probenahmesystem (PGP-GSP-System) durchgeführt, mit dem die Exposition einzelner Arbeitnehmer während ihrer Tätigkeit untersucht werden sollte.

Die gesammelten Luftproben wurden vor dem eigentlichen Erregernachweis aufgearbeitet. Da die Proben, bedingt durch die verwendeten Sammelgeräte und deren Abscheideprinzipien in unterschiedlicher Form vorlagen, wurden hierzu verschiedene geeignete Protokolle etabliert. Für die Aufarbeitung der gesammelten Luftproben kamen folgende Methoden zur Anwendung: Vorfiltration, Ultrafiltrationen (100 und 500 KD), Dichtegradientenultrazentrifugation mit Saccharosegradienten und der Verdau von Gelatine mit Trypsin.

Im Anschluss an die Probenaufarbeitung erfolgte die Virusdetektion und -quantifizierung aus den standortbezogenen Luftproben für humane Enteroviren und Rotaviren sowohl über die kulturelle Anzucht in vier verschiedenen Zellsystemen (VERO, BGM, A549 und MA104) als auch unter Verwendung molekularbiologischer Methoden (RT-nested-PCR). Der Virusnachweis aller weiteren Erreger wurde nur molekularbiologisch (PCR) durchgeführt. Aufgrund des geringen Luftdurchsatzes des PGP-GSP-Systems wurden alle Proben der personenbezogenen Messungen nur mittels der PCR untersucht.

Für den PCR-Nachweis der Viren wurden vier unterschiedliche Extraktionskits zur parallelen Isolierung von DNA und RNA getestet und, mit Ausnahme des Nachweises von Hantaviren, einzelne nested-PCR-Systeme zum qualitativen und quantitativen Virusnachweis mittels externer Standards im LightCycler etabliert. Weiterhin wurde für die Untersuchung ein System entwickelt, mit dem eine mögliche Inhibition des PCR-Nachweises aus den Luftproben über die Wiederfindung eines zugesetzten Virusspikes überprüft wurde. Für humane Enteroviren, Poliovirus, Hepatitis A-Virus und Hantaviren wurden sehr empfindliche RTnested-PCR-Systeme etabliert, die sich als empfindlicher als die im Labor verwendete kulturelle Virusisolierung erwiesen. Die Sensitivität des molekularbiologischen Nachweises von Rotaviren entsprach der kulturellen Virusisolierung. Der PCR-Nachweis von Hepatitis B-Virus hatte eine Nachweisgrenze von einer Genkopie pro PCR-Anastz.

Die Untersuchung von 144 Luftproben (99 standortbezogene und 45 personenbezogene Proben) zeigte, dass in keiner der Proben Hepatitis A-Virus, Hepatitis B-Virus, Hantaviren und Rotaviren unter Verwendung der etablierten nested-PCR-Systeme detektiert werden konnte. Die kulturelle Isolierung von Rotaviren war ebenfalls aus keiner der Proben möglich. Beim molekularbiologischen Nachweis von humanen Enteroviren ergaben sich für 21 Luftproben positive Resultate, wobei anhand des externen Standards Viruskonzentrationen in der Sammelflüssigkeit von Äq. $10^{0,47}$ KID₅₀/ml bis Äq. $10^{3,74}$ KID₅₀/ml ermittelt wurden. Der Nachweis von Poliovirus gelang in sechs der untersuchten Luftproben. Die kulturelle Virus-isolierung war aus 33 von 99 untersuchten Proben erfolgreich. Es wurden dabei Viruskonzen-

trationen zwischen $10^{0,7}$ KID₅₀/ml und mehr als $10^{3,7}$ KID₅₀/ml bestimmt. Die Sequenzierung einiger Plaque-gereinigter Isolate ergab, dass es sich bei allen Isolaten um Poliovirus vom Typ 1 handelte.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchung deuten darauf hin, dass an den untersuchten Standorten mit einer Belastung der Luft mit Hepatitis A-Virus, Hantaviren, Rotaviren und Hepatitis B-Virus in hohem Umfang nicht zu rechnen ist, wobei eine Kontamination in einzelnen Fällen nicht vollständig auszuschließen ist. Der Nachweis von humanen Enteroviren in 21 % der untersuchten standortbezogenen Proben macht hingegen deutlich, dass vor allem im Bereich der Abwasserentsorgung mit einer Virusbelastung der Umgebungsluft zu rechnen ist. Die Möglichkeit einer Infektion kann daher nicht ausgeschlossen werden.

7 Summary

In this study, aerosols workers at waste and wastewater treatment plants were exposed to, were examined with regard to the presence of airborne human pathogenic viruses. Besides the detection of hepatitis B virus and hantaviruses the main issue was to detect hepatitis A virus, rotavirus, human enteroviruses and poliovirus.

Airborne viruses were sampled in parallel with different bioaerosol samplers, using various physical collection methods. At selected locations, measurements with two special-impingers, the MD 8-sampler and two high-volume-samplers were performed. Personal exposition of waste treatment workers to aerosols was measured using the PGP-GSP-system.

Before viruses could be detected, the air samples had to be prepared. Because of the different sampling methods, several protocols had to be established. For the purification and concentration of the collected virus particles the following methods were used: prefiltration, ultrafiltration (100 and 500 KD), density gradient ultrafiltration using a sucrose gradient and the digestion of gelatine with trypsin.

After these sampling processing procedures the virus detection and quantification of the samples of the special-impingers, the MD 8-sampler and the high-volume-samplers were assayed for human enteroviruses and rotavirus using four different tissue cultures (VERO, BGM, A549 and MA104) and molecular biological methods (RT-nested-PCR). For all other viruses only molecular biological methods (PCR) were applied. Regarding to the low flow-rate of the PGP-GSP-System only PCR was taken for virus detection.

For the detection of viruses using the PCR assay, four different commercially available extraction-kits for DNA and RNA were compared. For all viruses besides hantavirus, several nested-PCR-systems for the qualitative and quantitative (using externe standards) determination with the LightCycler technique were established. To get informations about the attitude of a possible inhibition of the PCR reaction, the prepared samples were seeded with defined amounts of equine rhinovirus and amplified with an external standard on the LightCycler. The established PCR assays for hantavirus, hepatitis A virus, human enteroviruses and poliovirus showed a higher sensitivity (to be more sensitive) than the used cell culture. For detecting rotavirus, the sensitivity of both assays were equal, the detection limit for the nested-PCR of hepatitis B virus was one gencopy per reaction.

In none of the 144 aerosol samples (45 PGP-GSP-samples and 99 from the other samplers) rotavirus, hepatitis A virus, hepatitis B virus and hantaviruses could be detected with the PCR technology. Also no rotavirus was isolated with the tissue culture method. In 21 cases the PCR showed positive results for human enterovirus RNA, the calculated concentration ranged from Äq. $10^{0,47}$ KID₅₀/ml to Äq. $10^{3,74}$ KID₅₀/ml. Viral infectivity could be demonstrated in 33 out of 99 examined specimens after inoculation on several cell cultures. The virus concentration ranged from $10^{0,7}$ KID₅₀/ml to more than $10^{3,7}$ KID₅₀/ml. After plaque purification some of the isolates were sequenced and identified as poliovirus type 1.

In conclusion, the results of these studies indicate that at the investigated locations high measurable levels of hepatitis A virus, hantavirus, rotavirus and hepatitis B virus can not be expected. Nevertheless, in some special cases contamination might be possible. The detection of human enterovirus in 21 % of the location-based samples shows that especially bioaerosols at the waste water treatment plants might possibly be contaminated with viruses. Therefore the risk of infections can not be excluded.

8 Literaturverzeichnis

Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gebra, C.B. and Pepper, I.L.:

Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. <u>59</u>, 1318-1324 (1993)

Abbaszadegan, M., Steward, P. and LeChevallier, M.:

A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol. <u>65</u>, 444-449 (1999)

Abu Al-Soud, W. and Radström, P.:

Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl. Environ. Microbiol. <u>64</u>, 3748-3753 (1998)

Adamczyk, B., Adamczyk G. und Millhahn, J.:

Schnellnachweis von Influenzavirus A auf Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen mit der Hämadsorptionsmethode. Dtsch. Gesundh. wes. 30, 2439-2443 (1975)

Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S. and Kimura, K.:

Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood strains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J. Forensic Sci. <u>39</u>, 362-372 (1994)

Akers, T.G., Prato, C.M. and Dubovi, E.J.:

Airborne stability of simian virus 40. Appl. Microbiol. <u>26</u>, 146-148 (1973)

Alexander, L.M. and Morris, R.:

PCR and environmental monitoring-the way forward?. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 291-294 (1991)

Alexeyev, O.A., Elgh, F., Ahlm, C., Stigbrand, T., Settergren, B., Wadell, G. and Juto, P.:

Hantavirus antigen detection using human serum immunoglobulin M as the capturing antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Med. Hyg. <u>54</u> (4), 367-371 (1996)

Andersen, A.A.:

New sampler for the collecting, sizing and enumeration of viable airborne particles. J. Bacteriol. <u>76</u>, 471-484 (1958)

Andren, S. and Brugha, R.:

Health effects among workers in sewage treatment plants (letter). Occup. Environ. Med. $\underline{56}$ (11), 790 (1999)

Anonym a):

Airborne transmission of smallpox. Br. Med. J. <u>17</u>, 127 (1970)

Anonym e):

Percoll: Methods and applications. Pharmacia Biotech, second edition, Inc., Molecular Biology Reagents Division, USA (1995)

Anonym f):

Eppendorf Trainings Center: Einführung in die PCR (1999)

Arnal, C., Crance, J.M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Deloince, R. and Billaudel, S.: Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. Zent.bl. Hyg. Umweltmed. <u>201</u>, 279-284 (1998)

Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Mignotte, B., Imbert-Marcille, B.M. and Billaudel, S.:

Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA.

Appl. Environ. Microbiol. 65, 322-326 (1999)

Artenstein, M.S. and Miller, W.S.:

Air sampling for respiratory disease agents in army recruits. Bacteriol. Rev. <u>30</u>, 571-575 (1966)

Arthur, R.R., Lofts, R.S., Gomez, J., Glass, G.E., LeDuc, J.W. and Childs, J.E.:

Grouping of hantaviruses by small (s) genome segment polymerase chain reaction and amplification of viral RNA from wild-caught rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. <u>47</u> (2), 210-224 (1992)

Arundel, A.V., Sterling, E.M., Biggin, J.H. and Sterling, T.D.:

Indirect health effects of relative humidity in indoor environments. Environ. Health Perspectives <u>65</u>, 351-361 (1986)

Arvanitidou, M., Constantinidis, T.C., Doutsos, J., Mandraveli, K. and Katsouyannopoulos, V.:

Occupational hepatitis B virus infection in sewage workers. Med. Lav. 89, 437-444 (1998)

Avsic-Zupanc, T., Xiao, S.-Y., Stojanovic, R., Gligic, A., Van der Groen, G. and LeDuc, J.W.:

Characterization of dobrava virus: A hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. J. Med. Virol. <u>38</u>, 132-137 (1992)

Banks, M.:

DNA restriction fragment length polymorphism among british isolates of aujeszky's disease virus: Use of the polymerase chain reaction to discriminate among strains. Br. vet. J. <u>149</u>, 155-163 (1993) **Barardi, C.R.M., Yip, H., Emsile, K.R., Vesey, G., Shanker, S.R. and Williams, K.L.:** Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. Int. J. Food Microbiol. <u>49</u>, 9-18 (1999)

Beards, G.M., Campbell, A.D., Cottrell, N.R., Peiris, J.S.M., Rees, N., Sanders, R.C., Shirley, J.A., Wood, H.C. and Flewett, T.H.:

Enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection.

J. Clin. Microbiol. 19, 248-254 (1984)

Beaulieux, F., See, D.M., Leparc-Goffart, I., Aymard, M. and Lina, B.:

Use of magnetic beads versus guanidium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction followed by polymerase chain reaction for the rapid, sensitive detection of enterovirus RNA. Res. Virol. <u>148</u>, 11-15 (1997)

Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and Atlas, R.M.:

Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Critical Reviews in Biochem, and Molecular Biol. 26, 301-334 (1991)

Critical Reviews in Biochem. and Molecular Biol. 26, 301-334 (1991)

Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J.:

Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis.

Lancet 2, 1281-1283 (1973)

Bloch, A.B., Orenstein, W.A., Ewing, W.M., Spain, W.H., Mallison, G.F., Herrmann, K.L. and Hinman, A.R.:

Measles outbreak in a pediatric practice: Airborne transmission in an office setting. Pediatrics $\underline{75}$ (4), 676-683 (1985)

Böhm, R., Martens, W. und Bittighofer, M.:

Aktuelle Bewertung der Luftkeimbelastung in Abfallbehandlungsanlagen. Abfall-Wirtschaft-Neues aus Forschung und Praxis, M.I.C Baeza-Verlag, Witzenhausen (1998)

Bonin, O.:

Quantitativ-virologische Methodik. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1973)

Bosch, A. Gajardo, R., Abad, F.X., Diez, J.M. and Jofre, J.:

Concentration of hepatitis A virus in environmental samples. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 229-234 (1991)

Bourgueil, E., Hutet, E., Cariolet, R. and Vannier, P.:

Air sampling procedure for evaluation of viral excretion level by vaccinated pigs infected with aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Research Vet. Science 52, 182-186 (1992b)
Bourgueil, E., Hutet, E., Cariolet, R.and Vannier, P.:

Experimental infection of pigs with the porcine respiratory coronavirus (PRCV): Measure of viral excretion. Vet. Microbiol. 31, 11-18 (1992a)

Brachman, P.S., Ehrlich, R., Eichenwald, H.F., Gabelli, V.J., Kethley, T.W., Madin S.H., Maltman, J.R., Middlebrook, G., Morton, J.D., Silver, I.H. and Wolfe, E.K.:

Standard sampler for assay of airborne microorganisms. Science <u>144</u>, 1295 (1964)

Brenner, K.P., Scarpino, P.V. and Clark, C.S.:

Animal viruses, coliphages and bacteria in aerosols and wastewater at a spray irritation site. Appl. Environ. Microbiol. 54, 409-415 (1988)

Brugha, R., Heptonstall, J., Farrington, P., Andren, S., Perry, K. and Perry, J.:

Risk of hepatitis A infection in sewage workers. Occup. Environ. Med. <u>55</u>, 567-569 (1998)

Burke, B. and Desselberger, U.:

Rotavirus pathogenicity. Virol. <u>218</u>, 299-305 (1996)

Bustos, J., Zamora, P., Mejia, E., Varela, Y. and Gomez, B.:

Purification of rubella virus by isopycnic gradients: Continous Percoll versus discontinous sucrose.

Arch. Virol. 118, 285-288 (1991)

Buttner, M.P., Willeke, K. and Grinshpun, S.A.:

Sampling and analysis of airborne microorganisms. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V.: Manual of environmental microbiology. pp. 629-640, ASM Press, Washington, D.C. (1997)

Carducci, A., Arrighi, S. and Ruschi, A.:

Detection of coliphages and enteroviruse in sawage and aerosol from activated sludge wastewater treatment plant. Appl. Microbiol. (letters) 21, 207-209 (1995)

Carducci, A., Tozzi, E., Rubulotta, E., Casini, B., Cantiani, L., Rovini, E., Muscillo, M. and Pacini, R.:

Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. Wat. Res. 34, 1173-1178 (2000)

Carrascosa, A.L., Del Val, M., Santaren, J.F. and Vinuela, E.:

Purification and properties of african swine fever virus. J. Virol. <u>54</u> (2), 337-344 (1985)

Chadwick, P.R., Walker, M. and Rees, A.E.:

Airborne transmission of a small round structured virus. Lancet <u>343</u>, 171 (1994)

Chambon, M., Bailly, J.L., Beguet, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Gaulme, J., Labbe, A., Malpuech, G. and Peigue Lafeuille, H.:

An outbreak due echovirus type 30 in a neonatal unit in France in 1997: Usefulness of PCR diagnosis.

J. Hosp. Infec. <u>43:1</u>, 63-68 (1999)

Chang, S.L., Stevenson, R.E., Bryant, A.R., Woodward, R.L. and Kabler, P.W.:

Removal of coxsackie and bacterial viruses in water of known chemical content by flocculation with aluminium sulfate of ferric chloride under various testing conditions. Am. J. Publ. Hlth. <u>48</u>, 51-61 (1985)

Chitambar, S.D., Grewal, S.M., Bokil, M., Srinivasan, M.A. and Banerjee, K.:

Cultivation of buffalo green monkey kidney cells persistently infected with hepatitis A virus. Indian J. Med. Res. <u>99</u>, 115-120 (1994)

Christensen, L.S., Mortensen, S., Bftner, A., Strandbygaard, B.S., Rfnsholt, L., Henriksen, C.A. and Andersen, J.B.:

Further evidence of long distance airborne transmission of aujeszky's disease (pseudorabies) virus.

Vet. Record <u>27</u>, 317-321 (1993)

Christensen, L.S., Mousing, J., Mortensen, S., Soerensen, K.J., Strandbygaard, S.B., Henriksen, C.A. and Andersen, J.B.:

Evidence of long distance airborne transmission of aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet. Record <u>10</u>, 471-474 (1990)

Chu, Y.-K., Jennings, G.B. and Schmaljohn, C.S.:

A vaccinia virus-vectored hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with hantaan and seoul viruses but not puumala virus. J. Virol. <u>69</u>, 6417-6423 (1995)

Clark, S., Lach, V. and Lidwell, O.M.:

The performance of the Biotest RCS centrifugal air sampler. J. Hosp. Infec. 2, 181-186 (1981)

Cook, S.M., Glass, R.I., LeBaron, C.W. and Ho, M.-S.:

Global seasonality of rotavirus infections. Bull. WHO <u>68</u> (2), 171-177 (1990)

Couch, R.B., Douglas, R.G., Lindgren, JR., K.M. and Gerone, P.J.:

Airborne transmission of respiratory infection with coxsackievirus A type 21. Am. J. Epidem. <u>91</u>, 78-86 (1970)

Cubitt, W.D.:

A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral infections. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 197-203 (1991)

Decker, H.M., Buchanan, L.M., Frisque, M.E. and Dahlgren, C.M.:

Advances in large-volume air sampling. Cont. Control <u>8</u>, 13-17 (1969)

DeLeon, R., Shieh, C., Baric, R. S. and Sobsey, M. D.:

Detection of enteroviruses and hepatitis A in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction. Proc. Water Qual. Technol. Conf. 18, 833-835 (1990)

Deng, M.Y., Day, S.P. and Cliver, D.O.:

Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. Appl. Environ. Microbiol. <u>60</u>, 1927-1933 (1994)

DeSerres, G. and Laliberte, D.:

Hepatitis A among workers from a waste water treatment plant during a small community outbreak. Occup. Environ. Med. 54, 60-62 (1997)

Desselberger, U.:

Genome rearrangements of rotaviruses. Adv. Virus Res. <u>46</u>, 69-95 (1996)

Divizia, M., Ruscio, V., Degener, A.M. and Pana, A.:

Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. New Microbiol. <u>21</u>, 161-167 (1998)

Donaldson, A.I. and Ferris, N.P.:

The survival of foot-and-mouth disease virus in open air conditions. J. Hyg. Camb. <u>74</u>, 490-416 (1975)

Donaldson, A.I., Herniman, K.A.J., Parker, J. and Sellers, R.F.:

Further investigations on the airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. J. Hyg. Camb. <u>68</u>, 557-564 (1970)

Douglas, D.D., Taswell, H.F., Rakela, J. and Rabe, D.:

Absense of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. Transfusion <u>33</u>, 212-216 (1993)

Dubovi E.J. and Akers, T.G.:

Airborne stability of tailless bacterial viruses S-13 and MS-2. Appl. Microbiol. <u>19</u>, 624-628 (1970)

Dumke, R. und Feuerpfeil, I.:

Verhalten von Enteroviren und Coliphagen in der Trinkwasseraufbereitung. DVGW-Schriftenreihe Wasser <u>91</u>, 217-239 (1997)

Ehrlich, R. and Miller, S.:

Effect of NO_2 on airborne venezuelan equine encephalomyelitis virus. Appl. Microbiol. <u>23</u>, 481-484 (1972)

Enriquez, J., Fuchs, K., Martinez Cerezo, F.J., Seminago, R., Madoz, P., Torras, J. and Roggendorf, M.:

Demonstration of HCV-RNA and HBV-DNA in the serum of HbsAg negative patients with hepatocellular carcinoma. Eur. J. Epidemiol. 10, 189-194 (1994)

Errington, F.P. and Powell, E.O.:

A cyclone separator for aerosol sampling in the field. J. Hyg. Camb. 67, 387-399 (1969)

Fannin, K.F., Vana, S.C. and Jakubowski, W.:

Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses. Appl. Environ. Microbiol. <u>49</u>, 1191-1196 (1985)

Fohlman, J., Friman, G. and Tuvemo, T.:

Enterovirus infections in new disguise. Lakartidningen <u>94</u>:28-29, 2555-2560 (1997)

Friedman-Alvermann, B., Müller, D. and Spies, K.:

Isolation and propagation of hepatitis A virus in hepatoma cell cultures. Acta. Virol. <u>29</u>, 482-486 (1985)

Frösner, G.G.:

Züchtung von Hepatitis-A-Virus in Gewebekultur: Möglichkeit zur Virusproduktion für Impfstoffe und Testzwecke, zur Untersuchung von Patienten auf Infektiosität und zur Prüfung von Desinfektionsmitteln.

Öff. Gesundh.-Wes. 44, 370-373 (1982)

Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M. and Schwartzbrod, L.:

Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages and *Bactero-ides fragilis* phages in treated wastewater. Appl. Environ. Microbiol. <u>64</u>, 4307-4312 (1998)

Gantzer, C., Senouci, S., Maul, A., Levi, Y. and Schwartzbrod, L.:

Enterovirus genomes in wastewater: Concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. J. Virol. Methods 65, 265-271 (1997)

Gärttner, E.:

Zur Bestimmung des Keimgehaltes der Luft in Geflügelställen. Sonderdruck aus Archiv für Geflügelkunde <u>3</u>, 73-79 (1976)

Gebra, C.P. and Rose, J.B.:

Virus in source and drinking water. In: McFeters G.A. (ed.), Drinking water microbiology. Springer-Verlag, New York pp 380-396 (1990)

Gebra, C.P., Wallis, C. and Melnick, J.L.:

Microbiological hazards of houshold toilets: Droplet production and the fate of residual organisms.

Appl. Microbiol. 30, 229-237 (1975)

Gendrel, D., Basse, N., Palmer, P., Marc, E., Taty, R., Ravilly, S., Moulin, F., Raymond, J. and Lebon, P.:

Coincidental outbreaks of rotavirus and respiratory syncytial virus in Paris: A survey from 1993 to 1998.

Arch. Pediatr. 6, 735-739 (1999)

Genthe, B., Idema, G.K., Kfir, R. and Grabow, W.O.K.:

Detection of rotavirus in South African waters: A comparison of a cytoimmunolabelling technique with commercially available immunoassays. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 241-244 (1991)

Gilgen, M., Germann, D., Lüthy, J. and Hübner, Ph.:

Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round strutured viruses in water samples. Int. J. Food Microbiol. <u>37</u>, 189-199 (1997)

Gligic, A., Dimkovic, N., Xiao, S.-Y., Buckle, G.J., Jovanovic, D., Velimirovic, D., Stojanovic, R., Obradovic, M., Diglistic, G., Micic, J., Asher, D.M., LeDuc, J.W., Yanagihara, R. and Gajdusek, D.C.:

Belgrade virus: A new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia.

J. Infec. Dis. <u>166</u>, 113-120 (1992)

Gligic, A., Frusic, M., Obradovic, M., Stojanovic, R., Hlaca, D., Gibbs, Jr. C. J., Yanagihara, R., Calisher, C. H. and Gajdusek, D. C.:

Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: Antigenetic characterization of hantaviruses isolated from *apodemus flavicollis* and *clethrionomys glareolus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. <u>41</u>, 109-115 (1989)

Gloster, J., Sellers, R.F. and Donaldson, A.I.:

Long distance transport of foot-and-mouth disesase virus over the sea. Vet. Rec. <u>110</u>, 47-52 (1982)

Gomes, S.A., Yoshida, C.F.T. and Niel, C.:

Detection of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-negative serum by polymerase chain reaction: Evaluation of different primer pairs and conditions. Acta Virologica <u>40</u>, 133-138 (1996)

Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B. and Fang, Z.-Y.:

Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.

J. Clin. Microbiol. <u>28</u>, 276-282 (1990)

Grabow, W.O.K., Botma, K.L., DeVilliers, J.C., Clay, C.G. and Erasmus, B.:

Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polio-virus in wastewater.

Bulletin of WHO, 77 (12), 973-979 (1999)

Graff, J., Ticehurst, J. and Flehmig, B.:

Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3165-3170 (1993)

Grankvist, O., Juto, P., Settergren, B., Ahlm, C., Bjermer, L., Linderholm, M., Tärnvik, A. and Wadell, G.:

Detection of nephropathia epidemica virus RNA in patient samples using a nested primerbased polymerase chain reaction. J. Infec. Dis. 156, 934-937 (1992)

Gust, I.D., Coulepis, A.G., Feinstone, S.M., Locarnini, S.A., Moritsugu, Y., Najera, R. and Siegl, G.:

Taxonomic classification of hepatitis A virus. Intervirol. 20, 1-7 (1983)

Guttman-Bass, N., Tchorsh, Y. and Marva, E.:

Comparison of methods for rotavirus detection in water and results of a survey of Jerusalem wastewater.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 761-767 (1987)

Häflinger, D., Gilgen, Lüthy, J. and Hübner, Ph.:

Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteritic viruses in seafood. Int. J. Food Microbiol. 37, 27-36 (1997)

Haikala, O.J., Kokkonen, J.O., Leinonen, M.K., Nurmi, T., Mäntyjärvi, R. and Sarkkinen, H.K.:

Rapid detection of rotavirus in stool by latex agglutination: Comparison with radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. J. Med. Virol. 11, 91-97 (1983)

Hammond, G.W., Raddatz, R.L. and Gelskey, D.E.:

Impact of atmospheric dispersion and transport of viral aerosols on the epidemiology of influenza. Rev. Infect. Dis. 11, 494-497 (1989)

Hamparian, V.V., Ottolenghi, A.C. and Hughes, J.H.:

Enteroviruses in sludge: Multiyear experience with four wastewater treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 50, 280-286 (1985)

Hänel, A.:

Untersuchung zur Abscheidung luftgetragener Viren mit dem Zentrifugalsammler nach Schiff (KSF):

Vet. med. Diss., München (1987)

Hankins, W. and Hearn, H.J.:

Direct assessment of viral aerosols on cell cultures. Appl. Microbiol. <u>20</u>, 284-285 (1970)

Hankins, W. and Hearn, H.J.:

Direct assessment of viral aerosols on cellcultures. Appl. Microbiol. <u>20</u>, 284-285 (1970)

Hanson, R.P., Sulkin, S.E., Buescher, E.L., Hammon, W.McD., McKinney, R.W. and Work, T.H.:

Arbovirus infektions of laboratory workers. Science <u>158</u>, 1283-1286 (1967)

Hawkins, A.E., Gilson, R.J.C., Bickerton, E.A., Tedder, R.S. and Weller, I.V.D.:

Conservation of precore and core sequences of hepatitis B virus in chronic viral carriers. J. Med. Virol. <u>43</u>, 5-12 (1994)

Heermann, K.-H., Gerlich, W.H., Chudy, M., Schaefer, S. and Thomssen, R., The Eurohep Group:

Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations.

J. Clin. Microbiol. 37, 68-73 (1999)

Herzog, R.:

Ultrazentrifugation: Grundlagen und Anwendung. Sonderdruck aus CLB Chemie für Labor und Betrieb, Heft 3 u. 5 (1986)

Hjelle, B.:

Outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in the United States: Detection of four corners virus by PCR.

In: Becker, Y., Darai, G.: PCR: Protocols for diagnosis of human and animal virus diseases. pp. 403-407, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1995)

Ho, M.-S., Monroe, S.S., Stine, S., Cubitt, D., Glass, R.I., Madore, H.P., Pinsky, P.F. and Ashley, C.:

Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. Lancet <u>21</u>, 961-964 (1989)

Hörling, J., Chizhikov, V., Lundkvist, Å., Jonsson, M., Ivanov, L., Dekonenko, A., Niklasson, B., Dzagurova, T., Peters, C.J., Tkachenko, E. and Nichol, S.:

Khabarovsk virus: A phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *microtus fortis* trapped in far-east Russia. J. Gen. Virol. 77, 687-694 (1996)

Hörling, J., Lundkvist, Å., Persson, K., Mullqaart, M., Dzagurova, T., Dekonenko, A., Tkachenko, E. and Niklasson, B.:

Detection and subsequencing of puumala virus from human specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. <u>33</u>, 277-282 (1995)

Horzinek, M.:

Untersuchung zum Schnellnachweis eines Arbo-A-Virus (Sindbis) in der Luft. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. Tübingen, Forschungsauftrag (1972)

Hübschle, O.J.B.:

Optimierung der Probenahme von hochinfektiösen Virusaerosolen. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. Tübingen, Forschungsauftrag (1980)

Hugh-Jones, M., Allan, W.H., Dark, F.A. and Harper, G.J.:

The evidence for the airborne spread of newcastle disease. J. Hyg. Camb. <u>71</u>, 325-339 (1973)

Hurst, C.J.:

Fate of viruses during wastewater sludge treatment processes. CRC Critical Review in Environ. Control 18, 317-343 (1989)

Hyslop, N.S.:

Factors influencing the epidemiology and epizootiology of airborne diseases. J. Am. Vet. Med. Assoc. <u>159</u>, 1500-1507 (1971)

Ibelgaufts, H.:

Gentechnologie von A bis Z. Studienausg., VCH New York Basel Cambridge (1990)

Ijaz, M.K., Karim, Y.G., Sattar, S.A. and Johnson-Lussenburg, C.M.:

Development of methods to study survival of airborne viruses. J. Virol. Meth. <u>18</u>, 87-106 (1987)

Ijaz, M.K., Satter, S.A., Alkarmi, T., Dar, F.K., Bhatti, A.R. and Elhag, K.M.:

Studies of the survival of aerosolized bovine rotavirus (UK) and a murine rotavirus. Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis. <u>17</u>, 91-98 (1994)

Jansen, R.W., Newbold, J.E. and Lemon, S.M.:

Combined immunoaffinity cDNA-RNA hybridization assay for detection of hepatitis A virus in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. <u>22</u>, 984-989 (1985)

Jarnych, V.S.: Aerosole in der Veterinärmedizin. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1976)

Jaschhof, H., Finke, E.-J. und Herrmann, B.:

Nachweis von Influenza A (H3N2) in der Raumluft einer Kinderpoliklinik Greifswalds durch Abscheidung des Virus über lösliche Gelatineschaumfilter. Jahrestagung Gesellschaft für Virol., Potsdam 19. bis 23. März 1991. Programm und Kurzfassung P 179

Jaschhof, H.:

Sammlung von Virusaerosolen mit dem Gelatinefilter. Einfluß des Herstellungsalters auf die Sammeleffektivität und Stabilität von Virus-Aerosolpartikeln nach Filtersammlung und Lagerung.

Sonderdruck aus BioTec Microbiol. 1/93, Publikation No.: FM-8034-d93021

Jensen, M.M.:

Inactivation of airborne virus by UV irridation. Appl. Environ. Microbiol. <u>12</u>, 418-420 (1964)

Jiang, S., Estes, M.K., Metcalf, T.G. and Melnick, J.L.:

Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization with cDNA probes.

Appl. Environ. Microbiol. <u>52</u>, 711-717 (1986)

Johl, M., Kerkmann, M.-L., Kramer, U. and Walter, R.:

Virological investigation of the river Elbe. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 205-208 (1991)

Jothikumar, N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S. and Khanna, P.:

Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction.

Appl. Environ. Microbiol. <u>59</u>, 2558-2562 (1993)

Jurinke, C., Zöllner, B., Feucht, H.-H., Jacob, A., Kirchhübel, J., Lüchow, A., van den Boom, D., Laufs, R. and Köster, H.:

Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass spectrometry.

Genet. Anal. 13, 67-71 (1996)

Kaaden, O.-R.:

Luft als Vektor viraler Krankheitserreger. Tierärztl. Umsch. <u>40</u>, 4-8 (1985)

Kaerber, G.:

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Pathol. Pharmakol. <u>162</u>, 480 (1931)

Kämmerer, U., Kunkel, B. and Korn, K.:

Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses. J. Clin. Microbiol. <u>32</u>, 285-291 (1994)

Kaneko, S., Feinstone, S.M. and Miller, R.H.:

Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J. Clin. Microbiol <u>27</u>, 1930-1933 (1989)

Kariwa, H., Kamimura, M., Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Takashima, I. and Hashimoto, N.:

Characterization of the mode of hantaan virus infection in adult mice using a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction: Transient virus replication in adult mice. Microbiol. Immunol. $\underline{39}$ (1), 35-41 (1995)

Kessler, H.H.:

Qualitative detection of herpes simplex virus DNA on the LightCycler. Reprints from rapid cycle real-time PCR. Methods and applications. Springer Verlag (2000)

Keum, W.K., Park, C.E., Lee, J.H., Khil, L.-Y., Kang, I., Kim, S.S., Jung, J.C., Oh, S.M., Woo, H.J., Lee, J.H., Kim, Y.C., Yoon, Y., Choi, J.W. and Ha, J.:

Primers determine the sensitivity of PCR-mediated hepatitis B virus DNA detection and pretreatment of PCR mixture with 8-methoxypsoralen eliminates false-positive results. Mol. Cells <u>7</u> (2), 244-250 (1997)

Khan, G., Kangro, H.O., Coates, P.J. and Heath, R.B.:

Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. J. Clin. Pathol. <u>44</u>, 360-365 (1991)

Kim, E.C., Kim, I.S., Choi, Y., Kim, S.G. and Lee, J.S.:

Rapid differentiation between hantaan and seoul viruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Med. Virol.43, 245-248 (1994)

Knutsson, M. and Kidd-Ljunggren, K.:

Urine from chronic hepatitis B virus carriers: Implication for infectivity. J. Med. Virol. <u>60</u>, 17-20 (2000)

Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J. and Lopez-Pila, J.M.:

Detection of naturally occurring enteroviruses in water by reverse transcriptase, polymerase chain reaction and hybridization. Appl. Environ. Microbiol. <u>59</u>, 1213-1219 (1993)

Kramvis, A., Bukofzer, S. and Kew, M.C.:

Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp Blood Kit, GeneReleaser and the phenol-chloroform method. J. Clin. Microbiol. 34, 2731-2733 (1996)

Kulzer, P. und Heidland, A.:

Akutes Nierenversagen durch Hantaviren. Ther. Umsch. <u>51</u>, 824-831 (1994)

LeClair, J.M., Levin, M. and Congdon, R.G.:

Airborne transmission of chickenpox in a hospital. N. Engl. J. Med. <u>302</u>, 450-453 (1980)

Lee, H.W., Lee, P.W. and Johnson, K.M.:

Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J. Infec. Dis. <u>137</u>, 298-308 (1978)

LeGuyader, F.L.E., Duboris, E., Menard, D. and Pommepuy, M.:

Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3665-3671 (1994)

Leisinger, M. and Metzler, A.:

Use of silicea as a carrier to recover and prepare waterborne enteritic viruses for detection by RT-PCR.

Zbl. Hyg. 200, 283-296 (1997)

Lerman, Y., Chodik, G., Aloni, H., Ribak, J. and Ashkenazi, S.:

Occupations at increased risk of hepatitis A: A 2-year nationwide historical prospective study. Am. J. Epidemiol. <u>150</u>, 312-320 (1999)

Levin, M., Froom, P., Trajber, I., Lahat, N., Askenazi, S. and Lerman, Y.:

Risk of hepatitis A virus infection among sewage workers in Israel. Arch. Environ. Health 55, 7-10 (2000)

Lewis, G.D. and Metcalf. T.G.:

Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1938-1988 (1988)

Lo, Y.-M. D., Lo, E. S.-F., Mehal, W.Z., Sampietro, M., Fiorelli, G., Ronchi, G., Tse, C.H. and Fleming, K.A.:

Geographical variation in prevalence of hepatitis B virus DNA in HbsAg negative patients. J. Clin. Pathol. 46, 304-308 (1993)

Lucotte, G., Galzot, P., Lu, C.Y., Bathelier, C. and Chapenois, T.:

Detection of serum hepatitis B virus using nested polymerase chain reaction assay. Mol. Cell. Probes. 8, 437-440 (1994)

Mack, H., Wekerle, J. und Strauch, D.:

Vorläufige Mitteilung über die Isolierung von Aujeszky. Virus aus Fest- und Flüssigmist von Schweinen sowie aus Stalluft. Tierärztl. Umsch. 41, 32-38 (1986)

Marshall, E. and Stone, R.:

Race to grow hantavirus ends in tie. Science 262, 1509 (1993)

Matsumoto, C., Nishioka, K., Oguchi, T., Mitsunaga, S., Nojiri, N., Tadokoro, K. and Juji, T.:

Detection and quantitation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: Comparison with HBV serological markers. J. Virol. Methods. 66, 61-69 (1997)

May, K.R. and Druett, H.A.:

The pre-impinger: A selective aerosol sampler. Brit. J. Industr. Med. 10, 142-151 (1953)

May, K.R.:

Multistage liquid impinger. Bact. Rev. <u>30</u>, 559-70 (1966)

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und Wittmann, G.:

Virologische Arbeitsmethoden, Band II, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1977)

McGarrity, G.J. and Dion, A.S.:

Detection of airborne polyoma virus. J. Hyg. Camb. <u>81</u>, 9-13 (1978)

McGregor, A., Kornitschuk, M., Hurrell, J.G.R., Lehmann, N.I., Coulepis, A.G., Locarnini, S.A. and Gust, I.D.:

Monoclonal antibodies against hepatitis A virus. J. Clin. Microbiol. <u>18</u>, 1237-1243 (1983)

Melnick, J.L.:

Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. Intervirol. 18, 105-106 (1982)

Menkhaus, N.A., Lanphear, B. and Linnemann, C.C.:

Airborne transmission of varicella-zoster virus in hospitals. Lancet <u>336</u>, 1315 (1990)

Mignotte, B., Maul, A. and Schwartzbrod, L.:

Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. J. Virol. Methods. <u>78</u>, 71-80 (1999)

Minor, P.D.:

Picornaviridae, in classification and nomenclature of viruses. (Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses) Arch. Virol. (Suppl. 2), 320-326 (1991)

Modrow, S. und Falke, D.:

Molekulare Virologie. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg (1997)

Mohr, A.J.:

Fate and transport of microorganisms in air. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V.: Manual of environmental microbiology. pp. 641-650, ASM Press, Washington, D.C. (1997)

Moore, B., Cartwright, R.Y., Bisson, P.G., Tratt, J., Tyrrell, D.A.J., Dark, F.A., Harper, G.J., Hutcuison, J.G.P., Robertson, M.J., Flewett, T.H., Jones, D.M., Tobin, B.M. and Harlow, G.R.:

Experimental studies on environmental contamination with infected blood during haemodialysis.

J. Hyg. Camb. 74, 133-148 (1975)

Moore, B.E., Sagik, B.P. and Sorber, C.A.:

Procedure for the recovery of airborne human enteritic viruses during spray irrigation of treated wastewater.

Appl. Environ. Microbiol. 38, 688-693 (1979)

Mulders, M.N., Koopmans, M.P.G., van der Avoort, H.G.A.M. and van Loon, A.M.:

Detection and characterization of poliovirus-The molecular approach. In: Becker, Y., Darai, G.: PCR: Protocols for diagnosis of human and animal virus diseases. pp. 137-156, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1995)

Nairn, C. and Clements, G.B.:

A study of enterovirus isolations in Glasgow from 1977-1997. J. Med. Virol. <u>58</u>, 304-312 (1999)

Neef, A., Amann, R. and Schleifer, K.-H.:

Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. System. Appl. Microbiol. 18, 113-122 (1995)

Parashar, U.D., Bresee, J.S., Gentsch, J.R. and Glass, R.I.:

Rotavirus. Emerg. Infec. Dis. 4, 561-570 (1998)

Paul, J.R. and Trask, J.D.:

The virus of poliomyelitis in stools and sewage. J. Am. Med. Assoc. <u>116</u>, 493-497 (1941)

Pfirrmann, A. und vanden Bossche, G.:

Vorkommen und Isolierung von humanen Enteroviren aus der Luft von Abfallbeseitigungsund verwertungsanlagen. Zbl. Hyg. 196, 38-51 (1994)

Pfirrmann, A.:

Untersuchung zum Vorkommen von luftgetragenen Viren an Arbeitsplätzen in der Müllentsorgung und -verwertung. Agr. Diss., Hohenheim (1994)

Philipp, R., Pond, K. and Rees, G.:

Research and the problems of litter and medical wastes on the UK coastline. Br. J. Clin. Pract. <u>51</u>, 146-148 (1997)

Pilaski, J., Ellerich, C., Kreutzer, T., Benik, W., Lewandowski, B., Lang, A., Autenrith, I.B. und Vanek, E.:

Endemisches Vorkommen des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS) in der Bundesrepublik Deutschland. Z. ärztl. Fortbild. 85, 869-874 (1991)

Pina, S., Puig, M., Lucenda, F., Jofre, J. and Girones, R.:

Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses.

Appl. Environ. Microbiol. <u>64</u>, 3376-3382 (1998)

Powell, H.A., Gooding, C.M., Garrett, S.D., Lund, B.M. and McKee, R.A.:

Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milke using the polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 18, 59-61 (1994)

Pozo, F., Casas, I., Tenorio, A., Trallero, G. and Echevarria, J.M.:

Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. J. Clin. Microbiol. <u>36</u>, 1741-1745 (1998)

Preston, D.R., Bitton, G. and Farrah, S.R.:

Enhancement of enterovirus infectivity in vitro by pretreating host cell monolayers with the cationic polymer polyethyleneimine. Appl. Environ. Microbiol. <u>56</u>, 295-297 (1990)

Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. and Girones, R.:

Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. Appl. Environ. Microbiol. <u>60</u>, 2963-2970 (1994)

Puthavanthana, P., Dobbs, M., Baek, L.-J., Chu, Y.-K., Lee, H.W. and Kang, C.Y.:

Comparison of nucleotide sequences among hantaviruses belonging to the same serotype: An analysis of amplified DNA by thermal cycle sequencing. Virus Reserch <u>30</u>, 161-169 (1993)

Puthavathana, P., Lee, H.W. and Kang, C.Y.:

Typing of hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. Virus Research <u>26</u>, 1-14 (1992)

Rabey, F., Janssen, R.J. and Kelley, L.M.:

Stability of st. louis encephalitis virus in the airborne state. Appl. Microbiol. 18, 880-882 (1969)

Repp, R., Rhiel, S., Heermann, K.H., Schaefer, S., Keller, C., Ndumbe, P., Lampert, F. and Gerlich, W.H.:

Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission.

J. Clin. Microbiol. <u>31</u>, 1095-1102 (1993)

Reynolds, K.A., Roll, K., Fujioka, R.S., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.:

Incidence of enteroviruses in Mamala Bay, Hawaii using cell cultur and direct polymerase chain reaction methodologies.

Can. J. Microbiol. 44, 598-606 (1998)

Rief-Brenner, **R**.:

Untersuchungen zur Virusabscheidenden Wirkungen eines neuartigen Luftkeimsammlers. Vet. med. Diss., Gießen (1986)

Robertson, B.H.:

PCR for the detection of hepatitis A virus. In: Becker, Y., Darai, G.: PCR: Protocols for diagnosis of human and animal virus diseases. pp. 61-69, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1995)

Rolle, M. und Mayr, A.:

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuugart (1993)

Rollin, P.E., Bowen, M.D., Kariwa, H., Saluzzo, J-F., Guerard, S., Flechaire, A., Coudrier, D., Sureau, P., Peters, C.J. and Nichol, S.T.:

Short report: Isolation and partial characterization of a puumala virus from a human case of nephropathia epidemica in France. Am. J. Trop. Med. Hyg. <u>52</u> (6), 577-578 (1995)

Romero, J.R., Chapman, N.M., Rotbart, H.A. and Tracy, S.M.:

Polymerase chain reaction detection of the human enteroviruses. In: Becker, Y., Darai, G.: PCR: Protocols for diagnosis of human and animal virus diseases. pp. 157-165, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1995)

Rose, J.B., Gebra, C.P., Singh, N.S., Toranzos, G.A. and Keswick, B.:

Isolating viruses from finished water. J. Am. Water Works Assoc. 78, 56-61 (1986)

Rueckert, R.R.:

Picornaviridae and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. et al.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York (1990)

Salano, R. and Copello, F.:

An epidemiological study of a group of workers employed in the maintenance of a sewer network and of urban waste water treatment plants. Med. Lav. <u>89</u>, 393-403 (1998)

Sankary, T.M., Yang, G., Romeo, J.M., Ulrich, P.P., Busch, M.P., Rawal, B.D. and Vyas, G.N.:

Rare detection of hepatitis B and hepatitis C virus genomes by polymerase chain reaction in seronegative donors with elevated alanine aminotransferase. Transfus. <u>34</u>, 656-660 (1994)

Sattar, S.A., Ijaz, M.K., Johnson-Lussenburg, C.M. and Springthorpe, V.S.: Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. Appl. Environ. Microbiol. <u>47</u>, 879-881 (1984)

Sattar, S.A. and Ijaz, M.K.:

Airborne viruses. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V.: Manual of environmental microbiology. pp. 682-692, ASM Press, Washington, D.C. (1997)

Sawyer, M.H.:

Enterovirus infections: Diagnosis and treatment. Pediatr. Infect. Dis. J. <u>18</u>, 1033-1040, (1999)

Schmidt, B.:

Bakteriologische Untersuchungen zur Keimemission an Arbeitsplätzen in der Müllentsorgung und -verwertung. Agr. Diss., Hohenheim (1994)

Schmidt, N.J., Ho, H.H., Riggs, J.L. and Lennette, E.H.:

Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 36, 480-486 (1978)

Schmitz, H.:

Auf den Menschen übertragbare virale Zoonosen in den Tropen-Geschichte, Bedeutung und Bekämpfung. In: 6. Hohenheimer Seminar: Vorbeugemaßnahmen bei der Zoonosenbekämpfung.

Verlag der vet. med. Gesellschaft e.V., Giessen (1996)

Schubert, U., Metzler, B. und Braun, B.:

Hantanephritis: Endemisch im Kreis Reutlingen. Z. ärztl. Fortbild. <u>85</u>, 1107-1109 (1991)

Schwab, K.J., DeLeon, R., Baric, R.S. and Sobsey, M.D.:

Detection of rotaviruses, enteroviruses and hepatitis A virus by reverse transcriptasepolymerase chain reaction. In: Proceeding of water quality technol. conference, Orlando, Fla., Nov. 10-14, pp. 475-491, Am. Water Works Assoc., Denver, Colo., (1991)

Schwab, K.J., DeLeon, R. and Sobsey, M.D.:

Development of PCR methods for enteritic virus detection in water. Water Sci. Technol. <u>27</u>, 211-218 (1993)

Schweiger, B., Schreier, E., Böthig, B. and Lopez-Pila, J.M.:

Differentiation of vaccine and wild-type polioviruses using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Arch. Virol. 134, 39-50 (1994)

Sellers, R.F. and Gloster, J.:

The Northumberland epidemic of foot-and-mouth disease, 1966. J. Hyg. Camb. <u>85</u>, 129-140 (1980)

Sellers, R.F. and Herniman, K.A.J.:

The airborne excretion by pigs of swine vesicular disease virus. J. Hyg. Camb. <u>72</u>, 61-65 (1974)

Sellers, R.F. and Herniman, K.A.J.:

The effects of spraying on the amounts of airborne foot-and-mouth disease virus present in loose-boxes. J. Hyg. Camb. 70, 551-556 (1972)

Sellers, R.F. and Parker, J.:

Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. J. Hyg. Camb. <u>67</u>, 671-677 (1969)

Sellwood, J., Shore, J., Read, S. and Wyn-Jones, P.:

The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction to investigate environmental samples for the presence of enteroviruses. Commun. Dis. Public Health, <u>1</u>, 58-60 (1998)

Settnisch, B., Härtel, I. und Schadwinkel, W.:

Virusnachweis aus Luft in der Umgebung einer Abwasserreinigungsanlage. Zbl. ges. Hyg. <u>28</u>, 7-9 (1982)

Shieh, Y.-S. C., Baric, R.S., Sobsey, M.D., Ticehurst, J., Miele, T.A., DeLeon, R. and Walter, R.:

Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in water by ssRNA probes. J. Virol. Meth. <u>31</u>, 119-136 (1991)

Shieh, Y.-S. C., Baric, R.S. and Sobsey, M.D.:

Detection of low levels of enteritic viruses in metropolitan and airplane sewage. Appl. Environ. Microbiol. <u>63</u>, 4401-4407 (1997)

Shipe, E.L., Tyler, M.E. and Chapman, D.N.:

Bacterial aerosol samplers. II. Developement and evaluation of the shipe sampler. Appl. Microbiol. <u>7</u>, 349-354 (1959)

Slonova, R.A., Tkachenko, E.A., Kushnarev, E.L., Dzagurova, T.K. and Astakova, T.I.:

Hantavirus isolation from birds. Acta. Virol. 36, 493 (1992)

Smith, E.M. and Gerba, C.P.:

Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. Appl. Environ. Microbiol. <u>43</u>, 1440-1450 (1982)

Snowdon, J.A., Cliver, D.O. and Converse, J.C.:

Land disposal of mixed human and animal wastes: a review. Waste Management & Res. 7, 121-134 (1989)

Sobsey, M.D.:

Methods for detection enteritic viruses in water and wastewater. In: Berg, G., Bodily, H.L., Lennette, E.H., Melnick, J.L., Metcalf, T.G.: Viruses in water. pp. 89-138, Amer. Public Hlth. Assoc., Washington, D.C. (1986)

Song, G., Huang, Y.-C., Hang, C.-S., Hao, F.-Y., Li, D.-X., Zheng, X.-L., Liu, W.-M., Li, S.-L., Huo, Z.-W., Huei, L.-J. and Zhang, Q.-F.:

Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Vaccine <u>10</u>, 214-216 (1992)

Spaerman, C.:

The method of "right or wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit. J. Psychol. <u>2</u>, 227 (1908)

Spendlove, J.C. and Fannin, K.F.:

Methods of characterization of virus aerosols. In: Gerba, C.P., Goyal, S.M.: Methods in environmental virology. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel (1982)

Stetzenbach, L.D.:

Introduction to Aerobiology. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V.: Manual of environmental microbiology. pp. 619-628, ASM Press, Washington, D.C. (1997)

Stolze, B. and Kaaden, O.-R.:

Efficient medium for impingement and storage of enveloped viruses. J. Vet. Med. <u>36</u>, 161-167 (1989)

Strappe, P.:

Rotavirus detection–a problem that needs concentration. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 221-223 (1991)

Straub T.M., Pepper, I.L. and Gebra, C.P.:

Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol.<u>40</u>, 884-888 (1994a)

Straub, T.M., Pepper, I.L., Abbaszadegan, M. and Gebra, C.P.:

A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using PCR. Appl. Environ. Microbiol. <u>60</u>, 1014-1017 (1994b)

Straub, T.M., Pepper, I.L. and Gebra, C.P.:

Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soils and determination of their transport. Appl. Environ. Microbiol. <u>61</u>, 2066-2068 (1995)

Straub, T.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P.:

Persistence of virus in desert soils amended with anaerobically digested sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. <u>58</u>, 636-641 (1992)

Strikas, R.A., Anderson, L.J. and Parker, R.A.:

Temporal and geografic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. J. Infec. Dis. 153, 346-351 (1986)

Svennerholm, B., Vahlne, A., Jeansson, S., Lunden, R., Olofsson, S., Svantesson, G. and Lycke, E.:

Separation of herpes simplex virus virions and nucleocapsids on Percoll gradients. J. Virol. Methods <u>1</u>, 303-309 (1980)

Swyer, L.A., Murphy, J.J., Kaplan, J.E., Pinsky, P.F., Chacon, D., Walmsley, S., Schonberger, L.B., Phillips, A., Forward, K., Goldman, C., Brunton, J., Fralick, R.A., Carter, A.O., Gary, W.G., Glass, R.I. and Low, D.E.:

25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission.

Am. J. Epidemiolo. 127 (6) 1261-1271 (1988)

Tantivanich, S., Ayuthaya, P.I.N., Usawattanakul, W. and Imphand, P.:

Hantaanvirus among urban rats from a slum area in Bangkok. <u>23</u>, 504-509 (1992)

Teltsch, B. and Katzenelson, E.:

Airborne enteritic bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. Appl. Environ. Microbiol. <u>35</u>, 290-296 (1978)

Teltsch, B., Kedmi, S., Bonnet, L., Borenzstajn-Rotem, Y. and Katzenelson, E.:

Isolation and identification of pathogenic microorganisms at wastewater-irrigated fields: Ratios in air and wastewater.

Appl. Environ. Microbiol. <u>39</u>, 1183-1190 (1980)

Tennstedt, C., Wünschmann, S., Schmitz, H. und Schreiber, M.:

Pathologisch-anatomische Befunde nach serologisch und molekularbiologisch nachgewiesener Hantaan-virus-Infektion. Zentralbl. Pathol. 140, 173-180 (1994)

Thomas, G.:

An adhesive surface sampling technique for airborne viruses. J. Hyg. Camb. <u>68</u>, 273-282 (1970)

Thorne, P.S., Kiekhaefer, M.S., Whitten, P. and Donham, K.J.:

Comparison of bioaerosols sampling methods in barns housing swine. Appl. Environ. Microbiol. <u>58</u> (8), 2543-2551 (1992)

Ticehurst, J.:

Hepatitis A virus: Clones, cultures, and vaccines. Semin. Liver Dis. <u>6</u>, 46-55 (1986)

Ticehurst, J.R., Feinstone, S.M., Chestnut, T., Tassopoulos, N.C., Popper, H. and Purcell, R.H.:

Detection of hepatitis A virus by extraction of viral RNA and molecular hybridization. J. Clin.. Microbiol. <u>25</u>, 1822-1829 (1987)

Toranzos, G.A. and Alvarez, A.J.:

Solid-phase polymerase chain reaction: application for detection of enteritic pathogens in waters.

Can. J. Microbiol. <u>38</u>, 365-369 (1992)

Tougianidou, D. und Botzenhart.:

Vorkommen und Nachweis von Viren in Trinkwasser. Immun. Infek. <u>21</u>, 122-125 (1993)

Tsai, Y.-L., Tran, B., Sangermano, L.R. and Palmer, C.J.:

Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. App. Environ. Microbiol. <u>60</u>, 2400-2407 (1994)

Tyler, M.E. and Shipe, E.L.:

Bacterial aerosol samplers. I. Developement and evaluation of the all-glass impinger. Appl. Microbiol. <u>7</u>, 337-349 (1959)

Ulrich, P.P., Bhat, R.A., Seto, B., Mack, D., Sninsky, J. and Vyas, G.N.:

Enzymatic amplification of hepatitis B virus DNA in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. J. Infec. Dis. 160, 37-43 (1989)

Valdezate, S., Mesa, F. and Otero, J.R.:

Meningitis caused by enterovirus in a pediatric hospital: Experience in 1996. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. <u>16:3</u>, 135-137 (1998)

Van der Meyden, C.H., Erasmus, B.J., Swanepoel, R. and Prozesky, O.W.:

Encephalitis and chorioretinitis associated with neurotropic African horsesickness virus infection in laboratory workers. S. Afr. Med. J. <u>81</u>, 451-454 (1992)

Van Olphen, M., DeBruin, H.A.M., Havelaar, A.H. and Schijven, J.F.:

The virological quality of recreational waters in the Netherlands. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 209-212 (1991)

Vandenvelde, C., Scheen, R., Defoor, M., Duys, M., Dumon, J. and Van Beers, D.:

Suppression of the inhibitory effect of denatured albumin on the polymerase chain reaction by sodium octanoate: application to routine clinical detection of hepatitis B virus at its infectivity threshold in serum.

J Virol. Methods. <u>42</u>, 251-264 (1993)

Wallis, C., Melnick, J.L., Rao, V.C. and Sox, T.E.:

Method for detecting viruses in aerosols. Appl. Environ. Microbiol. 50, 1181-1186 (1985)

Walter, R.:

Allgemeine Grundlagen der Umweltvirologie. In: Walter, R.: Umweltvirologie-Viren in Wasser und Boden. pp. 1-39, Springer Verlag Wien, NewYork (2000)

Ward, R.L., Bernstein, D.I. and Young E.C.:

Human rotavirus studies in volunteers of infectious dose and serological response to infection. J. Infec. Dis. <u>154</u>, 871-877 (1986)

Warlen, A.A. and Hoff, G.L.:

Hepatitis A in waste water treatment plant workers: Is vaccination necessary? (letter). J. Occup. Environ. Med. <u>40</u> (6), 515-517 (1998)

Warren, J.C., Akers, T.G. and Dubovi, E.J.:

Effect of prehumidification on sampling of selected airborne viruses. Appl. Microbiol. <u>18</u>, 893-896 (1969)

Wilde, J., Eiden, J. and Yolken, R.:

Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. J. Clinical Microbiol. <u>28</u>, 1300-1307 (1990)

Wilkinson, P.J., Donaldson, A.I., Greig, A. and Bruce, W.:

Transmission studies with african swine fever virus. Infections of pigs by airborne virus. J. Comp. Path. <u>87</u>, 487-495 (1977)

Williams, F.P., Jr. and Hurst, C.J.:

Detection of environmental viruses in sludge: enhancement of enterovirus plaque assay titers with 5-iodo-2'-desoxyuridine and comparison to adenovirus and coliphage titers. Water Res. <u>22</u>, 847 (1988)

Williams, J.F.:

Optimization strategies for the polymerase chain reaction. BioTec. <u>7</u>, 762-768 (1989)

Wilson, I.G.:

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. <u>63</u>, 3741-3751 (1997)

Wyatt, R.G., James, Jr. D.J., Pittman, A.L., Hoshino, Y., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Flores, J. and Kapikian, A.Z.:

Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and thein characterization into four sero-types.

J. Clin. Microbiol. <u>18</u>, 310-317 (1983)

Xiao, S.-Y., Chu, Y.-K., Knauert, F.K., Lofts, R., Dalrymple, J.M. and LeDuc, J.W.: Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction.

J. Gen. Virol. <u>73</u>, 567-573 (1992)

Xiao, S.-Y., Yanagihara, R., Godec, M.S., Eldadah, Z.A., Johnson, B.K., Gajdusek, D.C. and Asher, D.M.:

Detection of hantavirus RNA in tissues of experimentally infected mice using reversetranscriptase-directed polymerase chain reaction. J. Med. Virol. <u>33</u>, 277-282 (1991)

Yano, K., Yoshida, Y. and Kaneko, M.:

Improvement of the zeta-plus filter method for concentration of viruses from water. Wat. Sci. Tech. <u>24</u>, 217-220 (1991)

Zimmermann, K. and Mannhalter, J.W.:

Technical aspects of quantitative competitive PCR. BioTech. <u>21</u>, 268-279 (1996)

Zöller, L. und Zeier, M.:

Serologische Diagnostik der Hantavirus-Infektion. Dtsch. med. Wschr. <u>115</u>, 1674-1677 (1990)

9 Anhang

9.1 Rezepte der verwendeten Lösungen

Alle Standardchemikalien wurden von der Firma Merck, D-64271 Darmstadt bezogen

 Versen-Trypsin-Lösung (pH-Wert: 7,0) 	
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
$Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$	23,1 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1 g
$CaCl_2 \ge 2 H_2O$	1,32 g
Trypsin 1:250 ¹⁴³	12,5 g
Versen (Titriplex III) ¹⁴⁴	12,5 g
Streptomycin Sulfat ¹⁴⁵	0,5 g
Penicillin G ¹⁴⁶	0,5 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt	
Phosphate-buffered-saline (PBS) (pH-Wert: 7,5)	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
H_2PO_4	0,12 g
$Na_2HPO_4 \ge H_2O$	0,91 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt	
 Trypsin-Stammlösung (Konzentration 10 000 units/ml) 	
Trypsin ¹⁴⁷	50 mg
DMEM	82 ml
Der Ansatz wurde sterilfiltriert ¹⁴⁸ , aliquotiert und bei -20 °C eingefroren	
 Overlaymedium 	
Carboxylmethylcellulose ¹⁴⁹	8 g
DMEM	500 ml
Streptomycin	780 units/ml
Penicillin G	400 units/ml
Amphotericin B	2 µg/ml
Gentamycin	0,2 mg/ml
Carboxylmethylcellulose wurde autoklaviert (121 °C, 15 min.) und mit	DMEM mit Anti-
biotikazusatz unter Rühren über Nacht gelöst	

¹⁴³ Difco, Detroit Michigan 48232-7058 USA, Art. Nr. 0125-15-9

¹⁴⁴ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.08418

¹⁴⁵ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. S-6501

¹⁴⁶ Biochrom, D-12247 Berlin, Art. Nr. A 321-42

¹⁴⁷ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. T-7418

¹⁴⁸ Millex-HV, Porengröße 0,45 µm, Millipore, D-6236 Eschborn, Art. Nr. SLHV 025 LS

¹⁴⁹ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. C-4888

•	Citrat-Phosphat-Puffer (pH-Wert: 5,0) Citronensäure Na ₂ HPO ₄ Aqua dest pH-Wert mit 5 M HCl eingestellt	7,3 g 23,9 g ad 1000 ml
•	AEC gelöst 9-Ethylcarbazol-3-Ylammin 3-Amino-9-Ethylcarbazole 9-Etilcarbazol-3-Ilammina ¹⁵⁰ Ethanol ¹⁵¹	10 mg ad 1 ml
•	AEC-Substrat-Lösung AEC (gelöst) Citrat-Phosphat-Puffer H ₂ O ₂	200 μl 10 ml 30 μl
• De	Starterpuffer Bromphenolblau ¹⁵² Succrose Aqua dest er Puffer wurde aliquotiert (1 ml) und bei -20 °C gelagert.	25 mg 4 g ad 10 ml
∎ Zu	TAE-Puffer (50X) Tris Eisessig Triplex III (EDTA) 0,5 M, pH 8 Aqua dest Im Gebrauch wurde der Puffer einfach angesetzt (40 ml (50X) ad 2 l Aqua	242 g 57 ml 100 ml ad 1000 ml dest)
•	Natriumcitrat-Lösung (0,1 M) Tri-Natriumcitrat (wasserfrei) Aqua dest	2,58 g ad 100 ml
•	GITC-Extraktionspuffer Guanidinthiocyanat ¹⁵³ Natriumcitrat-Lösung N-Lauroylsarcosine ¹⁵⁴ 2-Mercaptoethanol ¹⁵⁵ (0,1 M) Aqua dest	47,28 g 25 ml 0,5 g 0,7 ml ad 100 ml
•	Natriumacetat-Puffer (3 M, pH: 8,3) Natriumacetat (wasserfrei) Aqua dest	24,6 g ad 100 ml

 ¹⁵⁰ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. A-5754
 ¹⁵¹ Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 9065.2

¹⁵² Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 512.1

 ¹⁵³ Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 0017.1
 ¹⁵⁴ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. L-5125
 ¹⁵⁵ Sigma, D-82041 Deisenhofen, Art. Nr. M-3148

DEPC-Wasser

Hierzu wurde Steriles Aqua dest mit 1 % Diethylpyrocarbonat¹⁵⁶ versetzt, bei 37 °C über Nacht geschüttelt, anschließend aliquotiert und autoklaviert.

¹⁵⁶ Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. K 028.1

9.2 Ergebnistabellen zur Bestimmung der Inhibition

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
1	21,83	254730	5,41	-
2	21,82	253094	5,40	-
3	23,57	781257	5,89	-
4	23,78	894407	5,95	-
5	24,33	1274622	6,11	-
6	22,7	446105	5,65	-
7	20,1	83592	4,92	-
8	19,46	55353	4,74	-
9	21,83	254730	5,41	-
10	19,54	58280	4,77	-
11	17,16	12583	4,10	-
12	14,72	2614	3,42	+
13	16,21	6824	3,83	+
14	15,59	4577	3,66	+
15	15,14	3426	3,53	+
16	16,94	10921	4,04	-
17	17,15	12502	4,10	-
18	20,69	122236	5,09	-
19	20,02	79394	4,90	-
20	19,68	63779	4,80	-
21	18,26	25555	4,41	-
22	21,57	215453	5,33	-
23	19,09	43616	4,64	-
24	18,66	33065	4,52	-
25	14,78	2717	3,43	+
26	16,48	8120	3,91	+
27	16,9	10643	4,03	-

Tab. 93: LightCycler-Lauf 1 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	13,32	1061	3,03
Standard 2	10000	16,62	8887	3,95
Standard 3	100000	20,47	106086	5,03

Modellgleichung: $y=1,5526 \ln(x)+2,5033 R^{2}=0,998$

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
28	4,471	521895	5,72	-
29	4,281	238094	5,38	-
30	4,713	1418071	6,15	-
31	4,876	2780339	6,44	-
32	4,963	3982575	6,60	-
33	5,023	5102650	6,71	-
34	4,693	1305632	6,12	-
35	4,293	250193	5,40	-
36	4,598	881868	5,95	-
37	4,578	811944	5,91	-
38	4,814	2152178	6,33	-
39	3,029	1352	3,13	+
40	3,619	15460	4,19	+
41	4,24	201002	5,30	-
42	4,428	436965	5,64	-
43	4,14	132988	5,12	-
44	4,338	301300	5,48	-
45	4,368	341047	5,53	-
46	4,699	1338394	6,13	-
47	4,327	287916	5,46	-
48	4,318	277410	5,44	-
51	4,163	146242	5,17	-
52	4,044	89455	4,95	-
53	4,374	349605	5,54	-

 Tab. 94: LightCycler-Lauf 2 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	2,882	736	2,87
Standard 2	10000	3,662	18465	4,27
Standard 3	100000	3,997	73670	4,87

Modellgleichung: y=0,2419 ln(x)+1,2853 R²=0,9496

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
54	1,777	149	2,17	++
55	2,091	665	2,82	++
56	1,892	258	2,41	++
57	2,161	928	2,97	++
58	2,058	568	2,75	++
59	1,552	51	1,71	++
60	1,958	353	2,55	++
61	2,21	1172	3,07	++
62	1,919	293	2,47	++
63	2,272	1575	3,20	+
64	0,778	1	0,11	++
65	2,186	1046	3,02	++
66	1,458	33	1,51	++
67	2,003	437	2,64	++
68	2,658	9897	4,00	-
69	2,662	10087	4,00	-
70	2,798	19277	4,29	-
71	2,203	1134	3,05	++
72	2,594	7297	3,86	-
73	1,895	262	2,42	++
74	2,243	1372	3,14	+
75	2,184	1036	3,02	++
76	2,27	1560	3,19	+
77	2,544	5751	3,76	+
78	2,623	8378	3,92	-
79	2,128	793	2,90	++
80	2,162	933	2,97	++

Tab. 95: LightCycler-Lauf 3 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	2,228	1277	3,11
Standard 2	10000	2,557	6118	3,79
Standard 3	100000	3,195	127662	5,11

Modellgleichung: y=0,21 ln(x)+0,726 R^2 =0,9671

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
81	2,388	3781	3,58	+
82	2,088	1134	3,05	+
83	2,223	1949	3,29	+
84	2,247	2147	3,33	+
85	2,257	2234	3,35	+
86	1,258	41	1,61	++
87	2,515	6295	3,80	+
88	2,19	1708	3,23	+
89	2,113	1253	3,10	+
90	2,067	1042	3,02	++
91	1,605	163	2,21	++
92	2,046	958	2,98	++
93	1,804	363	2,56	++
94	2,202	1792	3,25	+
95	2,776	17949	4,25	-
96	1,672	213	2,33	++
97	1,996	784	2,89	++
98	2,122	1300	3,11	+
99	2,421	4316	3,64	+
100	2,576	8042	3,91	-
101	2,364	3433	3,54	+
102	2,353	3285	3,52	+
104	1,744	285	2,45	++
105	1,989	762	2,88	++
106	2,31	2764	3,44	+

Tab. 96: LightCycler-Lauf 4 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	2,085	1120	3,05
Standard 2	10000	2,573	7945	3,90
Standard 3	100000	3,232	111955	5,05

Modellgleichung: y=0,2491 ln(x)+0,336 R²=0,9926

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
107	2,527	36846	4,57	-
108	2,521	5154	3,71	-
109	2,592	7228	3,86	-
110	2,975	44780	4,65	-
111	3,103	82376	4,92	-
112	2,853	25049	4,40	-
113	2,652	9618	3,98	-
114	2,769	16791	4,23	-
115	2,467	3986	3,60	-
116	2,661	10040	4,00	-
117	2,281	1644	3,22	-
118	2,266	1530	3,18	+
119	1,77	144	2,16	+
120	1,993	417	2,62	+
121	2,355	2338	3,37	-
122	2,613	7988	3,90	-
123	2,495	4554	3,66	-
124	2,168	960	2,98	+
125	2,312	1905	3,28	-
126	2,717	13108	4,12	-
127	2,332	2096	3,32	-
128	2,587	7058	3,85	-
129	2,43	3342	3,52	-
130	2,401	2911	3,46	-
131	2,423	3232	3,51	-
132	2,282	1652	3,22	-
133	2,487	4384	3,64	-
	-			

Tab. 97: LightCycler-Lauf 5 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	1,699	916	2,96
Standard 2	10000	2,274	11915	4,08
Standard 3	100000	2,731	91566	4,96

Modellgleichung: y=0,2241 ln(x)+0,1707 R²=0,9957

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition	
134	2,5	8980	3,95	-	
135	2,774	29331	4,47	-	
136	2,909	52551	4,72	-	
137	2,464	7687	3,89	-	
138	2,777	29713	4,47	-	
139	2,796	32255	4,51	-	
140	2,65	17167	4,23	-	
141	2,966	67223	4,83	-	
142	2,603	14013	4,15	-	
143	2,474	8026	3,90	-	
144	2,93	57541	4,76	-	
145		kein Fluoreszenzsignal			
146	2,638	16300	4,21	-	
147	2,364	4991	3,70	+	
153	2,638	16300	4,21	-	
154	2,593	13420	4,13	-	
155	2,599	13773	4,14	-	
156	2,676	19208	4,28	-	
157	2,534	10401	4,02	-	
158	2,963	66357	4,82	-	
159	2,015	1105	3,04	++	
160	2,784	30626	4,49	-	

Tab. 98: LightCycler-Lauf 6 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	2,042	1242	3,09
Standard 2	10000	2,424	6467	3,81
Standard 3	100000	3,108	124139	5,09

Modellgleichung: y=0,2315 ln(x)+0,3927 R²=0,9739

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	Inhibition
161	1,834	603	2,78	++
162	1,363	9	0,96	++
163	1,007	0	-0,42	++
164	1,862	774	2,89	+
165	2,078	5299	3,72	+
166	1,52	37	1,57	++
167	1,142	1	0,10	++
168	0,722	0	-1,52	++

Tab.99: LightCycler-Lauf 7 Equines-Rhinovirus

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	1000	1,849	690	2,84
Standard 2	10000	2,232	20881	4,32
Standard 3	100000	2,366	68858	4,84

Modellgleichung: y=0,1123 ln(x)+1,115 R²=0,9282

9.3 Ergebnistabellen zur Quantifizierung der humanen Enteroviren

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml
33	3,333	565	2,75
37	2,067	134	2,13
38	4,903	3358	3,53
51	5,338	5503	3,74

 Tab. 100:
 LightCycler-Lauf 2 humane Enteroviren

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	100	1,4	63	1,80
Standard 2	1000	4,655	2534	3,40
Standard 3	10000	5,455	6285	3,80

Modellgleichung: y=0,8805 ln(x)-2,2458 R²=0,8911

 Tab. 101: LightCycler-Lauf 5 humane Enteroviren

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml	
106	4,192	541	2,73	
107	4,993	2071	3,32	
108	nicht quantifizierbar			
110	nic	ht quantifizier	bar	
111	0,411	1	-0,02	
112	nicht quantifizierbar			
114	nic	ht quantifizier	bar	

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	100	2,957	68	1,83
Standard 2	1000	5,015	2149	3,33
Standard 3	10000	5,704	6821	3,83

Modellgleichung: y=0,5965 ln(x)+0,4382 R²=0,9235

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml
53	4,057	744	2,87
54	1,604	25	1,40
56	1,59	25	1,39
57	0,153	3	0,53
60	5,146	3351	3,53
61	0,205	4	0,56
62	0,719	7	0,87
63	0,209	4	0,56
64	0,049	3	0,47
65	1,962	41	1,61
67	5,115	3211	3,51
69	1,411	19	1,28
70	0,467	5	0,72
72	2,708	115	2,06
73	2,042	46	1,66
74	0,171	3	0,54
75	0,205	4	0,56

 Tab. 102: LightCycler-Lauf 3 humane Enteroviren

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	100	2,518	89	1,95
Standard 2	1000	4,446	1274	3,11
Standard 3	10000	5,85	8867	3,95

Modellgleichung: y=0,7235 ln(x)-0,7267 R²=0,9918

 Tab. 103: LightCycler-Lauf 4 humane Enteroviren

Probe Nr.	Peakfläche	KID ₅₀ /ml	log KID ₅₀ /ml
81	3,729	271	2,43
101	0,463	1	-0,05
102	3,054	83	1,92

	KID ₅₀ /ml	Peakfläche	KID ₅₀ /ml kalkuliert	log KID ₅₀ /ml
Standard 1	100	2,823	56	1,75
Standard 2	1000	5,144	3221	3,51
Standard 3	10000	5,457	5567	3,75

Modellgleichung: y=0,572 ln(x)+0,5237 R²=0,8377

LightCycler Quantification Report

User: user4

Filename: C/LightCycler3/Users/user4/Data/Inhibition Proben 107-133.ABT

LightCycler ID: 399

LC Run Version: 3.39

LCDA Version: 3.1.102

This experiment was run on Jul 20, 2000 by user4.

Experimental Protocol

Pe-incuba

Cycles	1						
Type:	None Fluorescence Display Mode = F1/1						
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C [°] /sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C ^{or})	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

ampli

Cycles	22						
Туре:	Quantificati	on	Fluorescence Display Mode =			F1/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/scc)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C [®])	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	15	20	0	0	0	None
2	55	10	20	0	0	0	None
3	72	10	20	Û	0	0	Single

melt

Cycles	1						
Type: Segment Number	Melting Curves		Fluorescence Display Mode =			F1/1	
	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C ^e /sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C ^o)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	0	20	0	0	- 0	None
2	65	15	20	0	0	0	None
3	95	0	0.1	0	0	0	Continuous

cool

Cycles	1						
Туре:	None	None Fluorescence Display Mode = F1/1					
Segment	Temperature	Hold Time	Slope	2º Target	Step Size	Step Delay	Acquisition
Number	Target (°C)	(208)	(C ^o /sec)	Temp (°C)	(C °)	. (Cycles)	Mode
1	40	60	20	0	0	0	None

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. R. Böhm möchte ich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas und das gewährte Maß an Freiraum und Selbständigkeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Martens. Kritische Diskussionen, wertvolle Anregungen und viele Ratschläge, sowie unermüdliches Korrekturlesen schufen die Basis für diese Arbeit.

Bei Frau U. Hahn bedanke ich mich herzlichst, denn ohne ihre Hilfe hätte ich den Umfang der kulturellen Virusisolierung nicht bewältigen können.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern am Institut für Umwelt- und Tierhygiene für die große Hilfsbereitschaft und besonders für das freundschaftliche und kollegiale Arbeitsklima danken, insbesondere meinen lieben Kollegen und Freunden der Arbeitsgruppe Bioaerosole ("U2-Dream-Team"), die mir immer zur Seite standen. Vielen Dank Rebeca, Marcus und Susanne.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank Rita und Andreas, die viel Geduld und Liebe für mich aufbrachten.

Die Untersuchung wurde mit finanzieller Unterstützung der Tiefbau-Berufsgenossenschaft München durchgeführt, wofür an dieser Stelle gedankt sei.