

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Stolle

Angefertigt am
Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dienststelle Oberschleißheim
(Prof. Dr. C. Höller)

Etablierung von Methoden zum Nachweis von viralen Indikatoren in Trink- und Tränkwasser

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors rer. biol. vet.
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stefanie Maria Huber
aus Passau

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Stolle
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Mikrobiologische Trink- und Tränkwasserqualität	2
1.1.	Rechtliche Bestimmungen.....	2
1.1.1.	Trinkwasser	2
1.1.2.	Tränkwasser.....	3
1.2.	Eintragspfade von Verunreinigungen und Wasseraufbereitung	5
1.3.	Krankheitserreger im Wasser	6
1.4.	Indikatorkonzept	9
1.4.1.	Indikatorbakterien	9
1.4.2.	Bakteriophagen	10
1.4.3.	Stärken und Schwächen der Indikatororganismen	12
2.	Viren in Trink- und Tränkwasser	13
2.1.	Enterische Viren bei Mensch und/oder Tier.....	13
2.1.1.	Adenoviren	14
2.1.2.	Enteroviren	15
2.1.3.	Hepatitisviren.....	16
2.1.4.	Noroviren.....	16
2.1.5.	Polyomaviren.....	17
2.1.6.	Rotaviren	18
2.1.7.	Weitere Viren.....	19
2.2.	Mögliche Indikatorviren	20
2.3.	Ausbruchsgeschehen verursacht durch Tränk- bzw. Trinkwasser	21
3.	Wasserviologische Methoden	22
3.1.	Aufkonzentrierung	22
3.1.1.	Adsorptions-/Elutionsverfahren	23
3.1.1.1.	Negativ geladenes Filtermaterial	23
3.1.1.2.	Positiv geladenes Filtermaterial.....	24
3.1.1.3.	Glaswolle.....	25
3.1.1.4.	Sekundäre Konzentrierung.....	25
3.1.2.	Ultrafiltration	26
3.1.3.	Ultrazentrifugation	27

3.2.	Virusnachweis	27
3.2.1.	Zellkultur-Tests	28
3.2.2.	Molekularbiologischer Nachweis	28
3.2.3.	Vor- und Nachteile der Nachweismethoden	30
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	33
1.	Viren	33
1.1.	Eingesetzte Virustypen.....	33
1.2.	Vermehrung von humanen Adenoviren	33
2.	Aufkonzentrierung der Wasserproben	34
2.1.	Aufkonzentrierung mit Glaswollfilter	35
2.1.1.	Hauptmethode	35
2.1.2.	Variationen der Hauptmethode.....	37
2.1.2.1.	pH-Wert der Wasserprobe.....	38
2.1.2.2.	Filtrationsgeschwindigkeit.....	38
2.1.2.3.	Filtrationssäulen, Glaswolle und Elutionspuffer	39
2.1.2.4.	Fällung und Zentrifugation.....	39
2.1.2.5.	Weitere Konzentrierung durch Ultrafiltration.....	40
2.2.	Aufkonzentrierung mit der Virosorb® 1MDS-Filterkartusche	40
3.	Molekularbiologischer Virusnachweis	40
3.1.	Nukleinsäureextraktion	41
3.2.	PCR-Verfahren	43
3.2.1.	Nested und Real-Time PCR für humane Adenoviren.....	43
3.2.2.	Nested PCR für porcine Adenoviren	46
3.2.3.	PCR für Polyomaviren	46
3.2.4.	Real-Time RT (Reverse Transkriptase)-PCR für Influenzaviren....	46
4.	Bestimmung der Wiederfindungsraten beim Virusnachweis ..	47
5.	Nachweis infektiöser Adenoviren mit ICC-PCR.....	48
6.	Bakteriophagen-Nachweis aus großen Wasservolumina	49
7.	Untersuchung bayerischer Wasserversorgungen	50
7.1.	Wasserversorgungen	50
7.2.	Probenahmen.....	51

7.3.	Virologische, bakteriologische und chemisch-physikalische Untersuchung	52
IV.	ERGEBNISSE	53
1.	Etablierung des Bakteriophagennachweises	53
2.	Etablierung der PCR-Nachweise	53
2.1.	Etablierung der PCR-Nachweise für humane Adenoviren.....	54
2.2.	Etablierung des PCR-Nachweises für porcine Adenoviren.....	57
2.3.	Etablierung des PCR-Nachweises für aviäre und bovine Polyomaviren.....	57
2.4.	Etablierung des RT-PCR-Nachweises für Influenzaviren	58
3.	Etablierung des ICC-PCR-Nachweises	60
4.	Etablierung des Gesamt-Virusnachweises	60
4.1.	Aufkonzentrierung mit Glaswolle	60
4.1.1.	Durchschnittliche Wiederfindungsraten	60
4.1.2.	Veränderung des pH-Werts der Wasserprobe	61
4.1.3.	Veränderung der Filtrationsgeschwindigkeit.....	61
4.1.4.	Variationen bei Filtrationssäulen, Glaswolle und Elutionspuffern ..	61
4.1.5.	Varianten bei Fällung und Zentrifugation.....	62
4.1.6.	Ultrafiltration	62
4.1.7.	Versuche zur Identifizierung des Virusverlusts.....	63
4.1.7.1.	Organische Flockung und Zentrifugation.....	63
4.1.7.2.	Gesamte Aufkonzentrierung.....	63
4.1.7.3.	DNA-Extraktion.....	64
4.2.	Aufkonzentrierung mit positiv geladenem Filtermaterial	65
5.	Untersuchung der Wasserversorgungen	65
5.1.	Bakteriologische und chemisch-physikalische Untersuchung	65
5.2.	Untersuchung auf Bakteriophagen	67
5.3.	Virologische Untersuchung.....	67
5.3.1.	Inhibition der PCR-Reaktionen	68
5.3.2.	Untersuchung auf humane Adenoviren	68
5.3.3.	Untersuchung auf porcine Adenoviren	70
5.3.4.	Untersuchung auf Polyomaviren	71
5.3.5.	Untersuchung auf Influenzaviren.....	71

V.	DISKUSSION	73
1.	Auswahl der Viren und der Methoden	73
2.	Methodenetablierung	74
2.1.	Bakteriophagennachweis	74
2.2.	PCR-Nachweise	75
2.3.	ICC-PCR-Nachweis.....	77
2.4.	Gesamt-Virusnachweis.....	78
3.	Erprobung der Methoden in der Praxis	84
4.	Bewertung der etablierten Methode zum Virusnachweis	87
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	93
VII.	SUMMARY.....	95
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	97
IX.	ANHANG.....	119
1.	Material und Methoden	119
1.1.	Aufkonzentrierung der Wasserproben.....	119
1.1.1.	Geräte und Materialien.....	119
1.1.2.	Reinigung und Vorbereitung der Gerätschaften	119
1.1.2.1.	Reinigung der Kunststoffssäulen, Zentrifugationsgefäße und der pH-Elektrode	119
1.1.2.2.	Vorbereitung der Kunststoffssäulen für die Konzentrierung	120
1.1.3.	Pufferlösungen	121
1.1.3.1.	Phosphatpuffer	121
1.1.3.2.	Elutionspuffer	121
1.2.	Nukleinsäureextraktion	122
1.3.	Bakteriophagen-Nachweis.....	123
1.3.1.	Medien für den Nachweis somatischer Coliphagen.....	123
1.3.2.	Medien für den Nachweis F-spezifischer RNA-Bakteriophagen ..	124
2.	Ergebnisse	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A549	Human Adenocarcinoma of the Lung
BGM	Buffalo Green Monkey Kidney
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	Human Adenocarcinoma of the Colon
CPE	Cytopathischer Effekt
Ct	Cycle Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötale Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
HAdV	Humane Adenoviren
HEp-2	Human Epidermoid Carcinoma of the Larynx
IAC	Interne Amplifikationskontrolle
ICC-PCR	Integrated Cell Culture-PCR
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LGL	Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
MKS	Maul- und Klauenseuche
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RD	Human Rhabdomyosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
SVD	Swine Vesicular Disease
TrinkwV 2001	Trinkwasserverordnung 2001
TYG	Trypton-Hefeextrakt-Glucose

I. EINLEITUNG

Zur Beurteilung der hygienischen Wasserqualität werden normalerweise bakteriologische Untersuchungen durchgeführt. Sind im Trink- oder Tränkwasser keine Indikatorbakterien (coliforme Bakterien, *Escherichia coli*, intestinale Enterokokken) vorhanden, geht man davon aus, dass keine Infektionsgefahr durch fäkal ausgeschiedene Krankheitserreger besteht. Viren sind jedoch widerstandsfähiger gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmaßnahmen als Bakterien. In einer fäkal belasteten Wasserprobe könnten also zum Zeitpunkt der Probenahme die Indikatorbakterien schon inaktiviert, pathogene Viren aber noch vorhanden sein.

Es ist weitgehend unbekannt, ob verunreinigtes Tränkwasser bei der Übertragung von Viruserkrankungen auf Nutztiere in Deutschland eine Rolle spielt. Auch zur Virusbelastung von Trink- und Oberflächenwasser gibt es in Deutschland kaum Untersuchungen. Ein Grund dafür ist das Fehlen von standardisierten Methoden zum Virusnachweis aus großen Wasservolumina. Wegen der bei Viren häufig sehr geringen Infektionsdosis ist eine Verunreinigung von Tränk- und Trinkwasser mit pathogenen Viren in einer krankmachenden Konzentration durchaus denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) eine Methode zum Nachweis von Indikatorviren aus Trink- und Tränkwasser etabliert. Als virale Indikatoren wurden humane und porcine Adenoviren sowie bovine Polyomaviren ausgewählt. Die Methode bestand aus der Aufkonzentrierung der Wasserprobe und der molekularbiologischen Detektion der Viren.

Zur Überprüfung der Praxistauglichkeit der Methoden wurden zehn bayerische Wasserversorgungen virologisch untersucht. Zur besseren Charakterisierung der Wasserproben erfolgte parallel dazu die Bestimmung bakteriologischer und chemisch-physikalischer Parameter.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Mikrobiologische Trink- und Tränkwasserqualität

Im Trink- und Tränkwasser müssen festgelegte physikalische (z. B. pH-Wert) und chemische Parameter (z. B. geringe Schwermetallbelastung) eingehalten werden, damit die Aufnahme des Wassers für Menschen bzw. Tiere verträglich ist. Daneben ist die mikrobiologisch-hygienische Qualität von entscheidender Bedeutung.

1.1. Rechtliche Bestimmungen

Für die hygienische Qualität von Trinkwasser gibt es rechtliche Vorgaben. Für Tränkwasser sind zwar die Rahmenbedingungen rechtlich festgelegt, für Detailfragen liegen derzeit jedoch nur Empfehlungen vor.

1.1.1. Trinkwasser

Für Trinkwasser gilt die Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (EG 1998). Diese EG-Richtlinie wurde in Deutschland durch die Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001) vom 21. Mai 2001 (Bundesministerium für Gesundheit und Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft 2001) in nationales Recht umgesetzt. In § 3 wird definiert, dass unter „Wasser für den menschlichen Gebrauch“ „Trinkwasser“ und „Wasser für Lebensmittelbetriebe“ zu verstehen ist. „Trinkwasser“ wird nicht nur zum Trinken und Kochen, sondern beispielsweise auch zur Körperpflege benutzt. Mit „Wasser für Lebensmittelbetriebe“ werden Lebensmittel hergestellt, daneben werden damit Gegenstände gereinigt, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen können. Wasser für den menschlichen Gebrauch muss laut § 4 „frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein“ sein. § 5 präzisiert die mikrobiologischen Anforderungen. So „dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nr. 1 des Infektionsschutzgesetzes nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“. Darüber hinaus müssen bestimmte

Grenzwerte für mikrobiologische Parameter eingehalten werden: Gemäß Anlage 1, Teil I, dürfen *E. coli*, Enterokokken und coliforme Bakterien in 100 ml Wasser für den menschlichen Gebrauch nicht nachweisbar sein. Für Wasser, das in Flaschen abgefüllt werden soll, gelten noch strengere Anforderungen (Anlage 1, Teil II). Daneben gibt es auch unter den Indikatorparametern (Anlage 3 zu § 7) mikrobiologische Parameter, die eingehalten werden müssen: Die Koloniezahlen bei 22 und 36 °C dürfen keine anormalen Veränderungen aufweisen und *Clostridium perfringens* darf in 100 ml nicht detektiert werden. Die Untersuchung auf *C. perfringens* muss aber nur stattfinden, wenn Trinkwasser aus Oberflächengewässern oder aus von Oberflächenwasser beeinflussten Quellen gewonnen wird.

1.1.2. Tränkwasser

In der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit („Basisverordnung“; EG 2002) werden die Rahmenbedingungen für die Lebens- und Futtermittelsicherheit festgelegt. Gemäß Artikel 3 sind Futtermittel „Stoffe oder Erzeugnisse, auch Zusatzstoffe, verarbeitet, teilweise verarbeitet oder unverarbeitet, die zur oralen Tierfütterung bestimmt sind“. Damit ist Tränkwasser EG-rechtlich ein Futtermittel. Auch für das Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts vom 1. September 2005 (N. N. 2005) wurde diese Definition übernommen. Zur Umsetzung der Schutzziele aus der Basisverordnung wurde die Futtermittelhygiene-Verordnung erstellt (Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Januar 2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene (EG 2005)). Die wichtigste Aussage zum Tränkwasser wird in Anhang III „Gute Tierfütterungspraxis“ getroffen: „Tränkwasser und in der Aquakultur verwendetes Wasser muss so beschaffen sein, dass es für die betreffenden Tiere geeignet ist“. Diese Anforderung findet man auch im Codex Alimentarius (Code of Practice on Good Animal Feeding; Codex Alimentarius Commission 2004). Derzeit gibt es zur Tränkwasser-

qualität nur diese relativ allgemein gehaltenen rechtlichen Rahmenbedingungen, jedoch keine detaillierten Vorschriften. Deshalb erstellte das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) einen Orientierungsrahmen zur futtermittelrechtlichen Beurteilung der hygienischen Qualität von Tränkwasser (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007). Die darin enthaltenen Empfehlungen basieren im Wesentlichen auf einer vom BMELV in Auftrag gegebenen Studie (Kamphues et al. 2007). Als Tränkwasser geeignetes Wasser soll demnach schmackhaft, verträglich und verwendbar sein. Die Schmackhaftigkeit garantiert eine ausreichende Wasseraufnahme der Tiere. Verträgliches Tränkwasser enthält Inhaltsstoffe und/oder unerwünschte Stoffe nur in einer für die Tiere bzw. die von ihnen gewonnenen Lebensmittel nicht schädlichen bzw. nachteiligen Konzentration. Der Begriff der Verwendbarkeit beinhaltet schließlich, dass das Wasser keine nachteiligen Effekte auf die bauliche Substanz hat und mit dem Tränkwasser Futter zubereitet werden kann. Für die biologische Qualität wird empfohlen, dass das ins Tränksystem eingespeiste Wasser frei von Bakterien der Gattungen *Salmonella* und *Campylobacter* (in 100 ml) und möglichst weitgehend frei von *E. coli* sein sollte. Die aerobe Gesamtkeimzahl sollte 1.000 koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml bei 37 °C und 10.000 KBE pro ml bei 20 °C nicht überschreiten. Auch zum Zeitpunkt der Wasseraufnahme sollte das Tränkwasser noch eine geeignete Qualität aufweisen. Werden erhöhte Keimgehalte nachgewiesen, kann entweder das eingespeiste Wasser oder das Tränkwassersystem kontaminiert sein. Insgesamt wird es nicht für angemessen erachtet, dass Tränkwasser die strengen Anforderungen aus der TrinkwV 2001 einhalten muss. Überschreitungen der Grenzwerte aus der TrinkwV 2001 haben nicht notwendigerweise nachteilige Wirkungen auf das Tier bzw. auf die davon gewonnenen Lebensmittel. Wird das Tränkwasser nicht aus dem öffentlichen Leitungsnetz entnommen, was in der Nutztierhaltung durchaus üblich ist, wird jedoch eine regelmäßige Kontrolle der Tränkwasserqualität empfohlen.

1.2. Eintragspfade von Verunreinigungen und Wasseraufbereitung

Trinkwasser wird in Bayern hauptsächlich aus Grundwasservorkommen gewonnen, entweder aus Brunnen oder Quelfassungen. Angereichertes Grundwasser und Uferfiltrat sowie Oberflächenwasser haben nur einen sehr geringen Anteil (Bayerisches Landesamt für Umwelt 2010). Für letztere Bereiche sind die Eintragspfade von Verunreinigungen offensichtlich. Fäkalien von Mensch und Tier gelangen zum einen über punktuelle Einleitungen wie Kläranlagenabläufe oder Regenüberläufe in die Oberflächengewässer, zum anderen durch diffuse Einträge wie Abschwemmungen tierischer Ausscheidungen aus ufernahen Bereichen (Böhm 2000). Grundwasser ist durch die unterschiedlichen Bodenschichten, die über dem Grundwasserleiter liegen und durch ihre Filterwirkung Verunreinigungen zurückhalten, in Abhängigkeit von den Bodenverhältnissen mehr oder weniger gut geschützt. Allerdings gibt es große Unterschiede bezüglich der Schutzwirkung des Bodens. Oberflächennahe Grundwasservorkommen und Karstgebiete bieten beispielsweise sehr schlechte Voraussetzungen. Aber auch unter günstigen hydrogeologischen Bedingungen können Verunreinigungen ins Grundwasser gelangen, vor allem bei intensiver landwirtschaftlicher Bodenbearbeitung. Daneben gefährden undichte Abwasserkanäle, Deponien, Altlasten und Unfälle mit giftigen Stoffen das Grundwasser (Bannik et al. 2008).

Wird Trinkwasser aus geschützten Grundwasservorkommen gewonnen, muss es häufig nicht aufbereitet werden, da es die mikrobiologischen und chemisch-physikalischen Grenzwerte der TrinkwV 2001 einhält. In diesen Fällen entspricht das Rohwasser dem an den Verbraucher abgegebenen Trinkwasser. Ansonsten wird das Rohwasser mit Hilfe unterschiedlicher Aufbereitungsverfahren behandelt. Welche Verfahren angewandt werden, hängt von der Art und Qualität des Rohwassers und dem verunreinigenden Agens ab. Häufig werden zunächst Partikel durch Flockung und Filtration (Szewzyk et al. 2006) entfernt. Alternativ werden seit einigen Jahren zunehmend Ultrafiltrationsanlagen installiert. Zur Entfernung gelöster Stoffe kommen Aktivkohlefilter oder Ionenaustauscher

zum Einsatz (Umweltbundesamt 2008). Mikrobiell belastetes Wasser wird desinfiziert, z. B. mit Ozon, UV-Strahlung und/oder Chlor.

Als Tränkwasser wird entweder Trinkwasser aus dem kommunalen Netz eingesetzt oder der landwirtschaftliche Betrieb hat eine eigene Wasserversorgung, meist einen eigenen Grundwasserbrunnen. Die mikrobiologische Qualität des betriebseigenen Tränkwassers hängt zum einen – wie oben beschrieben – von den hydrogeologischen Verhältnissen ab. Verunreinigungen können von außen eingetragen werden, z. B. durch Oberflächenwasser, Ausscheidungen von Wildtieren oder Abwasserkanäle, oder aus dem jeweiligen Betrieb selbst stammen, z. B. aus der Güllegrube. Andererseits kommt noch hinzu, dass nicht nur das ins Tränkwassersystem eingespeiste Wasser verunreinigt sein kann, sondern innerhalb des Systems noch zusätzliche Belastungen auftreten können. Es können beispielsweise Krankheitserreger aus dem eigenen Bestand oder Mikroorganismen aus der Umgebung ins Tränkwassersystem gelangen (Kamphues et al. 2007).

1.3. Krankheitserreger im Wasser

Es gibt eine Vielzahl von Erregern, die ins Trink- bzw. Tränkwasser gelangen und so bei Mensch und Tier Krankheiten auslösen können. Im folgenden Abschnitt sollen solche Krankheitserreger, die fäkal-oral übertragen werden, im Mittelpunkt stehen. Opportunistische Pathogene, die sich in Trinkwassersystemen vermehren können, wie z. B. Legionellen oder Pseudomonaden werden hier nicht betrachtet.

In Tabelle 1 sind wichtige human- und tierpathogene Erreger aufgeführt. Die meisten von ihnen sind Zoonoseerreger, sie sind also vom Tier auf den Menschen bzw. umgekehrt übertragbar. Typische bakterielle Vertreter sind *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., pathogene *E. coli* und *Yersinia enterocolitica*, die vor allem durch Lebensmittel tierischen Ursprungs oder durch Tierkontakte auf den Menschen übertragen werden können. Gelangen tierische Ausscheidungen ins Trinkwasser, sind wasserbürtige Infektionen möglich. Eine der häufigsten parasitären Zoonosen weltweit ist die Toxoplasmose. Gut dokumentiert wurde ein Ausbruch in Kanada in den 1990er Jahren, bei dem *Toxoplasma*-Oozysten im Trinkwasser

nachgewiesen wurden (Karanis 2000). Daneben sind Cryptosporidiose und Giardiose häufig Trinkwasser-assoziiert. Als Erregerreservoir dienen hier sowohl Wild- als auch Nutztiere (Exner und Gornik 2004). Auf virale Zoonoseerreger wird in Kapitel II. 2.1. noch genauer eingegangen.

Tabelle 1: Einige Krankheitserreger, die mit Trink- und Tränkwasser übertragen werden können.

Bakterien:
<i>Campylobacter</i> spp.
Pathogene <i>Escherichia coli</i>
<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Salmonella</i> spp.
<i>Shigella</i> spp.
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
Protozoen:
<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Giardia</i> spp.
Kokzidien
<i>Toxoplasma gondii</i>
Viren:
Adenoviren
Astroviren
Coronaviren
Enteroviren
Flaviviren
Hepatitisviren A und E
Noroviren
Rotaviren

Viele Infektionen mit den oben genannten Erregern bleiben beim Menschen asymptomatisch oder äußern sich in Durchfallerkrankungen mit relativ milden Symptomen. Jedoch gehören Durchfallerkrankungen laut WHO zu den häufigsten Todesursachen bei Kindern in Entwicklungsländern. Aber auch in den Industriestaaten können durch Wasser übertragene Krankheiten durchaus lebensbedrohlich sein, vor allem bei Risikogruppen, wie z. B. Kindern, älteren Menschen, HIV-Infizierten und anderen chronisch Kranken.

Wasserassoziierte Infektionen wurden in Deutschland bisher selten erfasst. Dies kann auf eine tatsächliche niedrige Inzidenz aufgrund der hohen Qualität des Rohwassers und/oder der Wasseraufbereitungsverfahren hindeuten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass wasserbedingte Ausbrüche nicht als solche erkannt werden (Alpers et al. 2004). Wenn die Konzentration von Krankheitserregern im Trinkwasser gering ist, besteht die Gefahr, dass dieses nicht als Quelle des krankmachenden Agens identifiziert wird. Es infizieren sich Einzelpersonen durch Wasser, aber die Weitergabe des Krankheitserregers von Mensch zu Mensch kann wesentlich effektiver verlaufen.

Die Problematik der Identifizierung trinkwasser-assoziiertes Infektionen besteht auch bei Tieren. Bei der Intensivtierhaltung, aber auch in extensiven Haltungsformen stehen Individuen in engem Kontakt. Dadurch breiten sich Infektionen schnell in einem Bestand aus. In vielen Fällen werden die tierpathogenen Erreger über Zukäufe oder über das Futter eingeschleppt (Hinton 1993; Kharenko 2006; Okelo et al. 2008). Wie häufig wasserassoziierte Infektionen vorkommen, ist weitgehend unbekannt. Aufgrund fehlender Daten über die Konzentrationen von Krankheitserregern im Tränkwasser und über tatsächlich stattgefundenen Infektionen sind Risikobewertungen häufig die einzige Möglichkeit, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit zu treffen, dass sich Tiere über Tränkwasser infizieren. Gelangen z. B. Maul- und Klauenseuche (MKS)-Viren über Milch von an MKS erkrankten Rindern ins Abwasser und somit ins Oberflächenwasser, kann die Krankheit über Tränkwasser, das aus Oberflächenwasser gewonnen wird, übertragen werden. In Abhängigkeit verschiedener variierender Faktoren, wie z. B. der Konzentration der Viren in der Milch, Reduzierung der Viren durch die Abwasserbehandlung in der Kläranlage und Verdünnung des Kläranlagenablaufs im Oberflächenwasser, ist das Infektionsrisiko über den Wasserweg mehr oder weniger hoch (Schijven et al. 2005a). Auch eine Infektion von Geflügel mit aviären Inflenzaviren über Tränkwasser ist denkbar. Gemäß einer niederländischen Studie besteht für Geflügelfarmen mit mehr als 10.000 Tieren ein hohes tägliches Infektionsrisiko (mehr als 1 %), wenn das Roh-Tränkwasser mit einem hochinfektösen aviären Inflenzavirus belastet

und die Aufbereitung des Tränkwassers nicht effizient ist (Schijven et al. 2005b). Obwohl Daten zu tatsächlichen Infektionen über Tränkwasser fehlen, können aufgrund ihrer fäkal-oralen Übertragungsweise tierpathogene Erreger identifiziert werden, die im Tränkwasser relevant sein können (s. Tab. 1).

1.4. Indikatorkonzept

Es ist nicht möglich, Trink- und Tränkwasser routinemäßig auf eine Vielzahl verschiedener Krankheitserreger zu überprüfen. Deshalb bedient man sich sogenannter Indikatororganismen, die eine Verunreinigung anzeigen.

1.4.1. Indikatorbakterien

Ende des 19. Jahrhunderts war es äußerst schwierig, Typhusbakterien direkt im Wasser nachzuweisen. Damals wurde begonnen, *E. coli* als Indikatorbakterium zu verwenden (Botzenhart und Feuerpfeil 2008). Da *E. coli* im Darm von Menschen und warmblütigen Tieren vorkommt, beweist das Vorhandensein dieser Bakterien im Wasser eine Verschmutzung mit menschlichen oder tierischen Fäkalien. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass neben den in der Regel apathogenen *E. coli* auch Krankheitserreger im Wasser zu finden sind. Außerdem werden die „coliformen Bakterien“, zu denen *E. coli* gehört, als Indikatorbakterien verwendet. Die coliformen Bakterien stellen eine heterogene Gruppe dar, die auf Grund ihrer Wachstumseigenschaften in dieser Gruppe zusammengefasst werden. Nach älterer Definition sind dies Enterobakterien, die Laktose aerob und anaerob abbauen können. Heute versteht man unter coliformen Bakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörende Arten, die das Enzym β -Galaktosidase besitzen (Schindler 2008). Coliforme Bakterien können zwar auch einen Hinweis auf fäkale Verunreinigungen geben, allerdings kommen einige zu dieser Gruppe gehörende Arten überwiegend oder ausschließlich in der Umwelt vor und können sich – im Gegensatz zu *E. coli* – auch im nährstoffarmen Trinkwasser vermehren. Dennoch ist das Vorhandensein von Umwelt-Coliformen in Grund- bzw. Trinkwasser nicht erwünscht, da dies auf eine ungenügende Filterwirkung des Bodens, das Eindringen von

Oberflächenwasser oder eine Stagnation im Wassersystem hindeuten kann. Intestinale Enterokokken (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae*) sind dagegen wie *E. coli* echte Fäkalindikatorbakterien, sie sind Bestandteil der Darmflora von Menschen und Tieren. Da sie widerstandsfähiger gegen Umwelteinflüsse und chemische Desinfektionsverfahren als *E. coli* sind, kann ihr Nachweis eine länger zurückliegende fäkale Kontamination bedeuten (Feuerpfeil 2008a). Werden Sporen von *Clostridium perfringens* detektiert, zeigt dies eine noch länger zurückliegende fäkale Belastung an. Die Sporen können in der Umwelt sehr lange überdauern und sind resistent gegenüber vielen Desinfektionsverfahren. Werden nach der Trinkwasseraufbereitung Sporen von *C. perfringens* nachgewiesen, kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil des Aufbereitungsprozesses, z. B. die Filtration, fehlerhaft war (Hummel 2008). Laut TrinkwV 2001 muss nur Trinkwasser, das aus Oberflächengewässern gewonnen wird oder von Oberflächenwasser beeinflusst wird, routinemäßig auf *C. perfringens* untersucht werden (s. II. 1.1.1). Die Koloniezahl, d. h. die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in 1 ml Wasser, die nach Zugabe eines nährstoffreichen Mediums bei einer festgelegten Bebrütungstemperatur in einer bestimmten Zeitspanne wachsen, ist ein weiterer Indikatorparameter. Steigt dieser Wert im Vergleich zu früheren Bestimmungen stark an, so ist dies ein Hinweis auf ungenügende Wasseraufbereitung oder Wiederverkeimung im Rohrnetz (Feuerpfeil 2008b).

1.4.2. Bakteriophagen

Manche Krankheitserreger, z. B. parasitische Protozoen oder pathogene Viren, sind gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmaßnahmen widerstandsfähiger als die Fäkalindikatorbakterien (Payment und Franco 1993; Bosch 1998; Exner und Gornik 2004; Botzenhart 2007). Neben sporenbildenden Bakterien sind seit Jahrzehnten Bakteriophagen als mögliche ergänzende Indikatororganismen im Gespräch. Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen. Häufig sind sie in verunreinigtem Wasser in ähnlich hohen Konzentrationen wie Fäkalindikatorbakterien zu finden, und sie sind ebenfalls relativ einfach, schnell und kostengünstig

nachzuweisen (Huber 2008). Bestimmte Eigenschaften von Bakteriophagen und human- bzw. tierpathogenen Viren sind durchaus vergleichbar, z. B. Größe, Durchgängigkeit durch Bodenschichten und teilweise die Resistenz gegenüber Desinfektionsverfahren (Leclerc et al. 2000). Besonders die F-spezifischen Ribonukleinsäure (RNA)-Bakteriophagen werden häufig als mögliche virale Indikatoren bezeichnet (Havelaar et al. 1993; Carter 2005), da sie ähnlich groß wie Picorna-, Calici- und Astroviren sind. Außerdem sind sie gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmaßnahmen resistenter als Fäkalindikatorbakterien und viele Viren, z. B. Polioviren (Tree et al. 1997). Eine andere große Gruppe der Bakteriophagen, die somatischen Coliphagen, werden bei wasserhygienischen Fragestellungen ebenfalls oft herangezogen. Sie werden noch häufiger detektiert als F-spezifische RNA-Bakteriophagen. Obwohl sie sensitiver als diese sind, ist ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber vielen Umweltfaktoren im Vergleich zu Fäkalbakterien erhöht (Contreras-Coll et al. 2002). Skrabber et al. (2004) fanden, dass in Flusswasser mit der Konzentration von somatischen Coliphagen die Anzahl der Proben zunahm, in denen Norovirus- und Enterovirus-Genome nachweisbar waren. Allerdings birgt die Nutzung von Bakteriophagen als virale Indikatoren auch diverse Probleme. So infizieren besonders die somatischen Coliphagen neben *E. coli* auch andere Bakterien aus der Gruppe der coliformen Bakterien, d. h. sie können in Wasser ohne fäkale Verunreinigung vorkommen und sich unter bestimmten Bedingungen dort sogar vermehren (Grabow 2001). Bei den F-spezifischen Bakteriophagen gibt es ebenfalls Zweifel, ob sie ausschließlich fäkalen Ursprungs sind. Hinzu kommt noch, dass ihre z. T. geringen Konzentrationen die Eignung als Indikatoren fragwürdig erscheinen lassen (Lewis 1995). Widersprüchliche Ergebnisse bzgl. der Konzentration von Bakteriophagen in Wasser und der möglichen Eignung als virale Indikatoren können teilweise auf verschiedene Nachweismethoden und Wirtsstämme zurückgeführt werden (Huber 2008). Die konsequente Verwendung der DIN EN ISO-Normen (DIN 2001a; DIN 2001b) könnte hier Abhilfe schaffen.

1.4.3. Stärken und Schwächen der Indikatororganismen

Indikatororganismen sollten eine Reihe von Merkmalen aufweisen, um ihrer Funktion gerecht zu werden. Ihre Konzentration sollte mit Gesundheitsrisiken korreliert sein und sie sollten ähnlich widerstandsfähig oder widerstandsfähiger sein als Pathogene. Außerdem sollten sie in größerer Zahl als die Krankheitserreger vorkommen und spezifisch für eine fäkale Quelle sein (Committee on Indicators for Waterborne Pathogens 2004). Zudem müssen die Nachweismethoden für die Indikatororganismen bestimmten Kriterien entsprechen (s. Tab. 2)

Tabelle 2: Merkmale geeigneter Methoden zum Nachweis von Indikatororganismen (Committee on Indicators for Waterborne Pathogens 2004).

- Spezifität für den Zielorganismus
- Breite Anwendbarkeit
- Präzision
- Sensitivität
- Schnelligkeit
- Quantifizierung möglich
- Nachweis der Lebensfähigkeit oder Infektiosität
- Logistische Durchführbarkeit

Betrachtet man die Fäkalindikatorbakterien *E. coli* und intestinale Enterokokken, kann man feststellen, dass deren Merkmale den Anforderungen größtenteils entsprechen. Sie sind spezifisch für eine fäkale Quelle und im Wasser in höherer Konzentration vorhanden als Pathogene. Epidemiologische Studien, die eine Korrelation zwischen Erkrankungsfällen und Bakterienkonzentration aufdecken, sind sehr aufwändig und schwierig durchführbar. Einzelne Studien im Badegewässerbereich konnten allerdings einen Zusammenhang belegen (Kay et al. 1994; Wiedenmann et al. 2006). Auch wenn es zu diesem Thema nur sehr wenige Daten gibt, ist die Tatsache, dass diese Bakterien ausschließlich im Darm von Menschen und warmblütigen Tieren vorkommen, eigentlich allein schon ausreichend dafür, dass sie als

Indikatorbakterien geeignet sind. Sind fäkale Verunreinigungen im Wasser vorhanden, besteht ein Gesundheitsrisiko. Es ist umso größer, je stärker die Verunreinigung ist, da die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass mit den harmlosen Fäkalbakterien auch Krankheitserreger ausgeschieden wurden. Die Nachweismethoden für *E. coli* und intestinale Enterokokken erfüllen im Großen und Ganzen die Kriterien aus Tabelle 2. Da es sich aber in der Regel um Anzuchtverfahren handelt, liegen mindestens 18 Stunden zwischen Probenahme und Ergebnis.

Somit bleibt als einziger gewichtiger Nachteil, dass *E. coli* und intestinale Enterokokken weniger widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmaßnahmen sind als bestimmte Krankheitserreger, besonders parasitische Protozoen und Viren (s. II. 1.4.1.). Einige Bakteriophagen sind in dieser Hinsicht den Indikatorbakterien überlegen (Tree et al. 1997; Leclerc et al. 2000). Allerdings weisen Bakteriophagen meist geringere Konzentrationen im Wasser auf als Indikatorbakterien, und ihr Nachweis ist weniger gut mit Gesundheitsrisiken assoziiert (s. II. 1.4.2.). Darüber hinaus gibt es Viren, die noch widerstandsfähiger sind als Bakteriophagen, z. B. Adenoviren (Thurston-Enriquez et al. 2003). Aus diesen Überlegungen kann man folgern, dass mit den bisherigen Indikatororganismen und Nachweismethoden Gesundheitsrisiken durch Krankheitserreger im Wasser nicht lückenlos erfasst werden.

2. Viren in Trink- und Tränkwasser

Es gibt eine Reihe von Viren, die fäkal-oral übertragen werden. Diese enterischen Viren können in verschmutztem Trink- oder Tränkwasser vorkommen und vor allem Durchfallerkrankungen, bei Mensch und Tier auslösen.

2.1. Enterische Viren bei Mensch und/oder Tier

Im folgenden Kapitel werden Viren beschrieben, die evtl. in Trink- oder Tränkwasser zu finden sind. Nicht für alle aufgeführten Viren wurden bisher tatsächlich Infektionen über Wasser nachgewiesen. Aufgrund fäkal-oraler Übertragungsweise und teilweise hohen Konzentrationen von Viren in Stuhl bzw. Kot können diese jedoch trotzdem relevant sein.

2.1.1. Adenoviren

Adenoviren (Familie *Adenoviridae*) sind unbehüllte isometrische Viruspartikel mit einem Durchmesser von 70 bis 90 nm und einem linearen doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Genom (Frey et al. 2003). Der Mensch und die meisten Vertebraten, darunter Vögel, Schweine, Rinder und Schafe, werden von Adenoviren infiziert (Maluquer de Motes et al. 2004).

Es gibt 51 Serotypen von humanen Adenoviren, die in sechs Subgenera (A – F) unterteilt werden (Allard et al. 2001). Viele Infektionen verlaufen asymptomatisch, ein Drittel der Serotypen wird jedoch mit Krankheiten wie Gastroenteritiden, Atemwegserkrankungen, Augeninfektionen und Meningoenzephalitiden in Verbindung gebracht (Mena und Gerba 2009). In den USA sind die enterischen Serotypen 40 und 41 für 5 bis 20 % der wegen Durchfall ins Krankenhaus eingewiesenen Patienten verantwortlich (Carter 2005). Humane Adenoviren sind sehr häufig in Abwasser und Oberflächengewässern zu finden (Puig et al. 1994; Sedmak et al. 2005; van Heerden et al. 2005; Bofill-Mas et al. 2006). Aber auch in Trinkwasser, sowohl in Rohwasser als auch in aufbereitetem Trinkwasser, wurde das Vorkommen von humanen Adenoviren mehrfach beschrieben (Lee und Kim 2002; van Heerden et al. 2003; Verheyen et al. 2009). Crabtree et al. (1997) errechneten in ihrer Risikoabschätzung für Adenoviren in Trinkwasser, dass in den USA das jährliche Infektionsrisiko höher ist als 10^{-4} . In Deutschland könnte dieses Risiko jedoch aufgrund der anderen Form der Wasseraufbereitung durchaus niedriger sein. Ein Wert von 10^{-4} , d. h. weniger als eine Infektion unter 10.000 Exponierten pro Jahr, wurde von der amerikanischen Umwelt- und Gesundheitsbehörde US EPA (United States Environmental Protection Agency) und der WHO als akzeptables Risiko für trinkwasserbürtige Infektionen festgelegt (Szewzyk et al. 2006).

Neben den 51 humanen gibt es sechs porcine und zehn bovine Subtypen von Adenoviren (Hundesa et al. 2006). Normalerweise verursacht eine Infektion mit porcinen Adenoviren bei Schweinen keine schweren Krankheitsverläufe, obwohl über Fälle von Pneumoenteritis und Enzephalitis berichtet wurde (Maluquer de Motes et al. 2004). Porzine

Adenoviren werden häufig in Schweinekot und in Abwasser von Schlachthöfen detektiert (Hundesa et al. 2009). Bei Rindern, die an Keratokonjunktivitis, fiebrigen Erkrankungen oder Pneumoenteritis erkrankt waren, wurden Adenoviren nachgewiesen (Maluquer de Motes et al. 2004). Sogar tödliche Durchfallerkrankungen bei Kälbern werden mit bovinen Adenoviren in Verbindung gebracht (Smyth et al. 1996).

2.1.2. Enteroviren

Die zur Familie *Picornaviridae* gehörenden Enteroviren sind unbehüllt, ihr Durchmesser beträgt nur ca. 25 nm und sie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom. Die menschlichen Enteroviren stellen eine heterogene Gruppe mit derzeit 64 Serotypen dar (Bendig und Earl 2005). Zu ihnen zählen Coxsackieviren A und B, Echoviren, Polioviren und die Enteroviren 68-71. Sie verursachen zahlreiche verschiedene Krankheitsbilder, die wichtigsten sind Atemwegserkrankungen („Sommergrippe“), Gastroenteritis, Kinderlähmung und Meningitis. Enteroviren sind der Auslöser für mehr als 85 % der aseptischen Meningitiden (Lee und Kim 2002). Der Nachweis von Enteroviren gelang bereits aus Roh- und Trinkwasser (Lee und Kim 2002; Ehlers et al. 2005), aus Oberflächenwasser (Chapron et al. 2000; Hot et al. 2003; Lee et al. 2005) und Abwasser (Puig et al. 1994; Gantzer et al. 1997).

Die Gruppe der tierischen Enteroviren ist ebenfalls sehr vielfältig. Häufig verlaufen Infektionen mild oder asymptomatisch (Hughes und Ryan 2008). Von bovinen Enteroviren sind derzeit fünf Geno- bzw. Serotypen bekannt (Zell et al. 2006), infizierte Tiere zeigen meist keine Krankheitssymptome (Jimenez-Clavero et al. 2005). Porzine Enteroviren (13 Serotypen) werden dagegen mit enterischen bzw. respiratorischen Krankheiten und Fruchtbarkeitsstörungen sowie bei Ferkeln mit Polioenzephalomyelitis in Verbindung gebracht (Pogranichniy et al. 2003). Das zu den porzinen Enteroviren gehörende Swine Vesicular Disease (SVD)-Virus verursacht die Vesikuläre Schweinekrankheit, eine anzeigepflichtige Tierseuche, deren Symptome denen der Maul- und Klauenseuche sehr ähnlich sind. Es ist nah mit dem humanen Coxsackievirus B5 verwandt (Martin-Acebes et al. 2009). Sowohl das SVD-Virus als auch andere Enteroviren kommen als Zoonoseerreger in Betracht (Hughes und Ryan 2008).

2.1.3. Hepatitisviren

Betrachtet man Wasser als Übertragungsmedium, sind Hepatitis A- und Hepatitis E-Viren relevant. Das zur Familie der *Picornaviridae* gehörende Hepatitis A-Virus (Genus *Hepatovirus*) hat einen Durchmesser von 27 bis 32 nm, ist unbehüllt und sein RNA-Genom ist einzelsträngig. Infiziert sich ein Mensch mit Hepatitis A-Viren, ist der Krankheitsverlauf normalerweise relativ mild. Infektionen können auch asymptomatisch verlaufen. Schwere Komplikationen sind äußerst selten, chronische Verläufe sind nicht bekannt (Nainan et al. 2006). Hepatitis A-Viren wurden schon häufig in Wasser detektiert, z. B. in Quellwasser (Bloch et al. 1990), Flusswasser und Abwasser (Pina et al. 2001). Über verschmutztes Abwasser gelangen Hepatitis A-Viren auch in Küstengewässer und somit in Meeresfrüchte (Le Guyader et al. 1994).

Hepatitis E-Viren (Familie *Hepeviridae*) besitzen ebenfalls ein einzelsträngiges RNA-Genom, sind nicht behüllt und der Durchmesser des Virions beträgt ca. 32 bis 34 nm (Meng 2010). Die Krankheitssymptome beim Menschen sind in der Regel nicht wesentlich schwerwiegender als bei Hepatitis A. Eine Ausnahme bilden hier Schwangere, bei denen die Sterblichkeitsrate bei bis zu 25 % liegen kann (Khuroo und Khuroo 2008). Während seit langer Zeit bekannt ist, dass Hepatitis E-Viren in Entwicklungsländern durch Trinkwasser übertragen werden, werden seit einigen Jahren auch autochthone Erkrankungen in den Industriestaaten registriert (Dalton et al. 2008). Hepatitis E-Viren kommen bei Menschen, Schweinen, Geflügel und anderen Tieren vor. Mittlerweile wird Hepatitis E als Zoonose eingestuft, Haus- und Wildschweine gelten als Reservoir der Erreger (Meng 2010). Hepatitis E-Viren sind in vielen Ländern im Wasserkreislauf vorhanden, in Trink-, Ab- und Flusswasser (Jothikumar et al. 1995; Albinana-Gimenez et al. 2006; Kitajima et al. 2009).

2.1.4. Noroviren

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae*. Sie sind unbehüllt, haben einen Durchmesser von 27 bis 35 nm und ihr Genom besteht aus einzelsträngiger RNA. Sie wurden bei Menschen, Schweinen, Rindern und Mäusen gefunden. Im Moment werden sie in fünf Genogruppen unterteilt, wobei humane Viren zu den Gruppen I, II und IV, porcine Viren zur

Gruppe II und bovine Viren zur Gruppe III gehören (Wolf et al. 2007). Humane Noroviren sind vermutlich die Hauptauslöser von Durchfallerkrankungen in den Industriestaaten (Carter 2005) bzw. weltweit, wenn nur virale Erreger betrachtet werden (Wolf et al. 2009).

Schweine, die positiv auf Noroviren getestet wurden, zeigten oft keine klinischen Symptome (Wang et al. 2006). Bovine Noroviren wurden sowohl bei gesunden Kälbern als auch bei Tieren mit Durchfall nachgewiesen (van der Poel et al. 2003). Molekularbiologische Untersuchungen machten deutlich, dass von Mensch und Tier stammende Noroviren zum Teil nah verwandt sind und eine Rekombination möglich erscheint (Wang et al. 2005b; Wolf et al. 2009). Somit besteht für Noroviren ein potentielles Risiko einer zoonotischen Übertragung. Lange Zeit galten humane Noroviren als nicht kultivierbar in Zellkulturen, erst vor wenigen Jahren gelang die Vermehrung in einem komplizierten dreidimensionalen Modell des menschlichen Darmepithels (Straub et al. 2007).

Der molekularbiologische Nachweis von menschlichen Noroviren erfolgte bereits aus Grundwasser von Einzelwasserversorgungen (Borchardt et al. 2003), aus Rohtrinkwasser (Borchardt et al. 2004), aus Oberflächengewässern (Haramoto et al. 2005; Rutjes et al. 2006) sowie aus Abwasser (Lodder und de Roda Husman 2005; Pusch et al. 2005).

2.1.5. Polyomaviren

Polyomaviren (Familie *Polyomaviridae*) sind unbehüllt, haben einen Durchmesser von 40 nm und ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom (Frey et al. 2003). Lange Zeit waren nur zwei Typen von humanen Polyomaviren bekannt, das BK- und das JC-Virus. Seit 2007 wurden noch weitere Typen identifiziert (Allander et al. 2007; Dalianis et al. 2009). Die meisten Menschen infizieren sich im Kindesalter mit humanen Polyomaviren. Die Infektion bleibt normalerweise symptomlos, Viren werden jedoch oft lebenslang ausgeschieden. Bei immunsupprimierten bzw. -geschwächten Patienten können BK- und JC-Viren schwere Krankheiten auslösen (Bofill-Mas et al. 2000). Beide Typen zeigen

außerdem ein hohes onkogenes Potenzial in Versuchstieren (Allander et al. 2007).

Darüber hinaus wurden Polyomaviren bei vielen Vertebraten gefunden, z. B. bei Affen, Nagetieren, Rindern und Vögeln (Hundesä et al. 2006). Bovine Polyomaviren wurden ursprünglich aus kontaminierten Zellkulturen isoliert. Es stellte sich heraus, dass fäkales Kälberserum, das als Zusatz zu Nährmedien für Zellkulturen verwendet wird, sehr häufig mit Polyomaviren verunreinigt ist (Schuurman et al. 1991; Wang et al. 2005a). Obwohl bei Rindern oft Antikörper gegen Polyomaviren nachgewiesen werden, wurden Infektionen mit bovinen Polyomaviren bisher nicht mit Krankheiten in Verbindung gebracht (Mayr und Kaaden 2007). Im Gegensatz zu den meist subklinisch verlaufenden Infektionen bei Menschen und Säugetieren verursachen aviäre Polyomaviren tödliche Krankheiten, z. B. die Nestlingskrankheit der Wellensittiche (Budgerigar fledgling disease) (Johns et al. 2006).

Humane JC-Viren wurden aus Abwasser, Flusswasser und Rohtrinkwasser isoliert (Bofill-Mas et al. 2006; Albinana-Gimenez et al. 2009b; Haramoto et al. 2010). In Abwässern von Schlachthöfen und in Flusswasser konnten bovine Polyomaviren detektiert werden (Hundesä et al. 2006; Hundesä et al. 2010).

2.1.6. Rotaviren

Rotaviren (Familie *Reoviridae*) besitzen ein doppelsträngiges RNA-Genom, das aus elf Segmenten besteht. Die Viruspartikel sind unbehüllt und haben einen Durchmesser von 75 nm. Rotaviren werden in sieben Serogruppen (A – G) unterteilt, wobei die meisten bei Menschen und Tieren vorkommenden Rotaviren zur Gruppe A gehören (Steyer et al. 2008). Sie können schwere Gastroenteritiden auslösen, besonders bei kleinen Kindern und bei Jungtieren. Fast alle Kinder infizieren sich bis zu einem Alter von fünf Jahren mit Rotaviren der Serogruppe A (Meleg et al. 2008). Sedmak et al. (2005) fanden Reoviren sehr häufig in Zu- und Abläufen von Kläranlagen und sogar in 9 % der untersuchten Rohwasserproben aus zwei Trinkwasseraufbereitungsanlagen. Mehrere Studien legen nahe, dass es zu einer zoonotischen Übertragung von

Rotaviren kommt (Adah et al. 2002; Steyer et al. 2008), wobei sowohl eine direkte Übertragung zwischen Mensch und Tier als auch eine indirekte Übertragung über Trink- bzw. Tränkwasser denkbar ist. Aufgrund des segmentierten Genoms kann es relativ einfach zu einem genetischem „Reassortment“, d. h. einer Neukombination von Genomteilen verschiedener Rotaviren, kommen (Steyer et al. 2008). Daher können Viruspartikel entstehen, deren Genome aus humanen und beispielsweise porcinen oder bovinen Anteilen zusammengesetzt sind.

2.1.7. Weitere Viren

Neben den in den letzten Abschnitten genauer beschriebenen Virusgruppen gibt es noch einige weitere, die in Trink- oder Tränkwasser vorkommen könnten.

Zunächst sind hier die Astroviren zu nennen, die bei Menschen in den Industriestaaten meist recht mild verlaufende Gastroenteritiden auslösen. Sie wurden schon häufig aus der Umwelt isoliert (Chapron et al. 2000; Leclerc et al. 2002). Astroviren gibt es auch bei verschiedenen Tierarten, eine zoonotische Übertragung erscheint durchaus denkbar (Kapoor et al. 2009).

Während Coronaviren beim Menschen vor allem als Auslöser von Atemwegserkrankungen bekannt sind, verursachen sie bei Tieren auch enterale Infektionen, z. B. die übertragbare Gastroenteritis bei Schweinen und die Coronavirusdiarrhö beim Kalb (Mayr und Kaaden 2007; Zhang et al. 2007; Vemulapalli et al. 2009). Coronaviren überspringen Artgrenzen, sowohl zwischen verschiedenen Tierarten als auch zwischen Tier und Mensch (Woo et al. 2009).

Parvoviren sind sehr kleine, hoch infektiöse und sehr widerstandsfähige DNA-Viren ohne Hülle. Parvoviren der Gattung *Bocavirus* wurden bei Kindern mit respiratorischen und gastrointestinalen Krankheiten gefunden (Lau et al. 2008). Bovine Parvoviren sind ebenfalls mit respiratorischen Symptomen und Gastroenteritis assoziiert (Johnson et al. 2004). Bei trächtigen Schweinen verursachen Parvoviren das Absterben der Feten (Antonis et al. 2006).

Zur Gattung *Pestivirus* (Familie *Flaviviridae*) gehören die Erreger von drei wichtigen Tierkrankheiten, der Europäischen Schweinepest, der Border Disease und der Bovinen Virusdiarrhö/Mucosal Disease (Mayr und Kaaden 2007; Hornberg et al. 2009). Auch bei den Pestiviren werden Artgrenzen problemlos übersprungen, die Infektionen verlaufen in anderen Wirten jedoch meist milder (Leyssen et al. 2000).

2.2. Mögliche Indikatorviren

Aufgrund ihrer im Vergleich zu Bakterien höheren Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmaßnahmen können Viren auch in bakteriologisch einwandfreiem Wasser vorhanden sein. Es wäre wünschenswert, geeignete Indikatorviren zu finden, die eine Verunreinigung mit stabilen Krankheitserregern wie Viren und Parasiten anzeigen.

Adenoviren erscheinen in vielfacher Hinsicht als Indikatorviren geeignet. Als unbehüllte Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom sind sie sehr widerstandsfähig. Adenoviren überleben im Wasser länger als Hepatitis A-Viren und Polioviren (Enriquez et al. 1995). Außerdem sind Adenoviren resistenter gegen UV-Strahlung als Caliciviren und Bakteriophagen (Thurston-Enriquez et al. 2003). Der Mensch und sehr viele Tierarten werden von Adenoviren infiziert, daher sind Adenoviren in Abwasser und Oberflächengewässern ubiquitär vorhanden, oft in relativ hoher Konzentration. Werden in Oberflächengewässern Adeno- und Enteroviren detektiert, ist die Konzentration an Adenoviren normalerweise höher (Mena und Gerba 2009). Verschiedene Autoren bezeichneten Adenoviren bereits als geeignete virale Indikatoren (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998; Albinana-Gimenez et al. 2006). Der Nachweis von Adenoviren könnte sogar dazu verwendet werden, die Quellen fäkaler Verunreinigungen zu identifizieren („Microbial Source Tracking“), indem tierische und humane Adenoviren unterschieden werden (Hundesä et al. 2006; Hundesä et al. 2009).

Humane und bovine Polyomaviren werden ebenfalls als virale Indikatoren vorgeschlagen (Albinana-Gimenez et al. 2006; Hundesä et al. 2006; McQuaig et al. 2006). Wie Adenoviren besitzen die unbehüllten

Polyomaviren ein doppelsträngiges DNA-Genom und sind daher ebenfalls widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmaßnahmen. Sie werden in hoher Konzentration ausgeschieden und deshalb oft in Abwasser und Oberflächenwasser detektiert (Bofill-Mas et al. 2000; Haramoto et al. 2010).

In der Vergangenheit waren meist Enteroviren die Zielorganismen virologischer Untersuchungen von Umweltproben. Aufgrund häufiger Nachweise galten sie als geeignete Indikatorviren (Hot et al. 2003). Einen großen Anteil an den in der Umwelt vorkommenden Enteroviren hatten jedoch die Polio-Impfviren. Seit in Europa und Amerika der orale Polioimpfstoff nicht mehr empfohlen wird, haben die Enteroviren in der Umweltvirologie an Bedeutung verloren.

2.3. Ausbruchsgeschehen verursacht durch Tränk- bzw. Trinkwasser

Bei Ausbrüchen viraler Gastroenteritiden ist es nicht einfach, Trink- bzw. Tränkwasser als Infektionsquelle zu identifizieren. Zum einen liegt dies an den methodischen Schwierigkeiten bei der virologischen Wasseruntersuchung. Zum anderen sind Verunreinigungen im Wasser teilweise nur temporär vorhanden, so dass der Nachweis des infektiösen Agens oft nicht mehr möglich ist, wenn ein Ausbruch als solcher erkannt wird. Ausbrüche viraler Gastroenteritiden bei Tieren in Zusammenhang mit Tränkwasser wurden bisher nicht dokumentiert. Trinkwasser-assoziierte virale Infektionen beim Menschen werden dagegen immer wieder publiziert, jedoch gelingt der Nachweis der Erreger meist nur aus dem Stuhl der Infizierten (Kukkula et al. 1997; Divizia et al. 2004). Gesicherte Zusammenhänge zwischen der Infektionsquelle Trinkwasser und den Erkrankungen können nur in Einzelfällen hergestellt werden, wenn die Erreger tatsächlich in Wasserproben nachgewiesen werden. Bei drei Norovirus-Ausbrüchen in Europa wurden tatsächlich Noroviren im Trinkwasser detektiert: In einer finnischen Ortschaft infizierten sich geschätzte 1700 bis 3000 der 4860 Einwohner (Kukkula et al. 1999), in einem schweizer Dorf war mehr als die Hälfte der 3500 Einwohner betroffen (Häfliger et al. 2000). Während der Sanierung der Trinkwasserleitung in einer sächsischen Ortschaft erkrankten 88 von 95

Anwohnern eines Straßenzuges (Robert-Koch-Institut 2004). In allen drei Fällen wurden übereinstimmende Norovirus-Stämme im Trinkwasser und in Stuhlproben erkrankter Personen identifiziert.

3. Wasservirologische Methoden

Im Gegensatz zu diagnostischen Proben im medizinischen Bereich, wo beispielsweise Kot- bzw. Stuhlproben auf Viren untersucht werden, enthalten Umweltproben in der Regel sehr geringe Konzentrationen an Krankheitserregern. Daher besteht ein umwelt- bzw. wasservirologischer Nachweis aus zwei Teilen, der Aufkonzentrierung der Probe und der eigentlichen Detektion der Viren. Im Trinkwasserbereich werden Probenvolumina von 100 bis über 1.000 Litern als sinnvoll erachtet (Payment und Franco 1993; Grabow et al. 2001).

3.1. Aufkonzentrierung

Es gibt verschiedene Methoden, mit denen Viren aus Wasserproben aufkonzentriert werden können. Aufgrund ihres geringen Durchmessers von 15 bis 400 nm (Büttner 2007) wird ein Großteil der Viren von Membranfiltern mit Porengrößen von 0,2 µm, die bei bakteriologischen Untersuchungen üblich sind, nicht zurückgehalten. Allerdings können Viren aufgrund von Ladungsunterschieden zwischen Virusoberfläche und Filtermaterial an bestimmte Filter adsorbieren und über diesen Mechanismus aufkonzentriert werden. Bei der Ultrafiltration werden dagegen Membranen mit geringeren Porengrößen eingesetzt, so dass Viren zurückgehalten werden. Daneben können Zentrifugationsverfahren eingesetzt werden. Es sind sehr hohe Geschwindigkeiten von mindestens 40.000 bis über 200.000 x g (Ultrazentrifugation) erforderlich (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998), um Viren zu pelletieren.

In Tabelle 3 sind Kriterien aufgeführt, die Methoden zur Aufkonzentrierung von Viren aus Wasserproben erfüllen sollten. Bisher gibt es keine Methode, die allen Anforderungen genügt.

Tabelle 3: Merkmale geeigneter Methoden zur Aufkonzentrierung von Viren aus Wasserproben (nach Wyn-Jones und Sellwood 2001).

- technisch einfach
- schnell
- kostengünstig
- anwendbar für unterschiedliche Viren
- Ausgangsvolumina hoch
- Volumen des erhaltenen Konzentrats gering
- Wiederfindungsrate hoch
- reproduzierbar

Wasservirologische Untersuchungen werden seit Jahrzehnten durchgeführt. Bei den Methoden der Aufkonzentrierung gab es trotzdem nur eher geringe Fortschritte. Die größte Bedeutung haben nach wie vor Adsorptions-/Elutionsverfahren. Andere Verfahren wie Ultrafiltration und Ultrazentrifugation spielen eine untergeordnete Rolle.

3.1.1. Adsorptions-/Elutionsverfahren

Beim ersten Schritt eines Adsorptions-/Elutionsverfahrens werden Wasserproben über geeignete Materialien filtriert. Nach Adsorption der Viruspartikel an die Filter erfolgt die Elution mit Hilfe von autoklavierten Pufferlösungen (121 °C, 2 bar, 20 min), die die elektrostatische Bindung zwischen Viren und Filtermaterial auflösen. Die erhaltenen Eluate werden durch einen sekundären Konzentrierungsschritt weiter eingeeengt (s. II. 3.1.1.4.). Adsorptions-/Elutionsverfahren zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch in einem mikrobiologischen Routinelabor angewandt werden können, da keine speziellen Geräte wie z. B. Ultrazentrifugen benötigt werden.

3.1.1.1. Negativ geladenes Filtermaterial

Es wurden zahlreiche Methoden zur Aufkonzentrierung von Viren beschrieben, bei denen negativ geladene Filtermaterialien verwendet wurden. Zum Einsatz kamen beispielsweise Filter aus glasfaserverstärktem Kunststoff (Fiberglas) (Morris und Waite 1980;

Sobsey et al. 1985) oder Membranfilter aus Zellulosenitrat (Wallis et al. 1972; Papageorgiou et al. 2000) bzw. gemischten Zelluloseestern (Hamza et al. 2009; Victoria et al. 2009). Bei verschmutzten Wässern sind Vorfilter erforderlich, um einem Verstopfen der Membran entgegenzuwirken. Üblicherweise bestehen diese Vorfilter aus Glasfasern (Wyn-Jones et al. 2000). Auf den ersten Blick erscheinen negativ geladene Filter zur Bindung von Viren nicht geeignet zu sein, da die Oberfläche von enterischen Viren bei neutralem pH-Wert ebenfalls negativ geladen ist (Fong und Lipp 2005). Die Ladung der Virusoberfläche wird jedoch durch Absenkung des pH-Werts der Wasserprobe vor der Filtration verändert, so dass die nun positiv geladenen Viren an die Membran binden können. Zum Teil werden vor der pH-Wert-Absenkung Kationen zugegeben, meist in Form von Magnesium- oder Aluminiumsalzen (Sobsey et al. 1985). Es bilden sich Komplexe aus Kationen und Viren, die an die Membran adsorbieren (Rutjes et al. 2005). Victoria et al. (2009) testeten unterschiedliche Magnesiumchlorid-Konzentrationen und fanden heraus, dass die optimale Konzentration von Virustyp und Beschaffenheit der Wasserprobe abhängt. Die Elution der Viruspartikel vom Filter erfolgt mit Hilfe alkalischer Pufferlösungen mit hohem Proteingehalt. Gängige Pufferlösungen sind sterilisierte Fleischextrakt- bzw. Magermilch-Glycinpuffer mit einem pH-Wert von 9,5 (Morris und Waite 1980; Pallin et al. 1997).

3.1.1.2. Positiv geladenes Filtermaterial

Seit mehr als 30 Jahren werden auch Methoden mit positiv geladenem Filtermaterial zur Aufkonzentrierung von Viren verwendet, vor allem in den USA (United States Environmental Protection Agency 2001a). Die bei weitem am häufigsten eingesetzten Filter bestehen aus Glas und Zellulose und weisen durch eine Vorbehandlung positive Ladungen auf. Sie werden als „Zeta-plus-“ bzw. „1MDS-Filter“ bezeichnet und hauptsächlich für die Untersuchung von Trinkwasser (Sobsey und Jones 1979; Abbaszadegan et al. 1999; Borchardt et al. 2003), aber auch von Oberflächengewässern eingesetzt (Chapron et al. 2000; Shieh et al. 2008). Positiv geladene Filter haben den Vorteil, dass der ursprüngliche pH-Wert der Wasserprobe nicht verändert werden muss und keine Salze zugegeben werden müssen. Die

negativ geladenen Viren werden elektrostatisch an das Filtermaterial gebunden. So können auch Viren, die empfindlich auf niedrige pH-Werte reagieren wie z. B. Influenzaviren, mit dieser Methode aufkonzentriert werden (Goyal et al. 1980). Ähnlich wie bei negativ geladenen Filtern werden die adsorbierten Viren mit Hilfe sterilisierter alkalischer Puffer mit pH-Werten über 9 eluiert, beispielsweise Glycin-NaOH- oder Fleischextrakt-Glycin-Puffer (Sobsey und Jones 1979; Schwab et al. 1996; Borchardt et al. 2004).

3.1.1.3. Glaswolle

Mit Bindemittel und Mineralöl behandelte Glaswolle ist an ihrer Oberfläche zumindest stellenweise hydrophob und elektropositiv geladen (Lambertini et al. 2008). Deshalb adsorbieren Viren bei neutralen pH-Werten an Glaswolle (Vilagines et al. 1993). Wasserproben können also ohne Vorbehandlung mit Säure oder Salzen direkt filtriert werden. Andere Autoren beschrieben erfolgreiche Aufkonzentrierungen von Proben, in denen der pH-Wert vor der Filtration auf 3,5 gesenkt wurde (Huber und Höller 2007; Albinana-Gimenez et al. 2009a). In den 1990er Jahren wurde eine Konzentrierungsmethode mit Glaswolle für den Enterovirusnachweis aus Wasser als französische Standardmethode genormt und eine Vergleichsstudie mit 13 Laboratorien durchgeführt (Vilagines et al. 1997a). Es zeigte sich, dass es sich um eine effektive, kostengünstige und relativ einfache Methode handelt. Sie wird hauptsächlich in Europa (Gantzer et al. 1997; Albinana-Gimenez et al. 2009b) angewandt, aber auch in Südafrika (Ehlers et al. 2005; van Heerden et al. 2005) und den USA (Lambertini et al. 2008). Die Elution der Viren wird wiederum zum großen Teil mit Fleischextrakt-Glycin-Puffern mit pH-Werten zwischen 9,0 und 9,5 durchgeführt (Vilagines et al. 1993; van Heerden et al. 2003; Albinana-Gimenez et al. 2009a).

3.1.1.4. Sekundäre Konzentrierung

Unabhängig davon, mit welchem Material die Filtration und mit welchem Puffer die Elution erfolgt, ist das Volumen des Eluats in der Regel immer noch zu groß, um daraus direkt Viren nachzuweisen. Deshalb muss das Volumen durch einen sekundären Konzentrierungsschritt weiter eingeeengt

werden. Häufig kommt der Prozess der organischen Flockung zum Einsatz. Durch Absenkung des pH-Werts auf unter 3,5 bilden sich Proteinflocken, in die die Viren eingebettet sind. Die Flocken können mit einer Geschwindigkeit von 3.000 bis 10.000 x g abzentrifugiert und das Pellet in einem geringen Volumen eines neutralen Puffers resuspendiert werden (Katzenelson et al. 1976; Vilagines et al. 1993; United States Environmental Protection Agency 2001a; Albinana-Gimenez et al. 2009b). Ein anderer Ansatz besteht darin, die Viren im Eluat mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) zu präzipitieren. Die Viren werden hier keiner weiteren starken pH-Wert-Schwankung ausgesetzt, da die Fällung im neutralen Bereich erfolgt. Die präzipitierten Partikel werden bei 10.000 x g abzentrifugiert. Die meisten Autoren beschreiben zweistufige PEG-Verfahren mit einem dazwischen liegenden Zentrifugationsschritt (Lewis und Metcalf 1988; Vilagines et al. 1997b), aber eine einmalige Fällung und Zentrifugation scheinen ebenfalls effektiv zu sein (Huang et al. 2000). Daneben ist es möglich, Ultrafiltration zur weiteren Einengung der Eluate einzusetzen (Rutjes et al. 2005; Dubois et al. 2007). Die mit einer der drei Methoden erzielten Konzentrate können entweder sofort weiter untersucht oder für spätere Analysen eingefroren werden.

3.1.2. Ultrafiltration

Ultrafiltration kann sowohl zur sekundären Konzentrierung innerhalb eines Adsorptions-/Elutionsverfahrens (s. II. 3.1.1.4) als auch zur primären Konzentrierung von Wasserproben verwendet werden. Es werden Membranen mit Porengrößen gewählt, die Viren zurückhalten. Normalerweise wird jedoch keine Porengröße angegeben, sondern die sogenannte molekulare Ausschlussgrenze („molecular weight cut-off“). Sie gibt das geringste Molekulargewicht an, für das die Membran einen Rückhalt aufweist. Im Gegensatz zu den Adsorptions-/Elutionsverfahren sollten die Viren bei der Ultrafiltration nicht an die Membran binden, sondern in einem geringen Wasservolumen („Retentat“) vor der Membran verbleiben. Man unterscheidet Tangential- und Vortex-Fluss-Filtration (Wyn-Jones und Sellwood 2001). Bei ersterer Methode zirkuliert die Probe unter Druck in einem System aus mehreren Membranen und wird dabei allmählich aufkonzentriert. Bei schmutzigen Wässern ist eine Vorfiltration

nötig, um ein Verstopfen der Membran zu verhindern (Fong und Lipp 2005). Die Retentate werden einem sekundären Konzentrierungsschritt unterzogen, z. B. Ultrazentrifugation (Soule et al. 2000) oder einer weiteren Ultrafiltration (Rajal et al. 2007a). Bei der Vortex-Fluss-Filtration rotiert ein zylindrischer Filter in einem zweiten Filter. Die Probe wird unter Druck zwischen die beiden Zylinderoberflächen gepresst, wodurch das Retentat vom Filtrat getrennt wird und die Filteroberfläche immer frei von Ablagerungen gehalten wird (Paul et al. 1991). Daher ist keine Vorfiltration erforderlich (Jiang et al. 2001).

3.1.3. Ultrazentrifugation

Ultrazentrifugation zur Aufkonzentrierung von Wasserproben ist in der Regel nur anwendbar, wenn die Konzentration der Viren hoch ist und ein geringes Untersuchungsvolumen ausreicht. Dies ist bei Abwasserproben oft der Fall. Hier können durch Zentrifugation bzw. Ultrazentrifugation zunächst Schwebstoffe und Viren pelletiert werden. Nach Elution der Viren aus dem Pellet mit Hilfe alkalischer Pufferlösungen werden die Feststoffe erneut abzentrifugiert und schließlich die Viren aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation endgültig abgetrennt (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998).

Walter und Rüdiger (1981) beschrieben eine Methode, die auch für Wasser mit geringer Viruskonzentration geeignet ist. Nach Aluminiumsulfat-Flockung und Sedimentation der Präzipitate wird mehrmals zentrifugiert und resuspendiert, bevor im letzten Schritt die Ultrazentrifugation zum Einsatz kommt (Pusch et al. 2005).

3.2. Virusnachweis

Nach Aufkonzentrierung der Wasserproben kann mit der eigentlichen Detektion der Viren begonnen werden. Da im Vergleich zu diagnostischen Proben in umweltvirologischen Probenkonzentraten immer noch relativ wenige Viren zu finden sind, werden immunologische Methoden wie Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) hier äußerst selten verwendet. Die Detektion der Viren erfolgt daher fast ausschließlich entweder mit Zellkultur-Tests oder molekularbiologischen Methoden.

3.2.1. Zellkultur-Tests

Bevor sich in den 1990er Jahren molekularbiologische Methoden durchsetzten, war man in der Umweltvirologie auf Zellkultursysteme angewiesen. Nach Beimpfung einer geeigneten Zellkultur mit Virussuspension kommt es zur Infektion der Zellen und zur Virusvermehrung. Im Zellrasen sind dann sogenannte cytopathische Effekte (CPE), d. h. Veränderungen in der Zellmorphologie, lichtmikroskopisch sichtbar. Infektionen mit bestimmten Virustypen führen zu einer vollständigen Lyse der infizierten Zellen. In solchen Fällen können Plaque-Tests durchgeführt werden. Hier wird Agar zur Zellkultur gegeben, um den Viren lediglich eine Ausbreitung von Zelle zu Zelle zu ermöglichen. Somit entstehen definierte Plaques, die zur Quantifizierung verwendet werden können. Es wird entweder eine Zell-Monolayer mit Agar überschichtet oder Zellen werden in Agar suspendiert (Wyn-Jones und Sellwood 2001). Statt Plaque-Tests können auch Tests in Flüssigmedium durchgeführt werden. Üblicherweise werden hier ebenfalls Zell-Monolayer eingesetzt. Eine semiquantitative Auswertung ist möglich, indem verschiedene Verdünnungsstufen auf CPE untersucht werden.

Für den Nachweis der Gesamtzahl kultivierbarer Viren aus Wasserproben werden häufig Buffalo Green Monkey Kidney (BGM)-Zellen verwendet (United States Environmental Protection Agency 2001b; Lee und Jeong 2004; Sedmak et al. 2005). Mit diesen Ansätzen werden hauptsächlich Adeno-, Entero- und Reoviren detektiert. Darüber hinaus werden für wasservirologische Nachweise noch verschiedene andere Zelllinien eingesetzt, z. B. Human Adenocarcinoma of the Lung (A549)-, Human Adenocarcinoma of the Colon (CaCo-2)-, Human Epidermoid Carcinoma of the Larynx (HEp-2)-, Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)- und Human Rhabdomyosarcoma (RD)-Zellen (Fong und Lipp 2005; Pusch et al. 2005; Sedmak et al. 2005).

3.2.2. Molekularbiologischer Nachweis

Anfang der 1990er Jahre wurden Viren verbreitet mit Hilfe von Gensonden nachgewiesen (Dubrou et al. 1991; Enriquez et al. 1993). Aufgrund mangelnder Sensitivität konnte sich diese Methode jedoch nicht durchsetzen. Seitdem wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als

nahezu einziges molekularbiologisches Verfahren in der Umweltvirologie verwendet.

Zunächst muss das Erbmateriale der Viren aus dem Probenkonzentrat extrahiert werden. Viren besitzen als Erbmateriale entweder DNA oder RNA. Zielt der Nachweis sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Viren, muss das Extraktionsverfahren für DNA und RNA geeignet sein. Die immer noch relativ großen Volumina der Probenkonzentrate stellen darüber hinaus ein Problem dar. Bei Standardmethoden zur Nukleinsäureextraktion und bei kommerziell erhältlichen Systemen werden meist Ausgangsvolumina von weit unter einem Milliliter eingesetzt. Bei umweltvirologischen Nachweisen reichen solch geringe Volumina häufig nicht aus, um Zielorganismen zu detektieren. Mit der Aufkonzentrierung großer Wasservolumina geht außerdem eine Aufkonzentrierung von Schmutzstoffen und möglichen PCR-Inhibitoren einher (Bosch 1998). Die Extraktionsmethode sollte diese entfernen bzw. zumindest verringern. Basierend auf einer Arbeit von Boom et al. (1990) werden häufig Verfahren angewandt, bei denen Guanidinthiocyanat und Silikapartikel zugegeben werden (Puig et al. 1994; Bofill-Mas et al. 2000; Hundesa et al. 2006). Es werden drei Eigenschaften des chaotropen Salzes Guanidinthiocyanat ausgenutzt. Zum einen führt es zur Lyse der Virionen durch Denaturierung der Kapsidproteine (Maluquer de Motes et al. 2004) und somit zum Freiwerden der Nukleinsäuren, zum anderen werden Nukleasen inaktiviert. Schließlich binden die Nukleinsäuren in Anwesenheit des Salzes an zugegebene Silikapartikel. Nach mehreren Waschschritten werden die Nukleinsäuren mit Hilfe eines wässrigen Puffers mit niedrigem Salzgehalt von den Silikapartikeln eluiert. Nach diesem Prinzip können auch größere Probenvolumina (10 ml) extrahiert werden (Rajal et al. 2007a). Mit magnetischen Silikapartikeln kann die Effizienz der Extraktion noch gesteigert werden (Rutjes et al. 2005). Darüber hinaus werden auch klassische Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt, z. B. nach Proteinase K-Behandlung (Carducci et al. 2003). Auch die Trizol[®]-Methode beinhaltet die Reagenzien Guanidinthiocyanat, Phenol und Chloroform (Vilagines et al. 1997b; Huang et al. 2000).

Es wurden einige konventionelle Reverse Transkriptase (RT)-PCR-Verfahren für den Nachweis von RNA-Viren aus Wasserproben beschrieben (Schwab et al. 1996; Abbaszadegan et al. 1999). Bei konventionellen PCR-Verfahren ist immer eine Bestätigungsreaktion erforderlich, z. B. Hybridisierung. Häufiger wurde in der Umweltvirologie allerdings die nested PCR für DNA-Viren bzw. nested RT-PCR für RNA-Viren verwendet (Pina et al. 1998; Bofill-Mas und Girones 2001; van Heerden et al. 2005; McQuaig et al. 2006), bei der das Endprodukt der ersten PCR-Runde als Template der zweiten Runde dient. Diese Methode hat den Vorteil, dass auch sehr geringe Nukleinsäuremengen nach zwei PCR-Runden zu sichtbaren Signalen führen. Außerdem fungiert die zweite PCR-Runde als Bestätigungsreaktion. In den letzten Jahren setzen sich (quantitative) Real-Time PCR-Verfahren durch, sowohl für DNA- als auch für RNA-Viren (He und Jiang 2005; Jimenez-Clavero et al. 2005; Gregory et al. 2006; Haramoto et al. 2010). Auch hier ist die Bestätigungsreaktion bereits im Verfahren enthalten. Werden definierte Virus-Standards in den PCR-Läufen mitgeführt, können die Ergebnisse quantitativ ausgewertet werden. Sowohl für konventionelle als auch für nested und Real-Time PCR-Verfahren wurden diverse Multiplex-Varianten entwickelt, mit deren Hilfe mehrere Virusspezies gleichzeitig detektiert werden können (Fout et al. 2003; Formiga-Cruz et al. 2005; Wolf et al. 2010)

3.2.3. Vor- und Nachteile der Nachweismethoden

Der wichtigste Vorteil von Detektionsverfahren mit Zellkulturen besteht darin, dass zugleich die Infektiosität der Viren bestätigt wird. Hinzu kommt noch, dass mit bestimmten Zelllinien gleichzeitig eine Vielzahl verschiedener Viren nachgewiesen werden kann. Zellkulturen zu pflegen und Tests mit ihnen durchzuführen ist allerdings zeitlich sehr aufwändig. Außerdem gibt es Viren wie z. B. Noroviren, die sich nur sehr schwer oder überhaupt nicht in Zellkulturen anzüchten lassen. Solche Viren können nur molekularbiologisch erfasst werden. Weiter führen molekularbiologische Methoden sehr schnell zu Ergebnissen, daneben ist ihre Sensitivität gerade in der Umweltvirologie von großem Vorteil. Durch die Verwendung spezifischer Primer in den PCR-Reaktionen werden die Viren identifiziert, abhängig vom Primer-Design auf Spezies-, Serotyp- oder Genotypniveau

(Le Guyader et al. 1994; Haramoto et al. 2005; Jothikumar et al. 2005). Mit Hilfe der PCR kann jedoch nicht entschieden werden, ob die detektierten Genomabschnitte von infektiösen oder nicht infektiösen Viren stammten. Die Tatsache, dass in Folge der nötigen Aufkonzentrierung der Wasserproben neben den Viren auch organische Substanzen in erhöhter Konzentration vorliegen, führt zu einem Sensitivitätsverlust des molekularbiologischen Nachweises durch Inhibition der PCR-Reaktionen. Vor allem Humin- und Fulvinsäuren hemmen die Aktivität von reversen Transkriptasen und Polymerasen (Wilson 1997; Wyn-Jones und Sellwood 2001). Trotzdem werden mit PCR-Verfahren meist mehr positive Befunde ermittelt als mit Zellkulturtests, wenn beide Methoden parallel angewandt werden (Abbaszadegan et al. 1999; Pusch et al. 2005). Um eine mögliche Inhibition der PCR-Reaktionen sichtbar zu machen, sollten Amplifikationskontrollen mitgeführt werden (Gregory et al. 2006; Hoffmann et al. 2006). Schließlich sind PCR-Methoden im Allgemeinen recht anfällig für Kontaminationen und somit für falsch positive Ergebnisse. Dies gilt besonders für nested PCR-Verfahren, da hier die amplifizierten Produkte der ersten in eine zweite PCR-Runde eingesetzt werden. Deshalb sollten die einzelnen Nachweisschritte (Nukleinsäureextraktion, Herstellung des Mastermix, Zugabe der Nukleinsäuren, Gelelektrophorese) in verschiedenen Räumen oder zumindest an verschiedenen Arbeitsplätzen durchgeführt werden (Aslanzadeh 2004). Etwaige trotzdem auftretende falsch positive Ergebnisse werden mit Hilfe von Negativkontrollen als solche erkannt.

Um die Vorteile beider Methoden auszunützen, können Zellkultur- und PCR-Verfahren als sogenannte Integrated Cell Culture (ICC)-PCR kombiniert werden. Zunächst wird eine Zellkultur mit Probenkonzentrat beimpft. Nach Vermehrung der Viren erfolgen Nukleinsäureextraktion aus den Zelllysaten und PCR. So wird sichergestellt, dass nur infektiöse Viren detektiert werden. Auch sehr geringe Konzentrationen von Viren können aufgrund der Vermehrung in Zellkultur so weit erhöht werden, dass sie mit PCR nachweisbar werden. Außerdem werden im Probenkonzentrat vorhandene PCR-Inhibitoren durch Zugabe von Nährmedium verdünnt. Reine Kulturnachweise dauern oft deutlich länger als ICC-PCR-Verfahren,

da sich manche Viren zwar relativ schnell vermehren, CPE jedoch erst mit Verzögerung sichtbar werden (Reynolds et al. 1996; Greening et al. 2002). Mit ICC-PCR werden mehr Proben als Virus-positiv erkannt als mit konventionellen Zellkultur-Tests (Lee und Jeong 2004; Lee et al. 2005), dies gilt auch für desinfizierte Wässer (Blackmer et al. 2000). Dagegen wird die Konzentration von infektiösen Viren in Wasserproben durch die Anwendung von reinen PCR-Verfahren im Vergleich zu ICC-PCR-Methoden häufig stark überschätzt (Shieh et al. 2008).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Viren

Als Indikatoren für virale Verunreinigungen in Trink- und Tränkwasser wurden humane und porcine Adenoviren sowie bovine Polyomaviren ausgewählt. Für diese Indikatorviren und für Influenzaviren wurden Nachweismethoden entwickelt. Zur Etablierung der PCR-Nachweise und zur künstlichen Kontamination der Wasserproben wurden Viren von verschiedenen Quellen bezogen und zum Teil im Rahmen dieser Arbeit vermehrt.

1.1. Eingesetzte Virustypen

Humane Adenoviren 2 (Health Protection Agency, Großbritannien), porcine Adenoviren A (Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Insel Riems), aviäre Influenzaviren H10N7 (LGL), porcine Influenzaviren H3N2 (Impfviren, Firma idt, Dessau-Roßlau) sowie aviäre Polyomaviren (Universität Leipzig) wurden verwendet. Bei den Polyomaviren waren bovine die Zielorganismen. Da die Polyomavirus-PCR (s. III. 3.2.3.) sowohl aviäre als auch bovine Viren detektiert, konnten aviäre Polyomaviren als Positivkontrollen eingesetzt werden. Hochkonzentrierte Suspensionen der Influenzaviren H10N7 und H3N2 sowie der aviären Polyomaviren wurden vom Fachlabor Veterinärwesen des LGL zur Verfügung gestellt. Suspensionen von porcinen Adenoviren wurden hergestellt, indem der lyophilisierte Inhalt eines vom FLI erhaltenen Röhrchens in 2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline; s. Anhang: IX. 1.1.3.1) gelöst wurde. Mit humanen Adenoviren wurden die meisten Versuche durchgeführt. Die hierfür benötigten Viren wurden in Zellkultur vermehrt.

1.2. Vermehrung von humanen Adenoviren

Zur Vermehrung von humanen Adenoviren 2 wurden A549-Zellen (European Collection of Cell Cultures, Großbritannien) – robuste, schnell wachsende Zellen – verwendet. Das Wachstumsmedium der Zellen bestand aus Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM; Biochrom, Berlin) und 10 % Fötalem Kälberserum (FKS; PAA, Cölbe). Die

Zellen wurden bei 37 °C bebrütet. Einmal wöchentlich wurde ein Sechstel der Zellen nach Trypsinisierung in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt. Zur Vermehrung der Viren wurde von einer eine Woche gewachsenen Zellkultur das Medium abgesaugt und die Zellen mit einigen Millilitern Virussuspension überschichtet. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Virussuspension abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches MEM mit 2 % FKS zugegeben. Nach siebentägiger Bebrütung wurde die Zellkulturflasche bei -20 °C eingefroren, je zweimal aufgetaut und wieder eingefroren. Nach dem dritten Auftauen konnten die geplatzten Zellbestandteile bei 175 x g in 5 min abzentrifugiert werden. Die Überstände, die die vermehrten Adenoviren enthielten, wurden portioniert und bei -20 °C gelagert.

2. Aufkonzentrierung der Wasserproben

Die Aufkonzentrierung der Wasserproben erfolgte mit Hilfe von „Adsorptions-/Elutionsmethoden“ mit Glaswolle (Ouest Isol, Alizay, Frankreich) als Filtermaterial bzw. der Virosorb® 1MDS-Filterkartusche (3M, Neuss). Die Viren wurden zunächst elektrostatisch an das Filtermaterial gebunden. Durch Zugabe einer alkalischen proteinhaltigen Pufferlösung wurde diese Bindung gelöst. Die Viren befanden sich dann in der Pufferlösung. Durch Absenkung des pH-Wertes in der Pufferlösung kam es zu einer Protein-Fällung, wobei die Viren in den Protein-Flocken enthalten waren. Nach Zentrifugation sammelten sich die Viren im Pellet, das mit Hilfe eines geringen Volumens an Phosphatpuffer resuspendiert werden konnte.

Um sicher zu stellen, dass die mehrfach verwendeten Materialien (Glasgefäße, Filtrationssäulen, Schläuche, pH-Elektroden, Zentrifugationsgefäße) nach Desinfektion und Reinigung (s. Anhang: IX. 1.1.2.1.) keine DNA-Reste mehr enthielten, wurde regelmäßig eine negative Prozesskontrolle mitgeführt. Dazu wurden 10 l Wasser (5 l Leitungswasser + 5 l destilliertes Wasser) als normale Probe behandelt und die erhaltenen Konzentrate mit Hilfe der verschiedenen PCR-Reaktionen (s. III. 3.2.) untersucht.

2.1. Aufkonzentrierung mit Glaswollfilter

Fast alle Wasserproben wurden über Glaswolle filtriert. Es werden die hauptsächlich verwendete Methode und Variationen von Einzelschritten innerhalb dieser Methode beschrieben.

10 l-Wasserproben wurden entweder nur mit humanen Adenoviren (HAdV), mit HAdV sowie Influenzaviren oder mit HAdV, Influenza-, Polyoma- und porzinen Adenoviren versetzt. Bei einem Großteil der Versuche wurden ca. 10^4 bis 10^5 HAdV-Viruspartikel zu 10 l Wasser gegeben, dies entsprach einer Ausgangskonzentration von 1 bis 10 Viruspartikel pro ml Wasserprobe. Diese Ausgangskonzentration wurde erreicht, indem die selbst vermehrten Viren (s. III. 1.2.) 1:100 bis 1:1000 in PBS verdünnt wurden und 1 ml dieser Verdünnung eingesetzt wurde. Von den anderen Viren wurde ebenfalls je 1 ml der 1:100- bzw. 1:1000-Verdünnungen verwendet. Hier konnte die Ausgangskonzentration nicht festgelegt werden, da eine Virus-Quantifizierung über (RT-)PCR aufgrund fehlender DNA- bzw. RNA-Standards nicht möglich war.

2.1.1. Hauptmethode

Die Aufkonzentrierung erfolgte in der Regel nach folgendem Schema: Für die Etablierung der Nachweismethoden wurde mit Probenvolumina von 10 l (5 l Leitungswasser + 5 l destilliertes Wasser) gearbeitet, die mit Viren künstlich kontaminiert wurden. Zur Filtration wurde das Wasser über einen autoklavierbaren Silikonschlauch in eine Kunststoffsäule (s. Abb. 1) gepumpt (Filtrationsgeschwindigkeit: 1 Liter pro Minute), die als Filtermaterial 10 g Glaswolle enthielt.



Abb. 1: Filtrationssäule mit Glaswollfilter

Bei den gezielt mit Testviren versetzten Proben wurde das Filtrat aufgefangen und anschließend autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min), um die nicht an die Glaswolle gebundenen Viren zu inaktivieren. Nach der Filtration wurde der untere Ausgang der Säule verschlossen (Quetschhahn am Schlauch) und die Säule mit 200 ml 3 %igem sterilisierten Fleischextrakt-Glycin-Puffer (pH 9,5; s. Anhang: IX. 1.1.3.2.) gefüllt. Nach einer Wartezeit von 10 min wurde der Quetschhahn leicht geöffnet, so dass in 30 bis 45 min die gesamte Puffermenge in ein Becherglas tropfte. Die in der Glaswolle verbliebene Pufferlösung wurde mit Hilfe einer Glaspipette ausgepresst. Danach wurde zur Protein-Fällung der pH-Wert im Eluat mit Hilfe von 1 N Salzsäure auf ca. 3,3 abgesenkt und das Eluat bei 4.400 x g und 5 °C für 30 bis 60 min zentrifugiert. Es folgte das vorsichtige Abgießen des Überstands und sein Autoklavieren vor der Entsorgung. Nach Lösen des Pellets in 10 ml PBS wurde das erhaltene Probenkonzentrat in zwei 5 ml-Portionen aufgeteilt. Diese konnten sofort für die Nukleinsäureextraktion oder das Beimpfen von Zellkulturen eingesetzt werden oder bei -20 °C gelagert werden.

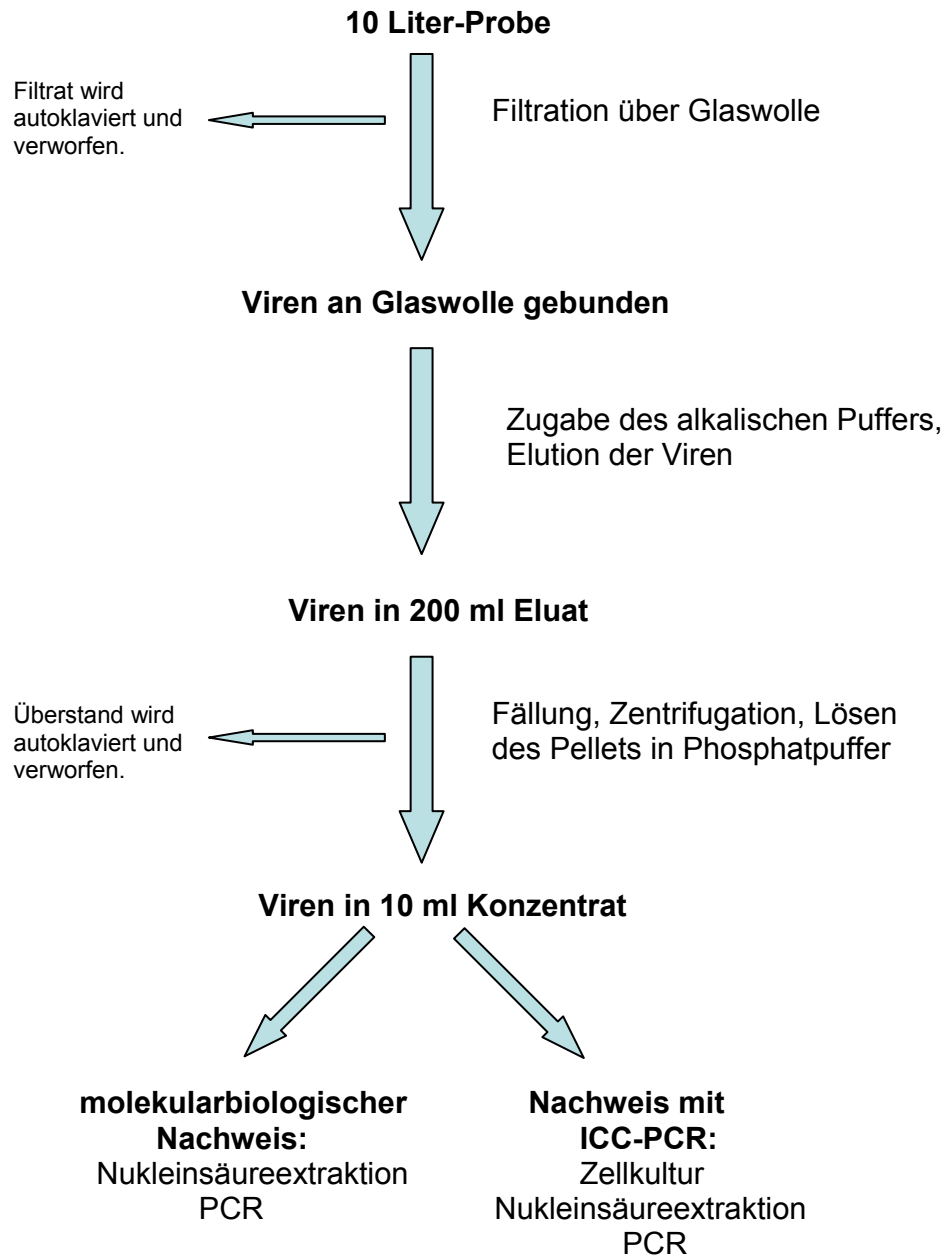


Abb. 2: Schema der Aufkonzentrierung von Wasserproben

2.1.2. Variationen der Hauptmethode

Zum Teil wurden einzelne Parameter in der obigen Beschreibung der Aufkonzentrierung variiert, um Faktoren zu identifizieren, die die Wiederfindungsrate beeinflussen (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Variationen der Glasswolle-Hauptmethode

	Hauptmethode	Varianten
pH-Wert der Wasserprobe	keine Veränderung	Einstellung auf ca. 3,5
Filtrationsgeschwindigkeit	1 l/min	a) 0,5 l/min b) 1,5 l/min
Filtrationssäule	Standard-Säule (ø 3,2 cm), 10 g Glaswolle	a) größere Säule (ø 6,0 cm), 40 bis 50 g Glaswolle b) Standard-Säule, 15 g Glaswolle (3 Fraktionen) c) Standard-Säule, 15 g Glaswolle (3 Fraktionen + Moskitonetz) d) Standard-Säule, 10 g Glaswolle anderer Hersteller
Elutionspuffer	3 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer	a) 0,5 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer b) Magermilch-Glycin-Puffer
Fällung und Zentrifugation	pH-Wert-Absenkung auf 3,3 + einmalige Zentrifugation bei 4.400 x g	a) pH-Wert-Absenkung auf 3,2 + einmalige Zentrifugation bei 4.400 x g b) pH-Wert-Absenkung auf 3,4 + einmalige Zentrifugation bei 4.400 x g c) pH-Wert-Absenkung auf 3,3 + zweimalige Zentrifugation bei 4.400 x g d) pH-Wert-Absenkung auf 3,3 + Ultrazentrifugation bei 40.000 x g e) PEG-Zugabe + einmalige Zentrifugation bei 4.400 x g f) pH-Wert-Absenkung auf 3,3 + einmalige Zentrifugation bei 4.400 x g + Ultrafiltration

2.1.2.1. pH-Wert der Wasserprobe

Normalerweise wurde der Ausgangs-pH-Wert der Wasserprobe nicht verändert. Bei einigen Proben wurde der pH-Wert vor der Filtration in den sauren Bereich (etwa 3,5) verschoben.

2.1.2.2. Filtrationsgeschwindigkeit

Durch verschiedene Einstellungen an der Pumpe wurde eine Filtrationsgeschwindigkeit zwischen 0,5 und 1,5 Litern pro Minute erreicht.

So konnte überprüft werden, ob die Filtrationsgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Wiederfindungsrate hatte.

2.1.2.3. Filtrationssäulen, Glaswolle und Elutionspuffer

Neben den Standard-Filtrationssäulen wurden auch größere Säulen mit fast doppeltem Durchmesser verwendet (s. Anhang: IX. 1.1.1.), die 40 bis 50 g Glaswolle enthielten, damit eine größere Oberfläche für die Virusadsorption zur Verfügung stand. Die Elution erfolgte hier mit dem im Vergleich zur Standard-Säule doppelten Volumen Fleischextrakt-Glycin-Puffer (400 ml).

Zur Vergrößerung der Oberfläche des Glaswollfilters im Vergleich zur Hauptmethode wurden noch andere Maßnahmen ergriffen. Zunächst wurden in die Standard-Filtrationssäule statt 10 g 15 g Glaswolle gegeben. Die Glaswolle wurde dabei vor dem Befüllen in drei Fraktionen aufgeteilt, die nacheinander in die Säule eingefüllt wurden (Vilagines et al. 1993). Eine weitere Variante bestand darin, kleine Stücke Moskitonetz zwischen die Fraktionen zu legen, was zu einer Verbesserung der Wiederfindungsraten führen sollte (persönliche Mitteilung: M. B. Taylor, University of Pretoria, Südafrika). Neben der Glaswolle der Firma Owest-Isol wurden drei verschiedene andere Produkte eingesetzt: langfaserige DMCS-behandelte Glaswolle (Macherey-Nagel, Düren), feinstfaserige silanisierte Glasfaserwatte (Macherey-Nagel) und Steinwolle (BayWa, Unterschleißheim).

Um zu prüfen, ob mit anderen Elutionspuffern bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit 3 %igem Fleischextrakt-Glycin-Puffer, wurde mit 0,5 %igem Fleischextrakt-Glycin-Puffer bzw. mit Magermilch-Glycin-Puffer (s. Anhang: IX. 1.1.3.2.) eluiert.

2.1.2.4. Fällung und Zentrifugation

Der pH-Wert der Eluate wurde auf Werte zwischen 3,2 und 3,4 abgesenkt. In einigen Experimenten wurden die Überstände der zentrifugierten Eluate erneut zentrifugiert und die erhaltenen Pellets ebenfalls untersucht, um festzustellen, ob ein nennenswerter Anteil der Viren im Überstand zurückblieb. Statt der Zentrifugation bei 4.400 x g wurden einige Eluate bei

40.000 x g (2 h; 4 °C) ultrazentrifugiert. Davor wurde der pH-Wert ebenfalls auf ca. 3,3 abgesenkt.

Statt Fällung durch pH-Absenkung wurden in einigen Versuchen 20 g Polyethylenglykol (PEG 8000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 2,4 g Natriumchlorid zu 200 ml Eluat gegeben. Davor wurde das Eluat auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Nach der Zugabe von PEG und Natriumchlorid wurde das Eluat 1 bis 18 h bei 4 °C gerührt (Vilagines et al. 1997b; Huang et al. 2000; van Heerden et al. 2005). Danach wurden die Suspensionen zentrifugiert und wie üblich weiter verfahren.

2.1.2.5. Weitere Konzentrierung durch Ultrafiltration

Ein weiterer Ansatz war, mit Hilfe der Ultrafiltration eine stärkere Aufkonzentrierung zu erreichen. Die mit der oben beschriebenen Adsorptions-/Elutionsmethode erhaltenen Konzentrate wurden in Ultrafiltrationsröhrchen (Vivaspin 20, Sartorius Stedim, Göttingen) bei 4.400 x g 30 min zentrifugiert und die Nukleinsäuren aus dem Retentat mit dem QIAamp® Viral RNA Mini (s. III. 3.1.) extrahiert.

2.2. Aufkonzentrierung mit der Virosorb® 1MDS-Filterkartusche

Zur Aufkonzentrierung wurde hier statt Glaswolle ein System mit positiv geladenem Filtermaterial, die Virosorb® 1MDS-Filterkartusche verwendet (United States Environmental Protection Agency 2001a). Der Ablauf war mit der Glaswolle-Methode vergleichbar. Die Probe wurde durch die Kartusche gepumpt und anschließend mit 3 %igem Fleischextrakt-Glycin-Puffer (Volumen: 1 l) eluiert. Die Aufkonzentrierung wurde mit organischer Flockung durch pH-Wert-Absenkung und Zentrifugation abgeschlossen.

3. Molekularbiologischer Virusnachweis

Für den molekularbiologischen Virusnachweis mussten zunächst die Nukleinsäuren von DNA- und RNA-Viren extrahiert werden. Die Nukleinsäureextrakte wurden dann in verschiedene PCR-Reaktionen eingesetzt. Bei jeder Extraktion und jeder PCR-Reaktion wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

3.1. Nukleinsäureextraktion

Die Nukleinsäuren aus 5 ml Konzentrat wurden mit Hilfe eines Guanidinthiocyanat-haltigen Lysepuffers und magnetischen Silikapartikeln extrahiert. Das Prinzip dieser Extraktionsmethode wurde von Boom et al. (1990) beschrieben, die Methode musste allerdings auf die großen Ausgangsvolumina von 5 ml angepasst werden. Zur Lyse der Virionen wurden zu 5 ml Probenkonzentrat 10 ml NucliSENS® easyMAG® Lysispuffer (Biomérieux, Nürtingen) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die weitere Extraktion wurden magnetische Silikapartikel sowie Wasch- und Elutionspuffer der Firma Biomérieux verwendet (NucliSENS® Magnetic Extraction Reagents). Nach der Lyse wurden 50 µl Silikasuspension zupipettiert und die Probe gemischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur, in denen die Nukleinsäuren an die Silikapartikel gebunden wurden, wurde das Röhrchen in einen Magnetständer (Novagen® Magnetight Separation Stand, VWR International, Darmstadt) gestellt und der Überstand mit Pasteurpipetten abgesaugt. Nach Entfernen des Magnets wurden die Silikapartikel in 400 µl Waschpuffer 1 resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde zum Waschen 30 s im Vortex aufgeschüttelt, das Reaktionsgefäß wieder in den Magnetständer gestellt und der Überstand erneut abpipettiert. Der Waschschrift wurde mit 400 µl Waschpuffer 1 wiederholt. Dann folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl Waschpuffer 2, wobei nach dem ersten Schritt die gesamte Probe in ein neues Reaktionsgefäß übertragen wurde. Nach einem letzten Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer 3 (15 s vortexen) wurden 50 µl Elutionspuffer zu den Silikapartikeln gegeben und die Reaktionsgefäße 5 min bei 60 °C mit 1400 Umdrehungen pro Minute geschüttelt (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg), um die gereinigten Nukleinsäuren von den Silikapartikeln zu lösen. Danach wurden die Reaktionsgefäße wieder im Magnetständer platziert und der Überstand in ein sauberes Gefäß überführt. Eine zweite Elution erfolgte mit weiteren 50 µl Elutionspuffer, so dass sich ein Endvolumen von 100 µl Nukleinsäure-Extrakt ergab. Die Extrakte wurden bei -80 °C gelagert und jeweils 5 bis 10 µl davon pro PCR-Reaktion eingesetzt.

In mehreren Versuchsreihen wurde daran gearbeitet, die Effizienz der Nukleinsäureextraktion durch Zerstörung der in den Konzentraten enthaltenen Partikel zu steigern. Dafür wurden die Konzentrate vor der Extraktion für 10 min in ein Ultraschall-Reinigungsbad gestellt bzw. einmal oder mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Varianten bei der Nukleinsäureextraktion

Hauptmethode	Varianten
Extraktion mit NucliSENS®-Reagenzien	a) Ultraschallbehandlung des Konzentrats + Extraktion mit NucliSENS®-Reagenzien b) Einfrieren und Auftauen des Konzentrats + Extraktion mit NucliSENS®-Reagenzien c) Extraktion mit NucleoSpin® RNA Virus F Kit

Aus einigen Konzentraten wurden die Nukleinsäuren mit dem NucleoSpin® RNA Virus F Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben extrahiert, das Ausgangsvolumen betrug 1 ml. Außerdem wurde für Suspensionen, in denen eine hohe Viruskonzentration zu erwarten war, das QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, beispielsweise für die zur künstlichen Kontamination der Proben verwendeten Virussuspensionen oder Zellkulturüberstände. Das eingesetzte Probenvolumen war hier 140 µl, zur Elution wurden 80 µl (zweimal hintereinander 40 µl) Puffer zugegeben (s. Anhang: IX. 1.2.). Sowohl mit diesen beiden Kits als auch mit der zuvor beschriebenen Extraktionsmethode mit magnetischen Silikapartikeln können die Nukleinsäuren von RNA- und DNA-Viren extrahiert werden.

Die Lyse- und Waschpuffer aller verwendeten Verfahren enthielten Guanidinsalze. Sinkt der pH-Wert von Lösungen mit Guanidinsalzen in den sauren Bereich, können toxische Gase entstehen. Daher wurden während der Extraktion die Abfalllösungen gesammelt und ca. 1 g Natriumhydroxid-Plätzchen pro 50 ml Lösung zugegeben. Die alkalische Lösung wurde als Sondermüll entsorgt.

3.2. PCR-Verfahren

Die für die PCR-Nachweise benötigten Primer und Sonden (s. Tab. 6) stammten von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Tib Molbiol (Berlin), Nuklease-freies Wasser von Promega (Mannheim) und Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)-Lösung von Invitrogen (Karlsruhe) bzw. Promega. Für die konventionelle PCR wurden der MasterCycler® 5333 (Eppendorf, Hamburg), für die Real-Time PCR die Geräte Stratagene Mx3000P® und Mx3005P® (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einem 2 %igen Agarose-Gel (peqGOLD Universal Agarose; Peqlab Biotechnologie, Erlangen), als DNA-Farbstoff diente Ethidiumbromid.

In den folgenden Abschnitten werden die Protokolle der PCR-Ansätze aufgeführt. Um die hemmende Wirkung organischer Substanzen in den Probenkonzentraten auf die PCR-Reaktionen zu verringern, wurden ab den Sommerproben 2008 (s. III. 7.2.) zusätzlich 2 µg bovines Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro µl Mastermix zugegeben.

3.2.1. Nested und Real-Time PCR für humane Adenoviren

Die nested PCR zum Nachweis humaner Adenoviren (degenerierte Primer: Allard et al. 2001) wurde bereits im Rahmen des EU-Projektes „Virobathe“ am LGL etabliert (www.virobathe.org). Die Zielsequenz liegt in einem konservierten Bereich des Hexon-Gens. In der ersten PCR-Runde enthielt ein 50 µl-Ansatz 19,8 µl Nuklease-freies Wasser, 5 µl 10 x Platinum® Taq Puffer (Invitrogen), 3 µl 25 mM $MgCl_2$ -Lösung, 5 µl Nukleotid-Mix (2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 5 mM dUTP; Promega), je 0,5 µl 50 µM Primer Hex1 und Hex2, 5 µl interne Amplifikationskontrolle (10 pg/ ml) (AdenoIac, Yorkshire Bioscience, York, Großbritannien), 1 µl Uracil-N-Glycosylase (1 U/ µl, Invitrogen), 0,2 µl Platinum® Taq (5 U/ µl, Invitrogen) und 10 µl Nukleinsäureextrakt. Der 50 µl-Ansatz für die zweite Runde bestand aus 36,8 µl Wasser, 5 µl 10 x Platinum® Taq Puffer, 3 µl 25 mM $MgCl_2$ -Lösung, 2 µl Nukleotid-Mix (s.o.), je 0,5 µl 50 µM Primer Hex3 und Hex4, 0,2 µl Platinum® Taq (5 U/ µl) und 2 µl PCR-Produkt der ersten Runde. In der ersten PCR-Runde wurden zunächst Kontaminationen durch die Aktivierung der Uracil-N-Glycosylase

zerstört (50 °C, 10 min), dann diese wieder inaktiviert und die Polymerase aktiviert (95 °C, 10 min). Nach 45 PCR-Zyklen (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s und 72 °C, 1 min) erfolgte ein letzter Extensionsschritt (72 °C, 5 min). Das Thermoprotokoll der zweiten Runde hatte die folgenden Komponenten: Denaturierung (94 °C, 3 min), 45 Zyklen (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s und 72 °C, 1 min) und Extension (72 °C, 5 min).

Um eine Quantifizierung der in den Proben vorhandenen DNA-Mengen zu ermöglichen und um die Wiederfindungsraten der Aufkonzentrierungsmethode zu bestimmen, war zusätzlich zur nested PCR- eine Real-Time PCR-Methode nötig. Bei dieser TaqMan®-Methode wurden zwei degenerierte Primer (AdF und AdR) und eine Sonde (AdP1) verwendet, deren Sequenzen ebenfalls in einem Fragment des Hexon-Gens von humanen Adenoviren liegen (Hernroth et al. 2002; Calgua et al. 2008). Die Amplifikation wurde in einem 25 µl-Ansatz durchgeführt, der 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), je 1 µl 22,5 µM Primer AdF bzw. AdR und 0,5 µl 11,25 µM Sonde AdP1 sowie 10 µl Nukleinsäureextrakt enthielt. Nach der Aktivierung der im TaqMan® Universal PCR Master Mix enthaltenen Uracil-N-Glycosylase (50 °C, 2 min) und der Taq-Polymerase (95 °C, 10 min) folgten 45 PCR-Zyklen (95 °C, 15 s und 60 °C, 1 min). Zum Erstellen von Standardkurven und somit zur Quantifizierung wurde Adenovirus 5-DNA (Tebu-Bio, Offenbach) verwendet. Außerdem wurde die quantifizierte Adenovirus 5-DNA zur Inhibitionskontrolle bei der Untersuchung der Trinkwasserproben eingesetzt. Für die Kontrollreaktion wurden 5 µl Nukleinsäureextrakt der Probe und 5 µl Wasser, das 500 Adenovirus 5-Genomkopien enthielt, in der PCR untersucht. Dieses Ergebnis wurde mit dem Wert für 500 Genomkopien in 10 µl Wasser (ohne Proben-DNA-Extrakt) verglichen. Hemmstoffe im Probenextrakt führen zu schwächeren PCR-Signalen.

Tabelle 6: Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden

Zielviren	PCR	Primer bzw. Sonde	Sequenz (5' - 3')	Literatur
Humane Adeno- viren	nested PCR	Hex1	GCCSCARTGGKWCATGACATC	Allard et al. 2001
		Hex2	CAGCACSCCICGRATGTCAA	
		Hex3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	
		Hex4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	
	Real- Time PCR	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG	Hernroth et al. 2002
		AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
		AdP1	6FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCT-TAMRA	
Porzine Adeno- viren	nested PCR	PAV1	GATGTCATGGAYAACGTCAAC	Maluquer de Motes et al. 2004
		PAV2	CACGGAGGAGTCRAACTGGATG	
		PAV3	TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT	
		PAV4	GGAATGGAGATGGGCAGGTT	
Polyoma- viren	PCR	BPV1	TGCTTATGTGGGARGCTGT	nicht veröffent- licht
		BPV2	TCTGGRCACCAACTCAA	
Influenza A-Viren	Real- Time RT- PCR	IVA1-f	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	Spackman et al. 2002
		IVA1-r	TGCAAAAACATCTTCAAGTYTCTG	
		IVA1-S	6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1	
		IVA2-f	TCGAGGGCGACACCCTG	
		IVA2-r	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	
		IVA2-S	HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1	

degenerierte Primer:

K = G oder T; M = A oder C; R = G oder A; S = C oder G; W = A oder T; Y = C oder T;
I = Inosin

Farbstoffe bei Sonden:

6FAM: 6-Carboxy-Fluorescein

TAMRA: 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin

BHQ1: 2,5-Di-tert-Butylhydroquinon-1

HEX: Hexachlorfluorescein

3.2.2. Nested PCR für porcine Adenoviren

Für Adenoviren des Schweins wurde eine nested PCR mit degenerierten Primern nach Maluquer de Motes et al. (2004) durchgeführt. Auch hier war ein Bereich des Hexon-Gens die Zielsequenz. In der ersten PCR-Runde bestand ein 50 µl-Ansatz aus 30,1 µl Wasser, 5 µl 10 x Platinum® Taq Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs, je 0,5 µl 50 µM Primer PAV1 und PAV2, 0,4 µl Platinum® Taq (5 U/ µl) und 10 µl DNA-Extrakt. Für die zweite Runde wurden folgende Komponenten benötigt: 39,3 µl Wasser, 5 µl 10 x Platinum® Taq Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs, je 0,4 µl 20 µM Primer PAV3 und PAV4, 0,4 µl Platinum® Taq (5 U/ µl) und 1 µl PCR-Produkt der ersten Runde. Das Thermoprotokoll der ersten Runde lautet wie folgt: 94 °C, 4 min; 30 Zyklen (92 °C, 1 min; 54 °C, 1 min und 72 °C, 1 min 15 s); 72 °C, 7 min. Das Protokoll für die zweite Runde entsprach mit einer Ausnahme dem der ersten: Die Annealing-Temperatur wurde von 54 °C auf 57 °C erhöht.

3.2.3. PCR für Polyomaviren

Die degenerierten Primer und das PCR-Protokoll für aviäre und bovine Polyomaviren wurden am LGL entwickelt (Fachlabor Veterinärwesen, Prof. M. Büttner, nicht veröffentlicht). Durch „Wobbles“ innerhalb der Primer-Sequenzen, d. h. durch die Mischung verschiedener Basen an einer Position (R = A oder G; s. Tab. 6), können sowohl aviäre als auch bovine Polyomaviren mit dieser PCR detektiert werden. Ein 50 µl-Ansatz enthielt 31 µl Wasser, 5 µl 10 x Platinum® Taq Puffer, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs, je 0,5 µl 50 µM Primer BPV1 und BPV2, 0,5 µl Platinum® Taq (5 U/ µl) und 10 µl DNA-Extrakt. Das Thermoprotokoll bestand aus folgenden Einzelschritten: 94 °C, 2 min; 35 Zyklen (94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min 15 s und 72 °C, 1 min 15 s); 72 °C, 5 min.

3.2.4. Real-Time RT (Reverse Transkriptase)-PCR für Inflenzaviren

Zur Detektion von Influenza A-Viren wurde eine Real-Time RT-PCR nach Spackman et al. (2002) verwendet. Die Methode kam am LGL auch bei der Untersuchung von Vögeln auf aviäre Influenza zum Einsatz, mit ihr können jedoch auch Influenza A-Viren des Menschen und von anderen

Tieren nachgewiesen werden. Die Zielsequenz liegt in einer konservierten Region des Matrix-Gens des Virus. Um zu überprüfen, ob bestimmte Inhaltsstoffe der Probe die PCR-Reaktion hemmen, wurde eine interne Amplifikationskontrolle (Hoffmann et al. 2006) eingesetzt (Intype IC-RNA, Labor Diagnostik Leipzig). Ein 25 µl-Ansatz enthielt 12,5 µl Reaction Mix und 1 µl Enzymmix aus dem Kit „Super Script™ III One-Step RT-PCR System“ (Invitrogen), dazu jeweils 2 µl Primer-Mischungen (IVA1-Mix zur Detektion der Ziel-RNA und IVA2-Mix zur Detektion der Kontroll-RNA), 2 µl Wasser, 0,5 µl Kontroll-RNA (2×10^5 Kopien/µl) und 5 µl Nukleinsäure-Extrakt. 200 µl des IVA1-Mix bestanden aus 20 µl Primer IVA1-f (100 µM), 30 µl IVA1-r (100 µM), 2,5 µl Sonde IVA1-S (100 µM) und 147,5 µl Wasser. 200 µl des IVA2-Mix setzten sich aus 5 µl Primer IVA2-f (100 µM), 5 µl IVA2-r (100 µM), 2,5 µl Sonde IVA2-S (100 µM) und 187,5 µl Wasser zusammen. Nach der Reversen Transkription (50 °C, 30 min) und der Aktivierung der Taq-Polymerase (94 °C, 2 min) folgten 50 PCR-Zyklen (94 °C, 30 s; 57 °C, 30 s und 68 °C, 30 s).

4. Bestimmung der Wiederfindungsraten beim Virusnachweis

Um die Effizienz der Gesamtmethode zum Virusnachweis bewerten zu können, wurden Wiederfindungsraten ermittelt. Dabei handelte sich um quantitative Wiederfindungsraten. Eine zehnprozentige Wiederfindungsrate bedeutet also nicht, dass von zehn künstlich kontaminierten Proben nur eine als positiv erkannt wurde. Vielmehr wird bei einer Zugabe von z. B. 1.000 Viren zur Wasserprobe vor der Aufkonzentrierung ein PCR-Ergebnis erzielt, aus dem sich eine Zugabe von nur 100 Viren berechnen lässt. Wiederfindungsraten konnten für HAdV und Influenzaviren relativ einfach bestimmt werden, da Real-Time PCR-Nachweise verwendet wurden. Die meisten Versuche wurden mit humanen Adenoviren durchgeführt, da sie im Rahmen dieser Arbeit je nach Bedarf vermehrt wurden und somit unbegrenzt zur Verfügung standen.

Bei jeder Nukleinsäureextraktion aus den 5 ml-Konzentraten künstlich kontaminierter Proben wurde eine zusätzliche Probe mitgeführt. Diese

fungierte sowohl als Positivkontrolle für die Extraktion, sie diente aber auch zur Bestimmung der ursprünglichen Viruskonzentration in der Wasserprobe. Sie bestand aus 4,5 ml PBS und 0,5 ml der Virussuspension, die zur künstlichen Kontamination der jeweiligen Wasserprobe verwendet worden war. Bei HAdV konnte mit Hilfe des Real-Time PCR-Ergebnisses dann die Genomanzahl berechnet werden, die in 1 ml Virussuspension und somit in 10 l Wasserprobe vor der Aufkonzentrierung enthalten war („Ausgangswert“). Aus dem Real-Time PCR-Ergebnis einer künstlich kontaminierten Probe wurde ebenfalls die Genomanzahl bestimmt, die sich für die betreffende 10 l-Wasserprobe ergab. Der Quotient aus dieser Anzahl und dem „Ausgangswert“ lieferte die Wiederfindungsrate. Für Influenzaviren konnten Wiederfindungsraten nur geschätzt werden, da in dieser Real-Time RT-PCR kein quantifizierter RNA-Standard mitgeführt wurde. Die Schätzung erfolgte mit Hilfe der Faustformel, die besagt, dass in einer Real-Time PCR mit der Erhöhung der Ziel-DNA- bzw. -RNA-Menge im PCR-Ansatz um eine Zehnerpotenz der Ct (Cycle Threshold)-Wert um ca. 3,3 abnimmt. So konnte aus den Unterschieden in den Ct-Werten zwischen „Ausgangswert“ (s. o.) und dem Wert einer künstlich kontaminierten Probe die Wiederfindungsrate abgeschätzt werden.

5. Nachweis infektiöser Adenoviren mit ICC-PCR

Ob Probenkonzentrate, die in einer Adenovirus-PCR positiv getestet wurden, auch infektiöse Viren enthielten, wurde mit Hilfe der ICC-PCR überprüft. Da für den rein molekularbiologischen Nachweis nur die Hälfte des Konzentrats jeder Probe verwendet wurde, stand für die ICC-PCR noch genügend Material zur Verfügung. Pro Probe wurden sieben 50 ml-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit je ca. 5×10^5 A549-Zellen in 5 ml MEM mit 10 % FKS (s. III. 1.2.) befüllt. In vier Tagen Bebrütung bei 37 °C entstand ein Zell-Monolayer. Nach dem Abgießen des Wachstumsmediums wurden vier Flaschen mit je 1 ml Probenkonzentrat, zwei Flaschen mit je 1 ml Adenovirus 2-PBS-Suspension (Positivkontrollen, 100 Viruspartikel pro ml) und eine Flasche mit 1 ml PBS (Negativkontrolle) beimpft. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Inokulum abgegossen. Die Zellen wurden mit PBS

zweimal gewaschen und anschließend mit je 4 ml MEM mit 2 % FKS überschichtet. Eine Flasche mit Probenkonzentrat und eine Positivkontrolle wurden sofort bei -20 °C eingefroren (Kontrolle zum Zeitpunkt $t = 0$). Die restlichen Flaschen wurden fünf Tage bei 37 °C bebrütet und dann bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden alle Flaschen je zweimal aufgetaut und wieder eingefroren. Nach dem dritten Auftauen wurde der gesamte Inhalt einer Flasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 175 x g 5 min zentrifugiert. Aus den Überständen wurde entweder sofort oder nach Lagerung bei -20 °C die DNA mit Hilfe des QIAamp® Viral RNA Mini Kit (s. III. 3.1; Anhang: IX. 1.2.) extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden in eine nested oder Real-Time PCR für humane Adenoviren eingesetzt.

6. Bakteriophagen-Nachweis aus großen Wasservolumina

Für die Detektion F-spezifischer RNA-Bakteriophagen und somatischer Coliphagen gibt es die Normen DIN EN ISO 10705-1 und 10705-2 (DIN 2001a, DIN 2001b). Das eingesetzte Probenvolumen beträgt jedoch jeweils nur 1 bis 100 ml. Für Grundwasserproben werden Probenvolumina von 500 ml empfohlen (Grabow 2001). DIN EN ISO 10705-2 enthält eine Anmerkung, dass ein Test auf An- bzw. Abwesenheit von somatischen Coliphagen auch für größere Probenvolumina verwendet werden kann. Wie man dabei genau vorgeht, wird nicht beschrieben. Deshalb wurde ein eigenes Protokoll entwickelt, wobei aber die Medien der DIN-Normen eingesetzt wurden. Für den Nachweis von somatischen Coliphagen wurden zu 500 ml auf Raumtemperatur erwärmte Probe 50 ml 10fach konzentrierte Modifizierte Scholtens Bouillon, 3 ml Calciumchlorid-Lösung und 5 ml Wirtskultur (*E. coli* DSM 13127; DSMZ, Braunschweig), die sich in exponentieller Wachstumsphase befand, gegeben (s. Anhang: IX. 1.3.1.). Nach der Bebrütung bei 37 °C für 18 ± 2 h auf einem Schüttler wurde 1 ml der Kultur entnommen, 400 µl Chloroform zupipettiert und gemischt. Nach 1 h bei 4 °C wurde die Suspension 5 min bei 3.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Pro Probe wurden 5 Tropfen des Überstandes auf vorbereitete Agarplatten (Modifizierter Scholtens' Agar mit einer Schicht aus Modifiziertem Scholtens' Weichagar

und eingemischter Impfkultur) aufgebracht. Die Platten wurden bei 37 °C 18 ± 2 h inkubiert und anschließend auf klare Zonen innerhalb der betropften Flächen untersucht. Klare Zonen bedeuteten die Lyse der Wirtsbakterien und somit die Anwesenheit von somatischen Coliphagen in 500 ml Wasserprobe. Für den Nachweis von F-spezifischen Bakteriophagen wurde die gleiche Methode verwendet, nur die Medien und der Wirtstamm unterschieden sich. Die Medien waren 10fach konzentrierte Trypton-Hefeextrakt-Bouillon, Trypton-Hefeextrakt-Glucose (TYG)-Agar und TYG-Weichagar (s. Anhang: IX. 1.3.2.). Als Wirtstamm diente *Salmonella* Typhimurium WG49 (ATCC 700730; LGC Standards, Wesel). Neben 50 ml 10fach konzentrierter Trypton-Hefeextrakt-Bouillon und 5 ml Wirtskultur wurden 5 ml Calcium-Glucose-Lösung zu 500 ml Probe gegeben. Als Positivkontrollen und zur künstlichen Kontamination der Proben bei der Methodenetablierung wurden der somatische Coliphage Phi X174 (DSM 4497; DSMZ) und der F-spezifische Bakteriophage MS2 (DSM 13767; DSMZ) verwendet.

7. Untersuchung bayerischer Wasserversorgungen

Die im Labor etablierten Methoden zum Nachweis von Indikatorviren aus Trink- und Tränkwasser wurden anschließend für die Untersuchung von zehn bayerischen Wasserversorgungen eingesetzt. Parallel wurden bakteriologische und chemisch-physikalische Parameter erhoben und die Anwesenheit von Bakteriophagen überprüft.

7.1. Wasserversorgungen

Mit Unterstützung durch Dr. Stefan Herb vom Bayerischen Landesamt für Umwelt und die Gesundheitsämter wurden zehn Wasserversorgungen in Bayern ausgewählt (s. Tab. 7). Diese wiesen hygienisch problematische Charakteristika auf, wie ungünstige geologische Gegebenheiten (z. B. Karstgebiete), flache Brunnen und/oder intensive landwirtschaftliche Nutzung in der Umgebung. Dann wurde bei den Versorgern angefragt, ob sie bereit wären, am Untersuchungsprogramm teilzunehmen. Bei der Hälfte der Versorgungen wurde das gewonnene Wasser nicht aufbereitet, das Rohwasser entsprach also dem Trinkwasser. Von den Wasserversorgungen mit Aufbereitung wurde in der Regel nur das

Rohwasser untersucht, von Versorgung 8 zusätzlich aufbereitetes Wasser (nach Ultrafiltration, vor UV-Desinfektion). Es handelte sich um relativ kleine Versorgungen mit Wasserabgabemengen von knapp 4.000 bis 300.000 m³ pro Jahr.

Tabelle 7: Charakterisierung der Wasserversorgungen

Wasser- versorgung	Zuständiges Gesundheitsamt	Aufbereitung	Gewinnung	Jährl. Wasserab- gabemenge in m ³
1	Ebersberg	Chlorung	Quellfassung	10.000
2	Ostallgäu	Ultrafiltration	Quellfassung	175.000
3	Mühdorf am Inn	keine	Quellfassung	15.000
4	Schwandorf	keine	Brunnen	k. A.*
5	Schwandorf	keine	Brunnen	180.000
6	Mühdorf am Inn	keine	Brunnen	3.800
7	Ansbach	Chlorung	Quellfassung	31.500
8	Neumarkt	Ultrafiltration	Quellfassung	160.000
9	Kelheim	keine	Brunnen	80.000
10	Neumarkt	Ultrafiltration	Quellfassung	300.000

*: Keine Angabe, da es sich um einen Notbrunnen handelte. Die Proben wurden während der Spülung des Brunnens entnommen.

7.2. Probenahmen

Insgesamt erfolgten 39 Probenahmen bei zehn Wasserversorgern. Bei neun Wasserversorgern wurden je vier Proben genommen, bei einem (Nr. 3) nur drei Proben, da der Betreiber die Genehmigung für die Untersuchung im Sommer 2008 zurückzog. Der Abstand zwischen den einzelnen Probenahmen betrug etwa drei Monaten, so dass an jeder Wasserversorgung zu jeder Jahreszeit eine Probe untersucht wurde.

Die Filtration der Proben über Glaswolle erfolgte vor Ort an einer geeigneten Entnahmestelle des Brunnens, im Quellschacht bzw. im Wasserwerk. Bei jeder Probenahme wurden 300 bis 500 Liter Wasser in vier bis fünf Stunden filtriert. Zusätzlich wurde eine 10 Liter-Probe, die am folgenden Tag im Labor als Positivkontrolle mit Viren versetzt wurde, und weitere Proben für die bakteriologische und chemisch-physikalische Untersuchung sowie den Phagennachweis entnommen. Die Säule mit

Glaswolle und die Wasserproben wurden gekühlt ins Labor transportiert und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

7.3. Virologische, bakteriologische und chemisch-physikalische Untersuchung

Am Tag nach der Probenahme wurde zur Säule Fleischextrakt-Glycin-Puffer zugegeben und wie in Kapitel III. 2.1.1. beschrieben weiter verfahren. Die 10 Liter-Probe wurde mit Viren beimpft und aufkonzentriert (III. 2.1.1.). Anschließend wurden die Konzentrate der Probe und der Positivkontrolle mit (RT-)PCR auf humane und porcine Adenoviren, Polyomaviren und Influenza A-Viren untersucht (s. III. 3.2.). Sowohl bei den 10 I-Prozesskontrollen als auch den Proben wurden die unverdünnten Nukleinsäure-Extrakte und die 1:2-, 1:10- und teilweise die 1:100-Verdünnungen getestet. Inhibitionskontrollen (s. III. 3.2.1.) wurden ebenfalls für die unverdünnten und verdünnten Prozesskontrollen und Proben durchgeführt. Bei Proben, die in der PCR für humane Adenoviren positiv waren, wurde mit ICC-PCR (s. III. 5.) überprüft, ob infektiöse Adenoviren vorhanden waren. Somatische Coliphagen und F-spezifische RNA-Bakteriophagen wurden nach dem Protokoll aus Kapitel III. 6. nachgewiesen. Die bakteriologischen und chemisch-physikalischen Untersuchungen erfolgten im mikrobiologischen (Dr. Peter Schindler) bzw. im chemischen Wasserlabor (Dr. Werner Höbel) des LGL. Es wurden die Parameter Coliforme, *E. coli*, enterohämorrhagische *E. coli*, Koloniezahl (bei 22 und bei 36 °C), intestinale Enterokokken, *Clostridium perfringens* und *Flexibacter-/Sporocytophaga*-Gruppe sowie pH-Wert, Leitfähigkeit, Oxidierbarkeit, Trübung, Färbung, UV-Absorption, Ammonium, Nitrat, Nitrit, Eisen und Mangan bestimmt. Die Wassertemperatur wurde während der Probenahme gemessen.

IV. ERGEBNISSE

1. Etablierung des Bakteriophagennachweises

Mit Hilfe der Phagen MS2 und Phi X174 konnte der Test auf An- bzw. Abwesenheit von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen und somatischen Coliphagen in 500 ml erfolgreich etabliert werden. In verschiedenen Versuchen wurden 500 ml Pepton-Salzlösung mit Phagensuspensionen, die 1 bis 50 Phagenpartikel enthielten, beimpft. Die Anzahl der Phagenpartikel war zuvor gemäß DIN EN ISO 10705-1 und 10705-2 (DIN 2001a, DIN 2001b) bestimmt worden. Bei allen Tests konnte die Anwesenheit der Bakteriophagen bestätigt werden, die Nachweisgrenze lag bei einem Phagenpartikel in 500 ml.

2. Etablierung der PCR-Nachweise

Bevor mit der Etablierung der Gesamtmethode zum Virusnachweis begonnen werden konnte, mussten zunächst die PCR-Reaktionen für die verschiedenen Viren eingeführt werden. Es wurde auf eine Überprüfung der Spezifität der einzelnen PCR-Reaktionen verzichtet, da hauptsächlich Primer und Sonden verwendet wurden, deren Spezifität schon von mehreren Autoren bestätigt worden war. Außerdem lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Etablierung der Aufkonzentrierungsmethode. Falsch positive Ergebnisse der Trinkwässer wurden dadurch verhindert, dass positive Befunde durch Sequenzierung bestätigt wurden.

Es wurden Nukleinsäuren, die aus Suspensionen der zur künstlichen Kontamination der Proben verwendeten Viren (s. III. 1.1.) mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit extrahiert wurden, bei der Einführung der PCR-Reaktionen eingesetzt. Bei humanen Adenoviren wurde eine quantitative Nachweisgrenze der PCR-Reaktion bestimmt. Die Sensitivität der anderen PCR-Nachweise konnte nicht quantitativ überprüft werden, da keine DNA- bzw. RNA-Standards zur Verfügung standen.

2.1. Etablierung der PCR-Nachweise für humane Adenoviren

Humane Adenoviren Typ 2 wurden in Zellkultur vermehrt. Unverdünnte DNA-Extrakte und Verdünnungen in Nuklease-freiem Wasser von 10^{-1} bis 10^{-4} wurden in die PCR eingesetzt. Übereinstimmend lag die Nachweisgrenze sowohl bei der nested als auch bei der Real-Time PCR im Bereich der 10^{-3} -Verdünnung. Dies bedeutet, dass die DNA aus ca. 0,02 μ l Zellkulturüberstand für ein positives PCR-Ergebnis ausreichte (140 μ l Zellkulturüberstand in der Extraktion, 80 μ l Elutionsvolumen in der Extraktion, 10 μ l DNA in der PCR). Abbildung 3 zeigt das Ergebnis einer nested PCR, es wurden je zwei Parallelen der einzelnen Verdünnungsstufen (10^{-4} bis unverdünnt) und der Negativkontrolle eingesetzt. Die Zielsequenz ist 171, die interne Amplifikationskontrolle (IAC) 337 Basenpaare (bp) lang. Für die Verdünnungen bis 10^{-2} sind die Banden der Zielsequenz deutlich ausgebildet, eine Parallele der 10^{-3} -Verdünnung ist nur schwach zu sehen. Für die 10^{-4} -Verdünnung und die Negativkontrolle bestätigen die deutlichen IAC-Banden eine erfolgreiche PCR-Reaktion, Zielsequenzen sind aber nicht nachweisbar. Bei höheren Viruskonzentrationen ist die IAC-Bande meist schwach ausgebildet. Zwischen den Banden der IAC und der Zielsequenz ist häufig noch eine weitere Bande erkennbar.

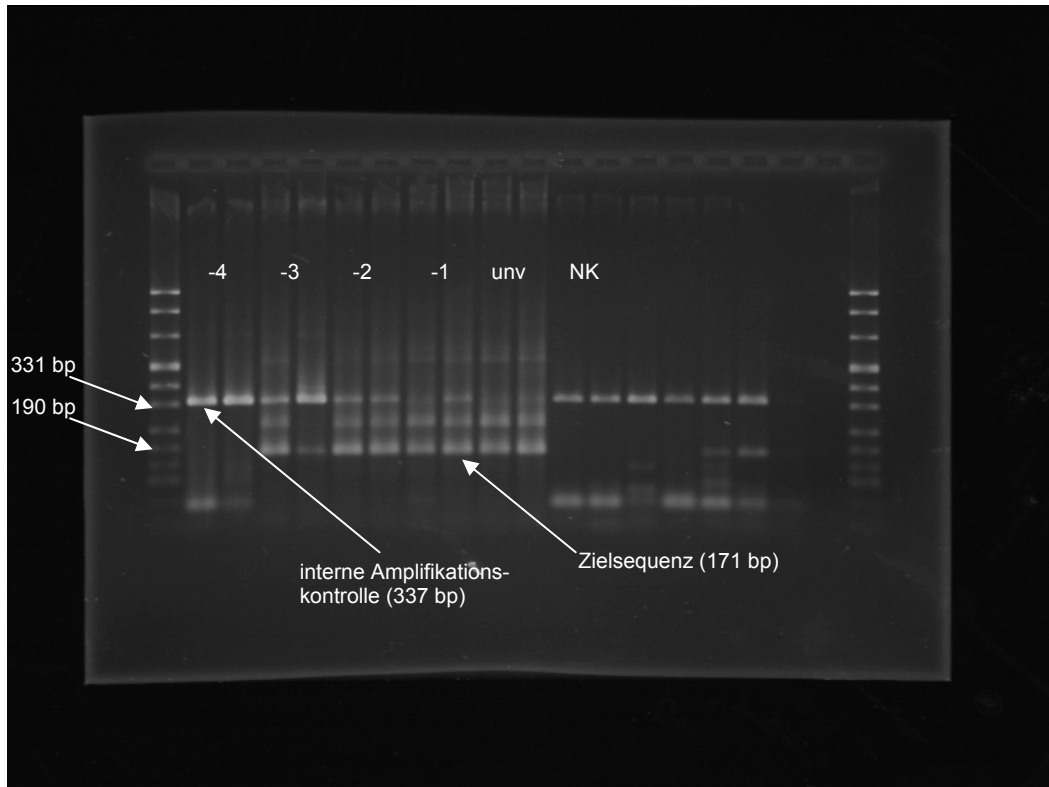


Abb. 3: Ergebnis einer nested PCR für humane Adenoviren

-4: Verdünnungsstufe 10^{-4} , -3: Verdünnungsstufe 10^{-3} usw.
 unv: unverdünnter DNA-Extrakt; NK: Negativkontrolle; bp: Basenpaare

In Abb. 4 sieht man das Ergebnis einer Real-Time PCR, in die die gleichen DNA-Extrakte eingesetzt wurden wie in die obige nested PCR. Nur eine der beiden Parallelen der 10^{-3} -Verdünnung lieferte ein positives Signal, die 10^{-4} -Verdünnungen waren negativ.

Zum Erstellen von Standardkurven wurde in der Real-Time PCR quantifizierte Adenovirus 5-DNA verwendet (s. III. 3.2.1.). Abbildung 5 zeigt ein typisches Ergebnis: Es wurden drei Parallelen für jede Anzahl von Genomkopien (10^4 bis 10^0 Kopien) angesetzt. 10^4 bis 10^1 Genomkopien zeigten immer positive Ergebnisse mit recht geringer bzw. bei 10^1 Kopien etwas größerer Streuung. Bei einer Genomkopie (10^0) waren ein bis drei (meist zwei) Parallelen positiv, d. h. die Nachweisgrenze der Real-Time PCR und somit auch der nested PCR (s. o.) lag im Bereich von einer Genomkopie.

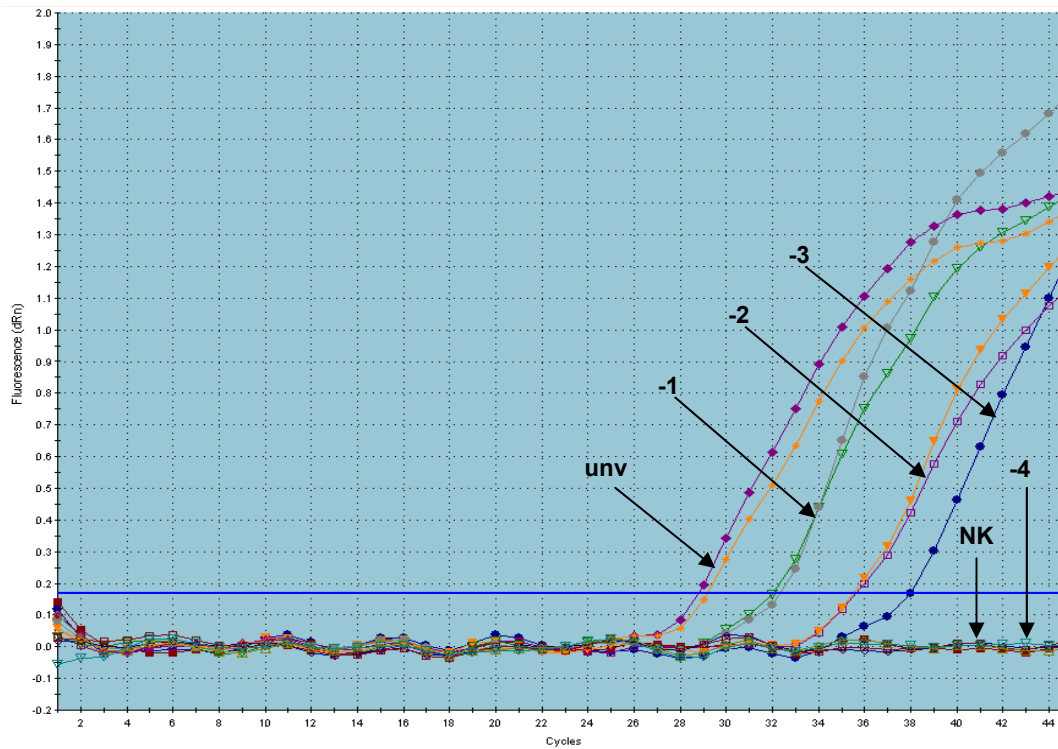


Abb. 4: Ergebnis einer Real-Time PCR für humane Adenoviren

-4: Verdünnungsstufe 10^{-4} , -3: Verdünnungsstufe 10^{-3} usw.
 unv: unverdünnter DNA-Extrakt; NK: Negativkontrolle

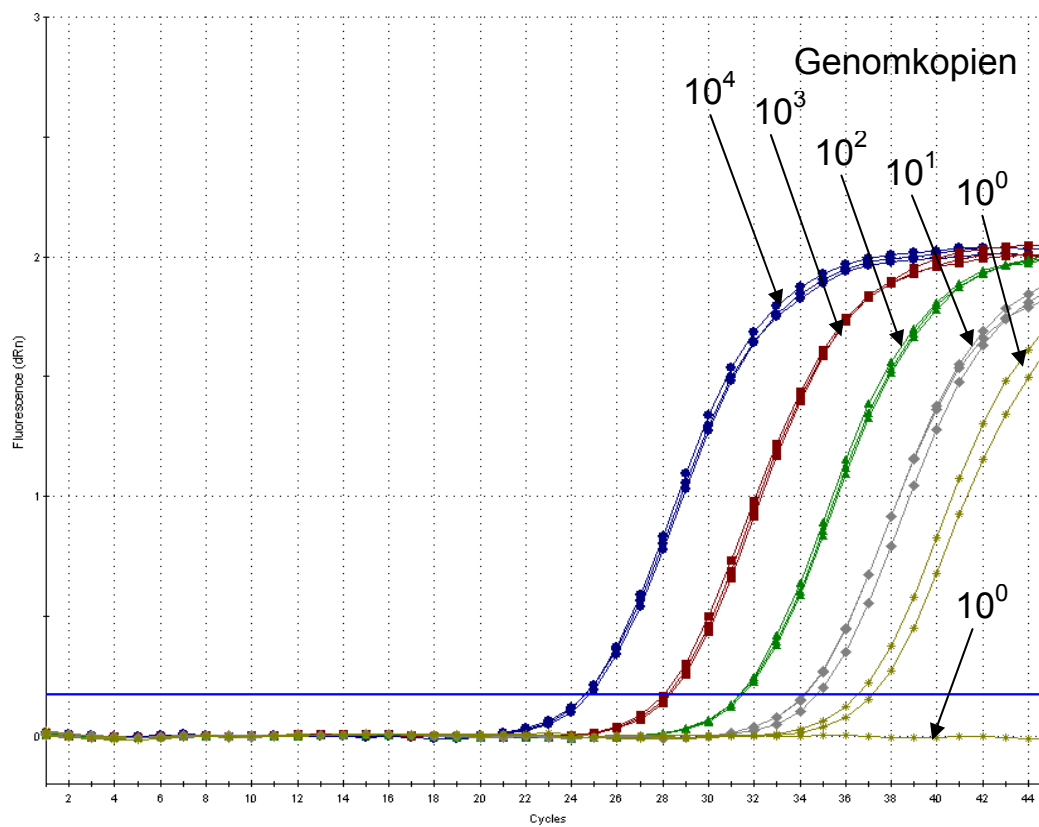


Abb. 5: Ergebnis einer Real-Time PCR für humane Adenoviren mit quantifizierten Adenovirus-Genomen

2.2. Etablierung des PCR-Nachweises für porcine Adenoviren

Verdünnungen der DNA-Extrakte von porcinen Adenoviren A in Nuklease-freiem Wasser bis 10^{-2} waren in dieser nested PCR immer positiv (s. Abb. 6, jeweils drei Parallelen), die 10^{-3} -Verdünnung nur teilweise (nicht dargestellt). Die Länge der Zielsequenz beträgt 344 Basenpaare.

Wurden DNA-Extrakte von bovinen Adenoviren 1 (FLI, Insel Riems) untersucht, kam es zu keiner Amplifikation.

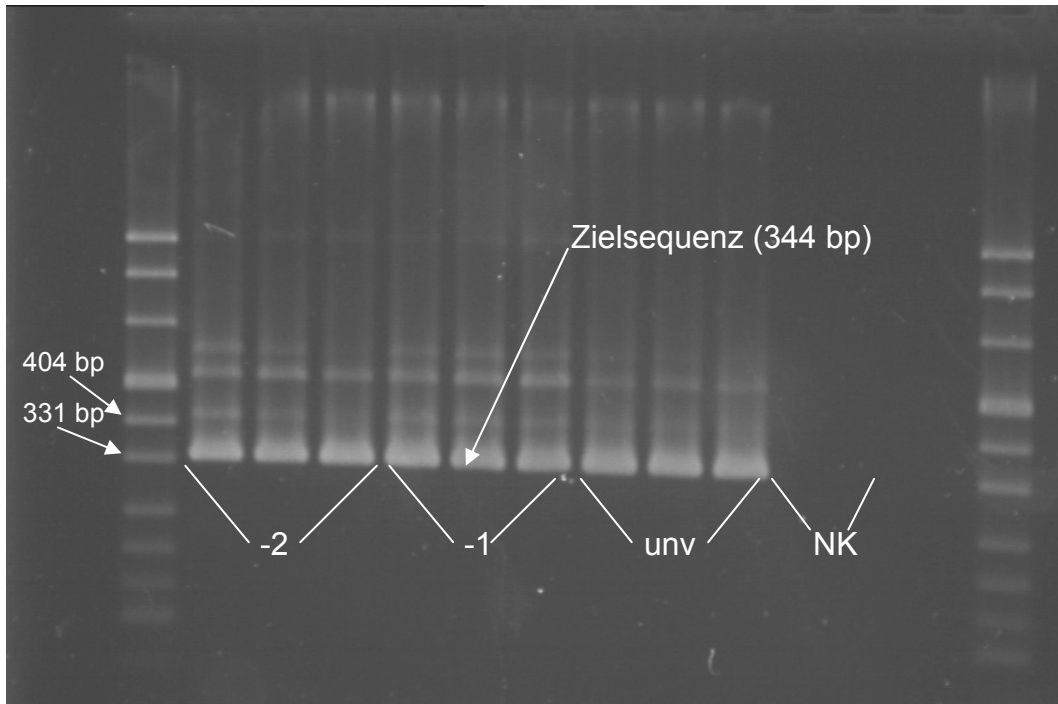


Abb. 6: Ergebnis einer nested PCR für porcine Adenoviren

-2: Verdünnungsstufe 10^{-2} , -1: Verdünnungsstufe 10^{-1}
unv: unverdünnter DNA-Extrakt; NK: Negativkontrolle

2.3. Etablierung des PCR-Nachweises für aviäre und bovine Polyomaviren

Bei der Polyomavirus-PCR lag die Nachweisgrenze im Bereich der 10^{-3} -Verdünnung der DNA-Extrakte. In Abb. 7 ist das Ergebnis einer PCR-Reaktion dargestellt, in die Verdünnungen (je zwei Parallelen) von zwei verschiedenen DNA-Extrakten von aviären Polyomaviren eingesetzt wurden. Beim ersten Extrakt (s. Abb. 7 linke Seite) war bei der 10^{-3} -Verdünnung eine Bande stark und die andere schwach ausgebildet, beim zweiten Extrakt war bei dieser Verdünnungsstufe nur eine Bande vorhanden (s. Abb. 7 rechte Seite).

Diese PCR wurde am LGL entwickelt. Es stand nur ein Polyomavirusstamm zur Verfügung, eine Spezifitätsprüfung konnte daher nicht durchgeführt werden. Während der Etablierungszeit wurde jedoch ein PCR-Produkt sequenziert. Die Auswertung über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ergab bei einer 301 Basenpaare langen Sequenz eine Übereinstimmung von 100 % mit dem Budgerigar Fledling Disease Polyomavirus.

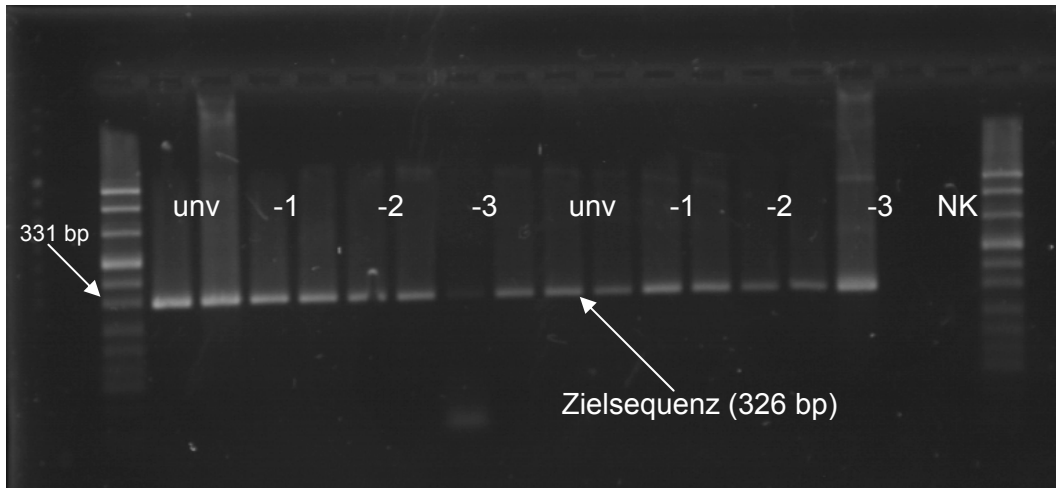


Abb. 7: Ergebnis einer PCR für Polyomaviren

-3: Verdünnungsstufe 10^{-3} , -2: Verdünnungsstufe 10^{-2} usw.
unv: unverdünnter DNA-Extrakt; NK: Negativkontrolle

2.4. Etablierung des RT-PCR-Nachweises für Influenzaviren

Influenzavirus-RNA konnte mit Hilfe dieser Real-Time RT-PCR in allen Verdünnungen der RNA-Extrakte (je zwei Parallelen) von porzinen Influenza A-Viren H3N2 bis 10^{-5} nachgewiesen werden (s. Abb. 8). In Abb. 9 sieht man das zugehörige Ergebnis für die Kontroll-RNA. Bei geringeren Konzentrationen an Influenzavirus-RNA (Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-5}) sind klar positive, bei höheren Konzentrationen schwach positive oder negative Signale erkennbar

RNA-Extrakte von humanen Influenza A-Viren (aus Patientenisolaten) und von aviären Influenzaviren H10N1 wurden mit dieser RT-PCR ebenfalls erfolgreich getestet.

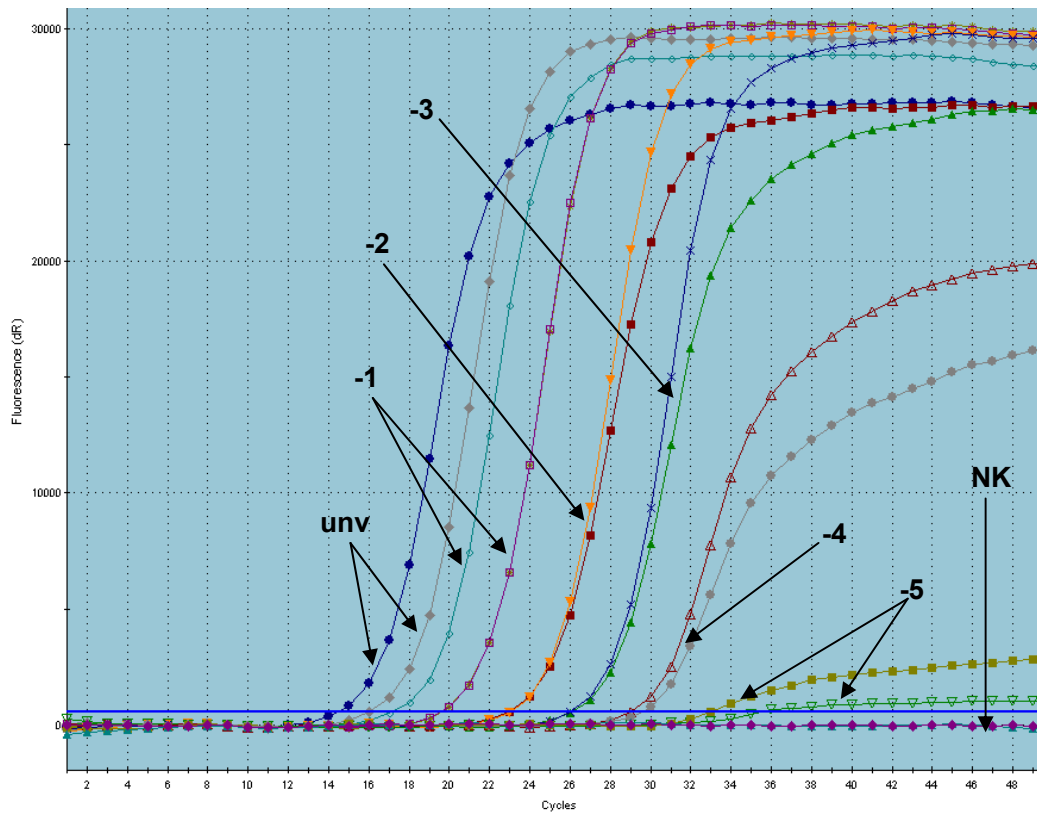


Abb. 8: Ergebnis einer Real-Time RT-PCR für Influenza A-Viren (Ziel-RNA)

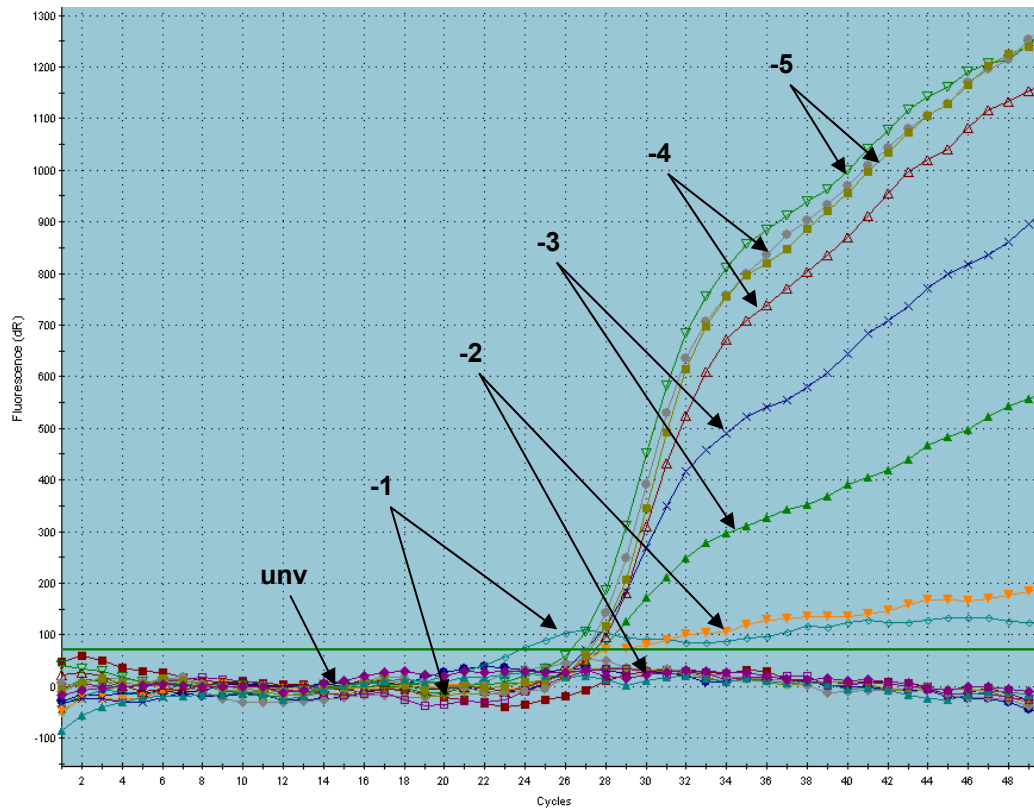


Abb. 9: Ergebnis einer Real-Time RT-PCR für Influenza A-Viren (Kontroll-RNA)

-5: Verdünnungsstufe 10^{-5} , -4: Verdünnungsstufe 10^{-4} usw.
 unv: unverdünnter RNA-Extrakt; NK: Negativkontrolle

3. Etablierung des ICC-PCR-Nachweises

Zunächst wurden zur Etablierung des ICC-PCR-Nachweises Suspensionen von humanen Adenoviren, später auch Probenkonzentrate zum Beimpfen der Zellkulturen verwendet. Die Konzentration der Adenovirus-Genomkopien wurde zuvor mit Hilfe der Real-Time PCR bestimmt. Eine Adenovirussuspension musste ca. 100, ein Konzentrat einer künstlich kontaminierten Probe ca. 500 Genomkopien pro ml enthalten, um nach 5 Tagen Bebrütung positive PCR-Signale zu liefern. Für die Zellkultur-Flaschen, die unmittelbar nach der Infektion eingefroren wurden und in denen die Viren somit keine Möglichkeit zur Vermehrung hatten (Kontrollen zum Zeitpunkt $t = 0$), waren nur negative PCR-Ergebnisse zu verzeichnen.

4. Etablierung des Gesamt-Virusnachweises

Nachdem alle PCR-Nachweise eingeführt waren, wurde mit der Etablierung der Gesamtmethode begonnen. Sie beinhaltete die Aufkonzentrierung der Wasserprobe, die Nukleinsäureextraktion und die Detektion der Virusgenome mit (ICC-)PCR.

4.1. Aufkonzentrierung mit Glaswolle

Für alle verwendeten Virustypen konnte die Glaswolle-Methode erfolgreich eingeführt werden, d. h. die vorher etablierten (RT-)PCR-Nachweise funktionierten auch mit RNA- bzw. DNA-Extrakten aus Probenkonzentraten. Wiederfindungsraten wurden nur bei HAdV und Inflenzaviren bestimmt (s. III. 4.). Zahlreiche Faktoren innerhalb des Aufkonzentrierungsprozesses wurden variiert mit dem Ziel, bessere Wiederfindungsraten zu erzielen.

4.1.1. Durchschnittliche Wiederfindungsraten

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für humane Adenoviren in künstlich kontaminierten 10 l-Wasserproben betrug 2,9 % (53 Experimente; Minimum: 0,7 %, Maximum: 8,8 %). Für Inflenzaviren lag die Rate bei 6,0 % (8 Experimente; Minimum: 1,6 %, Maximum: 10,0 %). Die Einengung des Probenvolumens von 10 l auf 10 ml entsprach einer Aufkonzentrierung um den Faktor 1.000. Die Nukleinsäuren wurden aus

der Hälfte des Konzentrats extrahiert, wobei das Endvolumen der Extraktion 100 µl betrug. In der PCR wurden 10 µl Nukleinsäureextrakt untersucht. In diesem Volumen sind die Nukleinsäuren aus einem Zwanzigstel der ursprünglichen Probe, also aus 0,5 l, enthalten. Bei der HAdV-PCR lag die Nachweisgrenze bei einer Genomkopie. Würde die Wiederfindungsrate des Gesamtnachweises bei 100 % liegen, könnten 20 Viruspartikel in 10 l nachgewiesen werden. Geht man von einer Wiederfindungsrate von mindestens 2 % aus, sind mit dieser Methode 1.000 HAdV-Partikel in 10 l, d. h. 10 Partikel in 100 ml, sicher nachweisbar.

4.1.2. Veränderung des pH-Werts der Wasserprobe

Zwölf 10 l-Wasserproben wurden mit HAdV-Suspensionen gleicher Konzentration versetzt. Bei sechs Proben blieb der pH-Wert unverändert, bei den sechs anderen wurde der pH-Wert auf 3,5 abgesenkt. Durchschnittlich lag die Wiederfindungsrate bei ersteren Proben bei 1,7 %, bei letzteren bei 8,0 %.

4.1.3. Veränderung der Filtrationsgeschwindigkeit

Vier mit HAdV gezielt versetzte Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,5, vier mit 1 und vier mit 1,5 Litern pro Minute filtriert. Die Wiederfindungsraten unterschieden sich nicht signifikant, sie lagen im Mittel bei 2,1 %.

4.1.4. Variationen bei Filtrationssäulen, Glaswolle und Elutionspuffern

Die Standard-Säulen wurden in zwei Experimenten statt mit 10 mit 15 g Glaswolle bestückt und in zwei anderen wurden kleine Stücke Moskitonetz zwischen die Glaswolle-Fractionen gelegt (s. III. 2.1.2.3). Hier wurden Wiederfindungsraten von 2,2 bzw. 1,4 % berechnet. Bei den zwölf Versuchen mit größeren Filtrationssäulen ergaben sich für HAdV Wiederfindungsraten von durchschnittlich 2,3 %. Die elf Filtrationen mit DMCS-behandelter Glaswolle, Glasfaserwatte bzw. Steinwolle führten zu etwas niedrigeren Ergebnissen (Wiederfindungsraten: Mittelwert 1,8 %). Die Verwendung von Magermilch- statt Fleischextrakt-Glycin-Puffer als Elutionsmittel bedingte deutlich schlechtere Wiederfindungsraten (1,1 %).

4.1.5. Varianten bei Fällung und Zentrifugation

Es sollte zunächst überprüft werden, ob ein pH-Wert von ca. 3,3 für die Effizienz der organischen Flockung optimal ist. Dafür wurden drei Kolben, die jeweils 200 ml 3 %igen Fleischextrakt-Glycin-Puffer enthielten, mit HAdV beimpft. Anschließend wurden die pH-Werte auf 3,2, 3,3 bzw. 3,4 abgesenkt, die Flocken abzentrifugiert und die Konzentrate molekularbiologisch untersucht. Die Ausbeuten nach Fällung und 30minütiger Zentrifugation betragen 14, 14 und 11 %. In einem weiteren Versuch wurde ebenfalls mit beimpften Fleischextrakt-Glycin-Puffern gearbeitet. Nach der Fällung bei einem pH-Wert von 3,3 wurde ein Teil der beimpften Puffer 30 min, der andere Teil 60 min zentrifugiert. Die Anhebung der Zentrifugationszeit führte zu einer Steigerung der Ausbeuten von 14 auf 27 % (HAdV).

Statt normaler Zentrifugation bei 4.400 x g wurde auch bei 40.000 x g ultrazentrifugiert. Bei HAdV ergaben die ersten vier Versuche dabei Ausbeuten nach Flockung und Zentrifugation von um die 100 %. In den folgenden elf Experimenten konnte dies jedoch nicht reproduziert werden, die Ausbeute lag im Mittel bei 21 % (Minimum: 3 %, Maximum 64 %). Für Inflenzaviren wurden in zwei Tests Ausbeuten von 16 und 44 % erzielt.

Der Einsatz von 0,5 %igem Fleischextrakt-Glycin-Puffer bzw. von PEG lieferte Ausbeuten von 21 bzw. 23 % nach Fällung und Zentrifugation. Bei der Aufkonzentrierung einer 10 Liter-Probe, die die übliche Konzentration von HAdV enthielt, wurde ebenfalls PEG zur Fällung verwendet. Hier waren mit Hilfe der PCR keine Viren nachweisbar.

4.1.6. Ultrafiltration

Probenkonzentrate sollten mit Hilfe der Ultrafiltration (s. III. 2.1.2.5.) weiter aufkonzentriert werden, um die Wiederfindungsrate der Gesamtmethode zu erhöhen. Nach Ultrafiltration und Nukleinsäureextraktion wurden jedoch keine HAdV detektiert, obwohl die jeweiligen Konzentrate nach direkter Nukleinsäureextraktion positiv getestet worden waren. Als Positivkontrolle für die Ultrafiltration wurde eine Virussuspension in PBS verwendet. Hier wurden HAdV nachgewiesen.

4.1.7. Versuche zur Identifizierung des Virusverlusts

Keine der bisher beschriebenen Variationen führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Wiederfindungsraten. Deshalb wurden Versuche unternommen, diejenigen Schritte innerhalb des Aufkonzentrierungs- und Nachweisprozesses zu identifizieren, die den Virusverlust verursachten.

4.1.7.1. Organische Flockung und Zentrifugation

Um die Ausbeute nach Fällung und Zentrifugation zu bestimmen, wurden jeweils 200 ml Fleischextrakt-Glycin-Puffer mit 10^4 bis 10^5 HAdV-Partikeln beimpft (s. auch IV. 4.1.5.). In neun Tests wurden nach pH-Absenkung und Zentrifugation Ausbeuten von durchschnittlich 23 % (11 bis 54 %) ermittelt. In fünf Fällen wurde nach der Zentrifugation in den Überständen erneut der pH-Wert abgesenkt und eine weitere Zentrifugation durchgeführt. Dies führte zur Steigerung der Gesamtausbeute von im Mittel 23 auf 30 %.

4.1.7.2. Gesamte Aufkonzentrierung

In fünf Experimenten wurden jeweils 10 l Wasser mit ca. 5×10^4 HAdV-Partikeln versetzt und mit Hilfe der Glaswolle-Methode aufkonzentriert. Zusätzlich zu den normalen Konzentraten wurden die Filtrate untersucht, um herauszufinden, wie viele Viren nicht an die Glaswolle gebunden wurden. Um Verluste während Elution und Fällung zu identifizieren, wurde zum einen eine zweite Elution mit 200 ml Fleischextrakt-Glycin-Puffer durchgeführt. Zum anderen wurde der Überstand, der sich nach Zentrifugation des ersten Eluats ergab, durch organische Flockung konzentriert und zentrifugiert, um die Effizienz der ersten Fällung und Zentrifugation zu überprüfen. In Tabelle 8 sieht man die Wiederfindungsraten der Standardmethode und der Zusatzschritte sowie die Wiederfindungsraten im Filtrat. Die Ergebnisse waren teilweise sehr heterogen, so wurden im Filtrat 0 bis ca. 86 % der zugegebenen Viren gefunden. Die gesamte Wiederfindungsrate konnte durch eine zweite Elution und eine weitere Fällung des Überstands des ersten Eluats meist nur um 10 bis 20 % gesteigert werden, in einem Fall jedoch um 150 % (Experiment 1).

Tabelle 8: Wiederfindungsraten

Experiment	Filtrat	Standard- methode	2. Eluat	Überstand 1. Eluat	Gesamt
1	0,1 %	3,2 %	2,6 %	2,2 %	8,0 %
2	17,8 %	4,9 %	0,3 %	0,2 %	5,4 %
3	0,0 %	1,7 %	0,3 %	0,1 %	2,1 %
4	33,5 %	3,3 %	0,4 %	0,1 %	3,8 %
5	85,7 %	4,0 %	0,7 %	0,1 %	4,8 %

4.1.7.3. DNA-Extraktion

Neben Verlusten bei Filtration und Fällung können Probleme bei der Nukleinsäureextraktion zu geringen Wiederfindungsraten führen, z. B. wenn im ersten Schritt der Extraktion nur ein Teil der Virionen lysiert wird. In den Probenkonzentraten liegen die Viren nicht frei im PBS-Puffer vor, sondern sind zumindest teilweise an organische Substanzen gebunden und somit evtl. vor der Lyse geschützt. Um herauszufinden, welchen Einfluss das Einfrieren und Auftauen der Konzentrate auf die Wiederfindungsraten hatte, wurde aus der ersten Hälfte eines Probenkonzentrats einer mit HAdV versetzten 10 I-Probe direkt nach der Aufkonzentrierung die DNA extrahiert, aus der zweiten Hälfte nach einmaligem Einfrieren und Auftauen. Bei einem Versuch verdoppelte sich die Wiederfindungsrate von 1,7 auf 3,4 %. Dies konnte aber bei drei weiteren Versuchen nicht reproduziert werden, die Raten der zweiten Extraktion veränderten sich entweder kaum gegenüber der ersten bzw. lagen sogar darunter. Bei vier weiteren Proben wurde die jeweils zweite Portion des Konzentrats dreimal hintereinander eingefroren und aufgetaut. Die Wiederfindungsraten sanken sehr stark um 77 bis 99 %.

Ein weiterer Ansatz war, die Effizienz der Nukleinsäureextraktion durch die Behandlung der Konzentrate mit Ultraschall zu erhöhen. In nur einem von fünf Versuchen erhöhten sich die Wiederfindungsraten, ansonsten nahmen sie um 44 bis 65 % ab.

Aus einigen Konzentraten wurden die Nukleinsäuren parallel mit Hilfe magnetischer Silikapartikel und mit dem NucleoSpin® RNA Virus F Kit

extrahiert (s. III. 3.1.). Für letztere Methode zeigte die HAdV-PCR keine positiven Signale.

4.2. Aufkonzentrierung mit positiv geladenem Filtermaterial

Eine Wasserprobe, die mit humanen Adenoviren versetzt worden war, wurde mit der Virosorb® 1MDS-Kartusche filtriert und mit organischer Flockung weiter aufkonzentriert (s. III. 2.2.). Im Verlauf der Filtration und Elution trat wiederholt Wasser aus einem Entlüftungsventil der Kartusche aus. Im Konzentrat wurden mit Hilfe der PCR keine Viren nachgewiesen. Aufgrund der Infektionsgefahr wurden keine weiteren Versuche mit diesem System unternommen.

5. Untersuchung der Wasserversorgungen

Bei zehn ausgewählten Wasserversorgungen wurden im Jahr 2008 39 Proben entnommen. Die Ergebnisse der bakteriologischen, chemisch-physikalischen und virologischen Untersuchungen sowie der Untersuchung auf Bakteriophagen werden im Folgenden dargestellt.

5.1. Bakteriologische und chemisch-physikalische Untersuchung

In fast der Hälfte der Proben (48,7 %) wurden die mikrobiologischen Grenzwerte der TrinkwV 2001 überschritten. Sechs weitere Proben (15,4 %) waren auffällig, weil sie Bakterien der *Flexibacter-/Sporocytophaga*-Gruppe enthielten. Nur 14 Proben (35,9 %) waren bakteriologisch nicht zu beanstanden (s. Abb. 10). In allen 19 Proben mit Grenzwertüberschreitung wurden coliforme Bakterien nachgewiesen. Dabei ergab in elf dieser 19 Proben ausschließlich der Nachweis von coliformen Bakterien eine Überschreitung. In zwei Proben wurden zusätzlich *E. coli* und in zwei weiteren intestinale Enterokokken detektiert. Eine Probe war auch für Enterokokken und *Clostridium perfringens* positiv, eine für *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens* sowie eine für *E. coli*, EHEC und Enterokokken. In einer Probe wurden Coliforme und Enterokokken gefunden, daneben überschritt die Koloniezahl bei 22 °C den Grenzwert. Neben den oben erwähnten sechs Proben, die die Grenzwerte der TrinkwV 2001 einhielten und trotzdem Bakterien der *Flexibacter-/Sporocytophaga*-Gruppe aufwiesen, wurden in 13 der 19

Proben mit Grenzwertüberschreitungen Bakterien dieser Gruppe detektiert (s. Tab. 9, Anhang: IX. 2.).

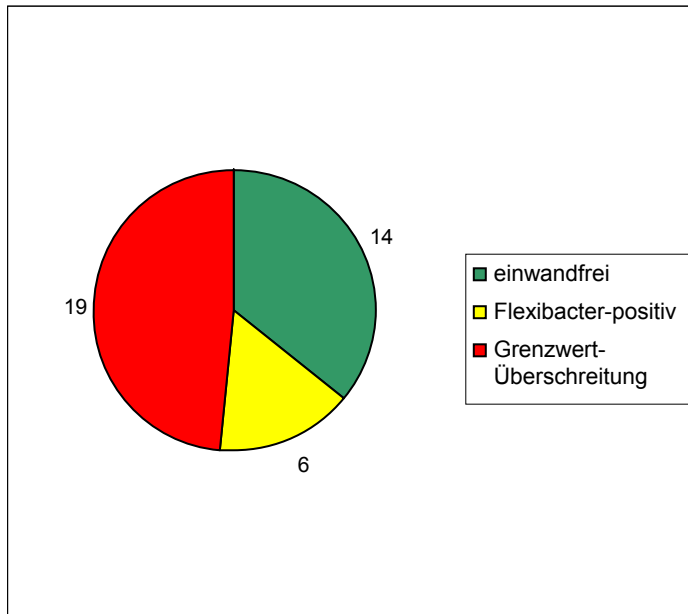


Abb. 10: Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung von 39 Rohwasserproben

Die chemisch-physikalische Untersuchung (s. Abb. 11) ergab 23 einwandfreie Proben (59,0 %) und acht Proben mit Grenzwertüberschreitungen (20,5 %) nach TrinkwV 2001. Daneben lieferten acht weitere Proben auffällige Teilergebnisse. Diese lagen entweder nahe am Grenzwert (z. B. bei Nitrat und Trübung) oder galten allgemein als erhöht (z. B. bei Oxidierbarkeit und UV-Absorption). Bei den acht Proben mit Grenzwertüberschreitungen war der Wert für die Trübung bei zwei Proben überschritten, die anderen sechs Proben hatten lediglich einen zu niedrigen pH-Wert. Allerdings zeigten diese sechs Proben auch andere auffällige Teilergebnisse (erhöhte Werte für Nitrat, Oxidierbarkeit bzw. UV-Absorption, teilweise Spuren von Eisen; s. Tab. 10, Anhang: IX. 2.).

Insgesamt waren nur die Versorgungen 5 und 9 in der bakteriologischen bzw. die Versorgungen 1, 6 und 9 in der chemisch-physikalischen Untersuchung ohne auffällige Befunde.

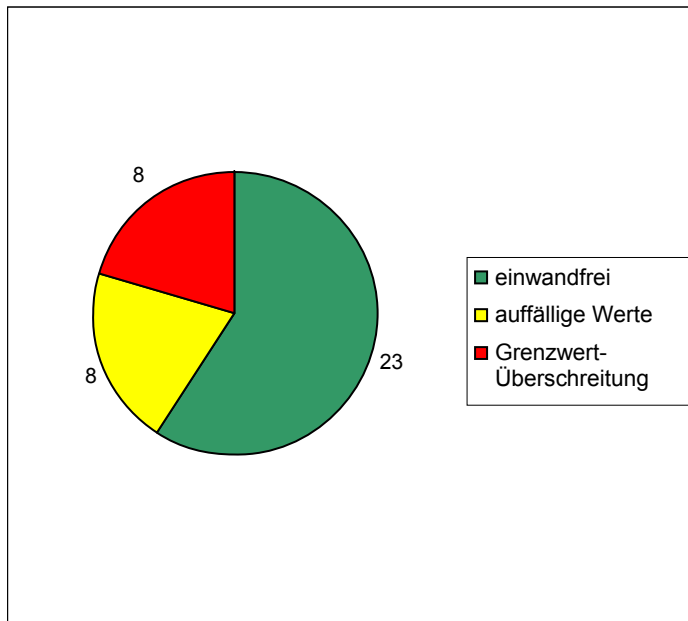


Abb. 11: Ergebnis der chemisch-physikalischen Untersuchung von 39 Rohwasserproben

5.2. Untersuchung auf Bakteriophagen

Für den Nachweis von somatischen Coliphagen und F-spezifischen RNA-Bakteriophagen wurde mit der neu etablierten Methode (s. III. 6.) jeweils ein Liter Wasser untersucht (je zwei 500 ml-Proben). Nur zwei Proben waren positiv, und zwar die Frühlings- und die Sommerprobe des Rohwassers von Versorgung 8. In beiden Proben wurden sowohl somatische Coliphagen als auch F-spezifische Bakteriophagen detektiert. Bei dieser Versorgung wurden auch Proben des teilweise aufbereiteten Wassers entnommen (nach Ultrafiltration, vor UV-Bestrahlung). In den ultrafiltrierten Proben waren keine Bakteriophagen enthalten.

5.3. Virologische Untersuchung

In vier bis fünf Stunden wurden 300 bis 500 l Wasser mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 1,5 l/min über Glaswolle filtriert. Bei einigen Versorgungen musste die Probenahme mehrmals unterbrochen werden, weil Schmutzpartikel aus dem Wasser den Glaswollfilter zu verstopfen drohten. War das Wasser, das sich über der Glaswolle in der Säule angesammelt hatte, durch den Filter abgelaufen, konnte die Probenahme fortgeführt werden.

In allen 39 Proben wurden weder Influenza-, humane und porcine Adeno- noch Polyomaviren nachgewiesen. Bei jeder Probe wurde eine

Prozesskontrolle (10 l-Probe der jeweiligen Versorgung, versetzt mit den zuvor genannten Viren), eine positive Extraktionskontrolle, PCR-Positivkontrollen und diverse Negativkontrollen mitgeführt. Außerdem wurden bei den PCR-Nachweisen von Influenza- und humanen Adenoviren Amplifikations- bzw. Inhibitionskontrollen eingesetzt, um falsch negative Ergebnisse durch Hemmung der PCR-Reaktionen auszuschließen.

5.3.1. Inhibition der PCR-Reaktionen

In den unverdünnten Nukleinsäure-Extrakten von Prozesskontrollen und Proben waren teilweise Stoffe enthalten, die zu einer vollständigen oder teilweisen Hemmung der PCR-Reaktionen führten. Dies konnte zum einen qualitativ über die interne Amplifikationskontrolle in der Influenza-PCR (s. III. 3.2.4), zum anderen quantitativ über die Inhibitionskontrollen in der HAdV-Real-Time PCR (s. III. 3.2.1) sichtbar gemacht werden. Bei den meisten Proben reichte eine 1:2 oder 1:10-Verdünnung der Nukleinsäure-Extrakte aus, um die Hemmstoffe zu eliminieren, bei manchen Proben musste 1:100 verdünnt werden.

Nach Literaturrecherchen wurde ab Sommer 2008 BSA (s. III. 3.2.) zu den PCR-Ansätzen gegeben. Es zeigte sich, dass BSA einen Teil der Hemmstoffe neutralisierte. So war bei vielen Proben die Untersuchung der unverdünnten Extrakte möglich.

5.3.2. Untersuchung auf humane Adenoviren

Abbildung 12 zeigt beispielhaft für andere Proben das HAdV-Real-Time PCR-Ergebnis der Sommerprobe von Wasserversorgung 10. Obwohl in der Probe keine humanen Adenoviren nachgewiesen wurden, sind zahlreiche positive PCR-Signale zu erkennen. Diese sind auf den Einsatz von Extraktions-, PCR-, Prozess- und Inhibitionskontrollen sowie von quantifizierter Adenovirus-DNA zurückzuführen. Zur Quantifizierung der in den eingesetzten DNA-Extrakten enthaltenen Genomkopien wurde bei jedem Real-Time PCR-Lauf mit Hilfe der quantifizierten DNA eine Standardkurve erstellt. Die Standardkurve zur Sommerprobe von Versorgung 10 ist in Abb. 13 dargestellt.

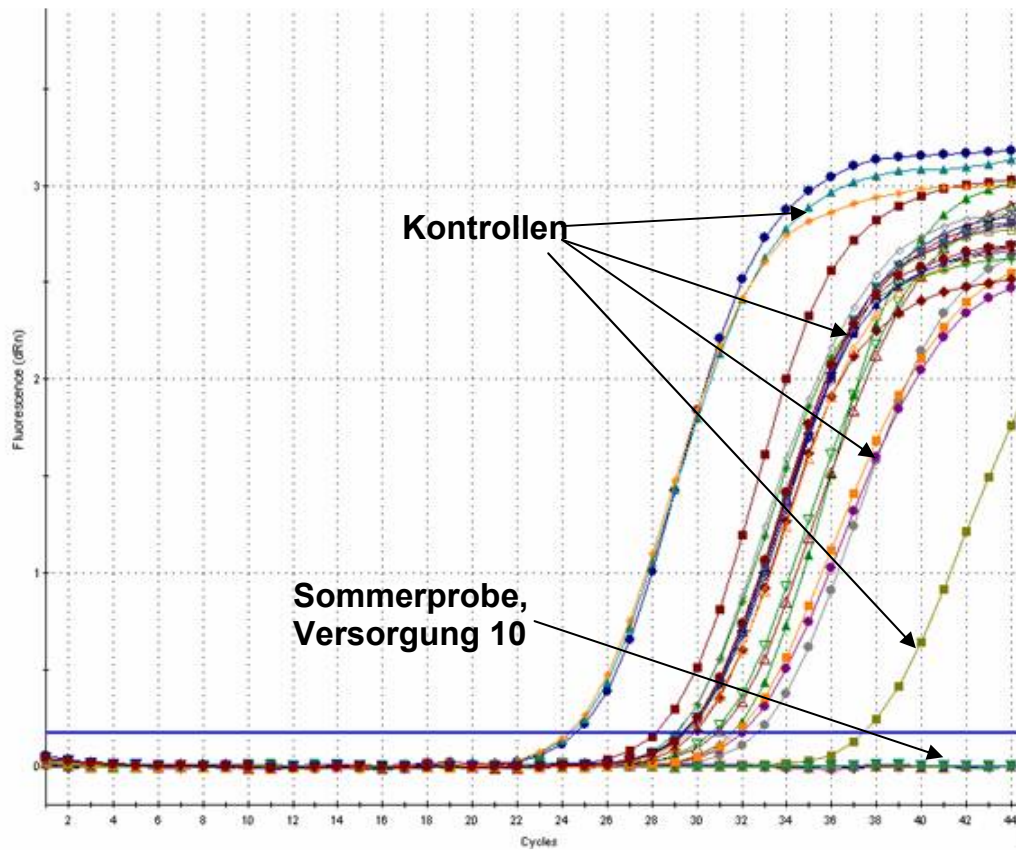


Abb. 12: Real-Time PCR-Ergebnis der Sommerprobe von Wasserversorgung 10 für HAAdV

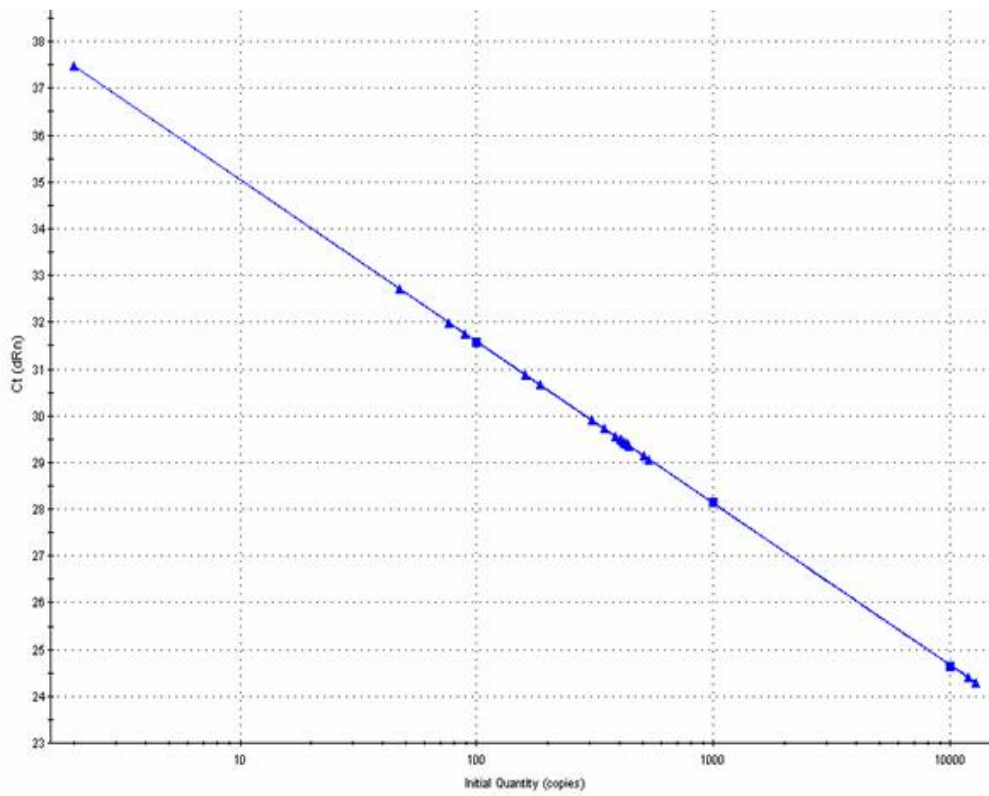


Abb. 13: Standardkurve zum Real-Time PCR-Ergebnis der Sommerprobe von Wasserversorgung 10

Für die Sommerprobe von Versorgung 3 war in der Real-Time PCR ein sehr schwaches Signal (Ct-Wert: 39,8) erkennbar (nicht dargestellt). Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung des PCR-Produkts ergab, dass es sich um eine Sequenz des humanen Adenovirus 2 handelte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in der Probe nicht wirklich HAdV enthalten waren, sondern Labormaterialien mit einer geringen Menge Adenovirus-DNA kontaminiert waren. Humanes Adenovirus 2 wurde zur künstlichen Kontamination der Wasserproben verwendet. Weiter wurde mit ICC-PCR ein negatives Resultat für diese Probe erzielt.

5.3.3. Untersuchung auf porcine Adenoviren

Ein beispielhaftes Ergebnis (Sommerprobe, Probenahmestelle 8) der nested PCR für Adenoviren des Schweins zeigt Abb. 14. Nur bei den Prozess-, Extraktions- und PCR-Kontrollen (linker und rechter Rand des Gels) sind Banden zu sehen, bei der auf dem Gel dazwischen liegenden Wasserprobe und deren Verdünnungen kam es zu keiner Amplifikation.

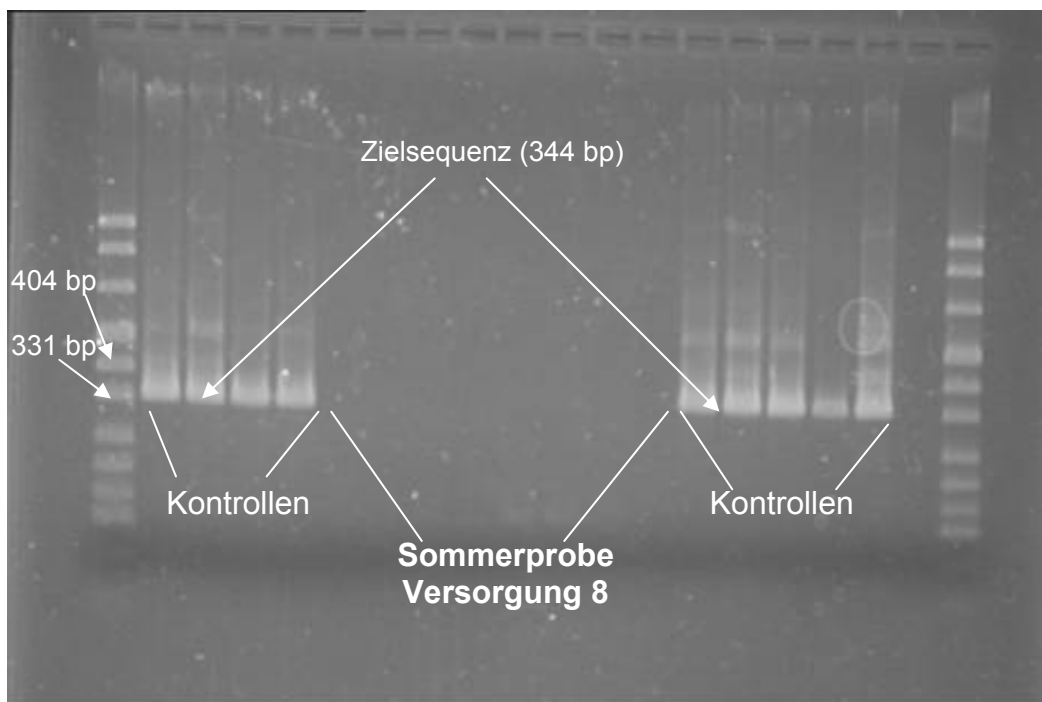


Abb. 14: Nested PCR-Ergebnis der Sommerprobe von Wasserversorgung 8 für porcine Adenoviren

5.3.4. Untersuchung auf Polyomaviren

Aviäre und bovine Polyomaviren wurden ebenfalls in keiner Wasserprobe nachgewiesen. Abbildung 15 zeigt die positiven Kontrollreaktionen und die fehlenden Signale der Sommerproben von Versorgung 4 und 5 in der Polyomavirus-PCR.

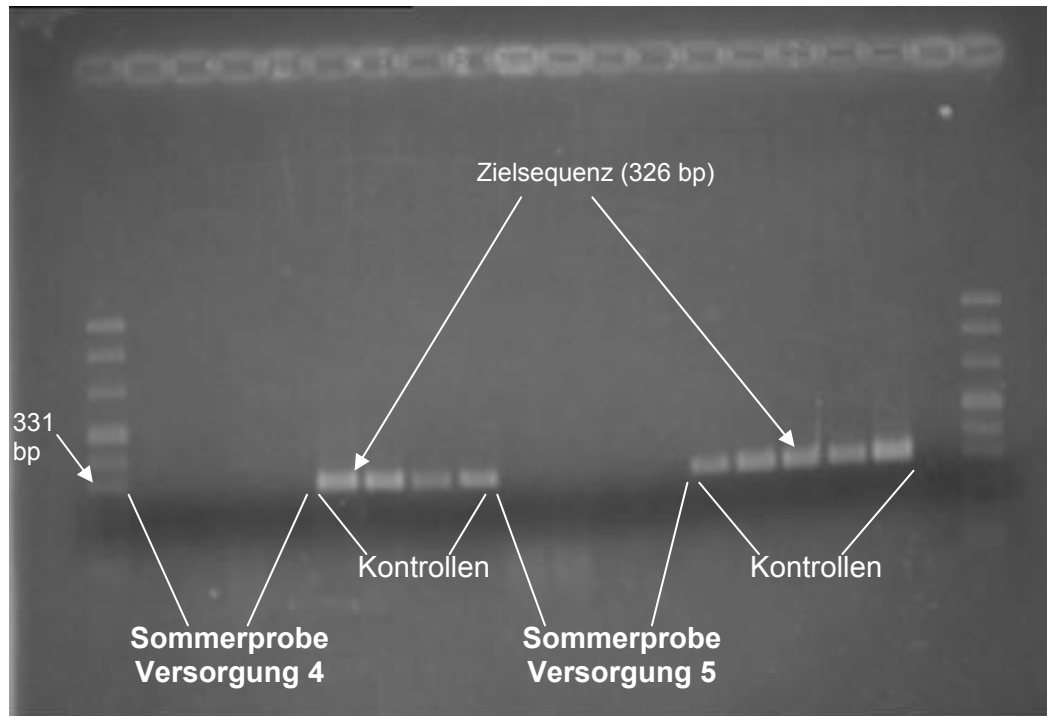


Abb. 15: PCR-Ergebnis der Sommerproben von Wasserversorgung 4 und 5 für aviäre und bovine Polyomaviren

5.3.5. Untersuchung auf Inflenzaviren

In Abb. 16 ist ein typisches Ergebnis der Real-Time RT-PCR für Influenza A-Viren dargestellt. Die Winterprobe von Wasserversorgung 3 war negativ, die Extraktions-, PCR- und der Prozesskontrollen waren dagegen positiv. Die Amplifikationskontrollen (Kontroll-RNA) bestätigten erfolgreiche PCR-Reaktionen auch für die (verdünnten) Probenextrakte (nicht dargestellt).

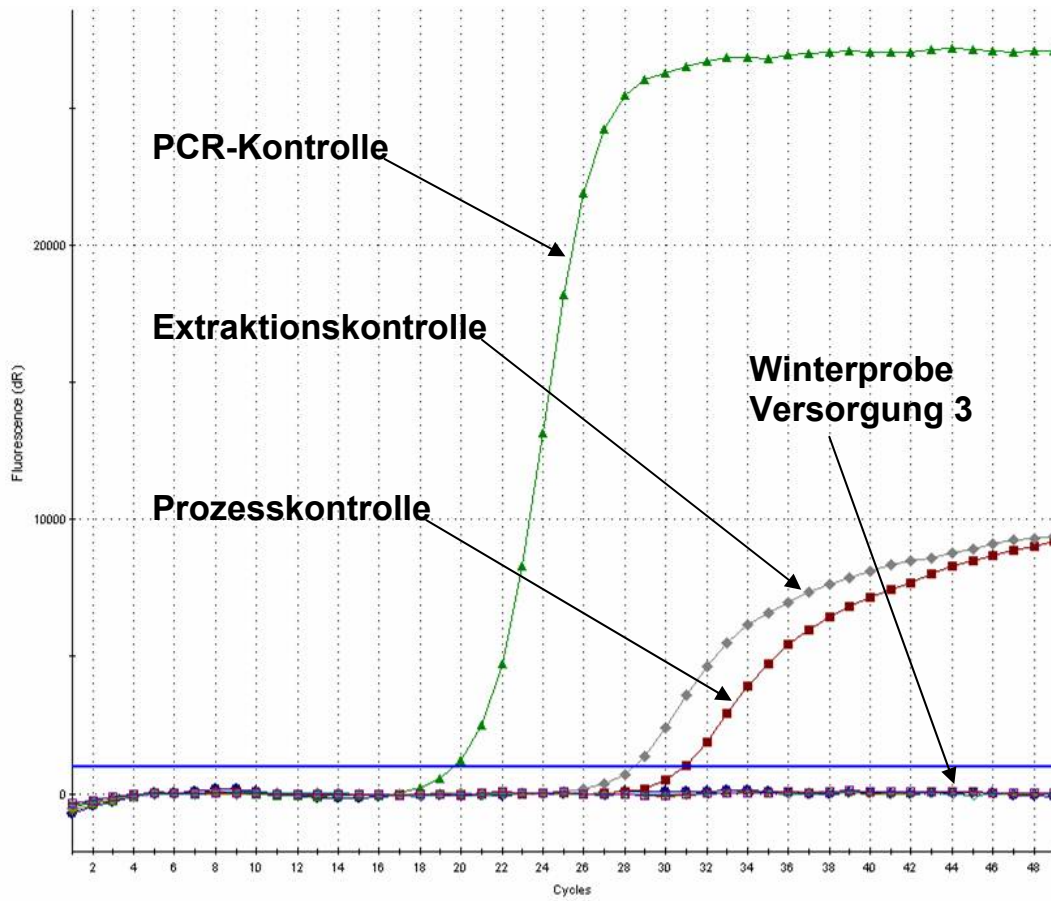


Abb. 16: Real-Time RT-PCR-Ergebnis der Winterprobe von Wasserversorgung 3 für Influenza A-Viren

V. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Nachweismethoden für virale Indikatoren in Trink- und Tränkwasser. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob diese Methoden in der Praxis anwendbar sind.

1. Auswahl der Viren und der Methoden

Als Anzeiger für fäkale Verunreinigungen im Wasser dienen üblicherweise die bakteriellen Indikatoren coliforme Bakterien, *E. coli* und intestinale Enterokokken. Viren können jedoch auch in bakteriologisch einwandfreiem Wasser vorkommen, da sie in der Regel widerstandsfähiger gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmaßnahmen sind als Bakterien. Bisher gibt es keinen allgemein anerkannten viralen Indikatororganismus, zumal auch Bakteriophagen als Indikatoren Schwächen aufweisen (s. II. 1.4.2.). Adeno- und Polyomaviren erschienen allerdings aus mehreren Gründen als Indikatorviren geeignet (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998; Albinana-Gimenez 2006; McQuaig et al. 2006). Zum einen gehören sie zu den widerstandsfähigsten Viren, da sie nicht behüllt sind und ein doppelsträngiges DNA-Genom besitzen. Zum anderen werden sie von einer Vielzahl von gesunden sowie kranken Menschen und Tieren ausgeschieden. Für diese Arbeit wurden deshalb humane und porcine Adenoviren sowie bovine Polyomaviren als Indikatorviren ausgewählt. Adenoviren können relativ einfach in Zellkultur vermehrt werden. Daher war bei humanen Adenoviren ein Nachweis auf Infektiosität durchführbar. Zusätzlich wurden die Wasserproben auf Inflenzaviren untersucht, da immer wieder die Frage aufkommt, ob Inflenzaviren im Wasserkreislauf ein Infektionsrisiko für Mensch und Tier darstellen. Im Rahmen einer Risikoabschätzung wurde für Geflügel ein hohes Risiko gesehen, wenn hochinfektiöse aviäre Inflenzaviren ins Tränkwasser gelangen (Schijven et al. 2005b).

Für die bei Virusuntersuchungen im Trinkwasserbereich üblichen Probenvolumina von 100 bis 1.000 Litern (Grabow et al. 2001) erschienen Adsorptions-/Elutionsverfahren (s. II. 3.1.1.) zur Aufkonzentrierung am besten geeignet. Negativ geladene Filtermaterialien erfordern vor der

Filtration die Absenkung des pH-Werts in der Wasserprobe auf ca. 3,5. Da Influenzaviren als behüllte Viren sensitiv auf saure pH-Werte reagieren (Goyal et al. 1980), bestünde die Gefahr, dass die Viruspartikel zerstört würden und nicht mehr an die Filter binden könnten. Filtrationen über Glaswolle oder positiv geladene Filter sind dagegen auch bei neutralem pH-Wert erfolgreich (Vilagines et al. 1993; Wyn-Jones und Sellwood 2001). Daher wurden diese Materialien für die vorliegenden Untersuchungen verwendet. Die Detektion der Viren erfolgte hauptsächlich über molekularbiologische Verfahren (s. V. 4.). Für den Nachweis infektiöser humaner Adenoviren erwies sich eine kombinierte Methode aus Zellkultur und PCR (ICC-PCR) als erfolgreich. Um die für die Untersuchung ausgewählten Wasserversorgungen besser charakterisieren zu können, wurden neben dem Virusnachweis bakteriologische und chemisch-physikalische Parameter erhoben sowie Bakteriophagen detektiert. Standardmethoden erlauben bei Bakteriophagen die Untersuchung eines Ausgangsvolumens von nur 1 ml. Daher wurde ein Verfahren für größere Volumina entwickelt.

2. Methodenetablierung

Die Etablierung der Nachweismethoden gliederte sich im Wesentlichen in vier Teile. Es wurde zunächst ein Verfahren zur Detektion von Bakteriophagen in großen Wasservolumina entwickelt. Dann wurden die PCR-Methoden für die Indikatorviren und das Verfahren zum Nachweis infektiöser Adenoviren und schließlich der Gesamt-Virusnachweis eingeführt.

2.1. Bakteriophagennachweis

Bakteriophagen ähneln in Größe und Struktur sowie zum Teil sogar in ihrer Resistenz gegenüber bestimmten Umwelteinflüssen und Desinfektionsverfahren human- und tierpathogenen Viren (Leclerc et al. 2000). Allerdings sind Bakteriophagen in der Regel wesentlich weniger resistent gegen pH-Wert-Extreme als enteropathogene Viren (Grabow 2001). Daher sind Adsorptions-/Elutionsverfahren zur Aufkonzentrierung großer Wasservolumina, wie die Glaswolle-Methode, für den Bakteriophagennachweis nur schlecht geeignet. Aufgrund des hohen pH-

Werts des Elutionspuffers und des niedrigen Werts bei der Fällung würden vermutlich viele Phagen abgetötet oder geschädigt werden, so dass sie in Plaque-Tests nicht mehr detektierbar wären. Daher wurde ein Verfahren entwickelt, das eine Aufkonzentrierung nicht erforderlich machte, sondern die direkte Untersuchung von 500 ml Wasser auf F-spezifische RNA-Bakteriophagen und somatische Coliphagen ermöglichte. Die Methode erwies sich als sehr empfindlich, ein Phagenpartikel in 1 l (zweimal 500 ml) Probe konnte erfasst werden.

2.2. PCR-Nachweise

Es wurden nur wenige eigene Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität der eingesetzten PCR-Methoden unternommen. Sind Bakterien die Zielorganismen, ist die Spezifitäts- und Sensitivitätsprüfung normalerweise wesentlich weniger aufwändig als bei Viren. Häufig stehen in den Stammsammlungen der Institute eine Reihe von Bakterienstämmen als Positiv- und Negativkontrollen zur Verfügung. So kann die Spezifität eines neuen PCR-Verfahrens relativ einfach überprüft werden. Sind die nachzuweisenden Bakterien gut kultivierbar, ist auch die Sensitivität problemlos bestimmbar. Verdünnungsreihen der Bakterienkulturen können ausplattiert und die DNA aus den Verdünnungen in die PCR eingesetzt werden. Für diese Arbeit standen nur wenige Virusisolate zur Verfügung und nur humane Adenoviren wurden im Rahmen der Arbeit in Zellkultur vermehrt. Allerdings wurde hauptsächlich auf Primer und Sonden zurückgegriffen, die schon in mehreren Veröffentlichungen verwendet worden waren.

Die Nachweisgrenze der PCR-Methoden (nested und Real-Time PCR) für humane Adenoviren lag im Bereich von einer Genomkopie pro PCR-Ansatz. Dies wurde mit quantifizierter Adenovirus 5-DNA bestimmt. Die Primer für die nested PCR werden schon seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt (Allard et al. 2001; Hundesa et al. 2006; Albinana-Gimenez et al. 2009b). Am LGL wurden mit dieser Methode abwasserbelastete Flusswasserproben im Rahmen des EU-Projekts „Virobathe“ untersucht. 80 % der Proben waren positiv für humane Adenoviren (Huber und Höller 2007), was ebenfalls auf die Eignung der Methode für im Wasser vorkommende humane Adenoviren hindeutet. Diese nested PCR

beinhaltet eine interne Amplifikationskontrolle (IAC), um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Enthält eine Probe z. B. Hemmstoffe, die zu einer vollständigen Inhibition der DNA-Amplifikation führen, wird dies durch ein Fehlen der IAC-Bande angezeigt. Sind Zielsequenzen nachweisbar, muss keine IAC-Bande ausgebildet sein. Bei höheren Viruskonzentrationen sind die IAC-Banden häufig schwach (s. Abb. 3) oder nicht vorhanden. Auf die Gültigkeit des Ergebnisses hat dies keinen Einfluss. Es bedeutet lediglich, dass der Mastermix nicht genügend Primer oder andere Bestandteile enthielt, um sowohl die Zielsequenzen als auch die Kontrollen zu amplifizieren. Häufig war zwischen der IAC- und der Zielsequenz-Bande noch eine weitere Bande zu sehen (s. Abb. 3), der aber keine spezielle Bedeutung beigemessen werden konnte. Mit der vergleichbar empfindlichen Real-Time PCR-Methode (s. o.) können die in einer Probe enthaltenen Adenovirus-Genomkopien quantifiziert werden (Hernroth et al. 2002; Bofill-Mas et al. 2006; Albinana-Gimenez et al. 2009b). Für die Erstellung von Standardkurven und somit die Quantifizierung unbekannter Proben wurden je drei Parallelen für jede Anzahl von Genomkopien (10^0 bis 10^4) angesetzt (s. Abb. 5). Bei 10^2 bis 10^4 Kopien wurden sehr homogene Ergebnisse erzielt, bei einer und zehn Kopien (10^0 und 10^1) wurde die Streuung breiter. Hinzu kommt noch, dass bei einer Kopie meist nicht alle drei Parallelansätze Signale zeigten. Man kann also davon ausgehen, dass die Quantifizierung in diesem Bereich nur mehr die Angabe ungefährender Werte ermöglicht.

Die nested PCR für Adenoviren des Schweins (Maluquer de Motes et al. 2004; Hundesa et al. 2006) wurde mit porcinen Adenoviren A etabliert. Mit DNA-Extrakten von bovinen Adenoviren kam es – wie erwartet – zu keiner Amplifikation.

Mit der am LGL entwickelten PCR für Polyomaviren konnten sowohl bovine als auch aviäre Polyomaviren erfasst werden. Obwohl bovine Polyomaviren die Zielorganismen bei der Untersuchung der Wasserversorgungen waren, konnten daher aviäre Polyomaviren, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, als Positivkontrollen verwendet werden. Zur Spezifitätsprüfung wurde ein PCR-Produkt sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte durch eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem

Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus die spezifische Amplifikation der Ziel-DNA.

Mit der Real-Time RT-PCR für Influenza A-Viren (Spackman et al. 2002) konnten porzine, aviäre und humane Influenzaviren detektiert werden. In Abb. 8 fällt auf, dass die Kurven der stärksten Verdünnung (10^{-5}) einen sehr flachen Verlauf zeigen. Dies macht es schwer, solche Kurven von negativen Signalen abzugrenzen. Weiterhin sieht man, dass die Ergebnisse der Parallelproben des unverdünnten RNA-Extrakts und der 10^{-1} -Verdünnung relativ stark streuen. Dies könnte auf die Limitierung von Primer, Sonden, Nukleotiden etc. zurückzuführen sein. Bei der Influenza-RT-PCR kam eine Amplifikationskontrolle zum Einsatz (Kontroll-RNA). Bei Vorhandensein großer Mengen des Zielorganismus (unverdünnt, 10^{-1} -Verdünnung) bleibt das Signal für die Kontroll-RNA aus oder wird sehr schwach (s. Abb. 9).

Insgesamt gelang die Etablierung der PCR-Nachweise ohne Schwierigkeiten. Die teilweise fehlenden Spezifitäts- und Sensitivitätsprüfungen werden nicht als problematisch angesehen, weil zum einen der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Etablierung von Nachweismethoden für Viren aus großen Wasservolumina lag. Dies bedeutet, dass Tests mit künstlich kontaminierten Proben einen Großteil der durchgeführten Untersuchungen darstellten. Hierfür waren die PCR-Nachweise auf jeden Fall geeignet. Zum anderen kamen für humane Adenoviren gut charakterisierte PCR-Nachweise zum Einsatz, mit der Real-Time PCR war hier sogar eine Quantifizierung der Virusgenome möglich.

2.3. ICC-PCR-Nachweis

Zur Detektion infektiöser humaner Adenoviren wurde eine Integrated Cell Culture (ICC)-PCR-Methode angewandt. Reine Zellkultur-Tests sind bei Adenoviren schwierig, da cytopathische Effekte schwer zu erkennen sind und die mikroskopische Untersuchung der Zellkultur daher keine sicheren Ergebnisse liefert. Im Vergleich zum reinen Zellkultur-Nachweis wird daneben deutlich Zeit eingespart (Reynolds et al. 1996; Greening et al. 2002). In den vorliegenden Untersuchungen konnten die Ergebnisse schon nach fünf Tagen Virusvermehrung erzielt werden. Die verwendeten

A549-Zellen wachsen schnell im wöchentlichen Zyklus. Sie sind sensitiv für viele Adenovirus-Serotypen und für den Nachweis von Adenoviren besser geeignet als die sonst in der Umweltvirologie üblicheren BGM-Zellen (Lee et al. 2004). Es mussten 500 Adenoviren in 1 ml Konzentrat von künstlich kontaminierten Proben enthalten sein, dass die ICC-PCR positive Signale gab, d. h. die Nachweisgrenze betrug 5.000 Viren in 10 l im Vergleich zu 1.000 Viren in 10 l Probe bei der rein molekularbiologischen Methode (s. IV. 4.1.1.). Grund für diese Abnahme könnte sein, dass ein Teil der Viren seine Infektiosität im Lauf des Aufkonzentrierungsprozesses verliert, z. B. in Folge der hohen bzw. niedrigen pH-Werte bei Elution und Fällung. Die Kontrollen zum Zeitpunkt $t = 0$ (s. IV. 3.) wurden mitgeführt, um sicher zu stellen, dass es sich bei den detektierten Viren um infektiöse Viren handelte, die sich vermehrt hatten. Wäre eine Kontrolle positiv, würde dies bedeuten, dass Viren aus dem Inokulum nachgewiesen werden.

2.4. Gesamt-Virusnachweis

Zunächst stellte sich die Frage, mit welchen Probenvolumina Versuche zur Etablierung der Methode durchgeführt werden sollten. Probenvolumina von 100 bis 1.000 Litern, wie sie für eine virologische Untersuchung von relativ sauberem Wasser sinnvoll sind (s. o.), sind im Labor nicht handhabbar. Da zur künstlichen Kontamination der Proben menschliche und tierische Krankheitserreger verwendet wurden, musste das Filtrat aufgefangen und autoklaviert werden, da nicht alle Viren an das Filtermaterial gebunden werden. Es wurde mit 10 l-Proben (5 l Leitungswasser + 5 l destilliertes Wasser) gearbeitet, die mit den verschiedenen Virustypen versetzt wurden. Diese Probenvolumina machten zum einen eine echte Aufkonzentrierung nötig, zum anderen waren sie im Labormaßstab noch einsetzbar.

Positiv geladenes Filtermaterial (Virosorb® 1MDS-Filterkartusche) wurde nur für eine Aufkonzentrierung verwendet. Der Hauptgrund dafür war, dass während der Filtration Wasser aus einem Entlüftungsventil austrat, obwohl keine Fehlfunktion erkennbar war. Dies stellte eine Infektionsgefahr dar, da die Probe mit humanen Adenoviren versetzt worden war. Für Versuche mit menschlichen und tierischen

Krankheitserregern erwiesen sich diese Filter daher als nicht geeignet. Es ist allerdings vorstellbar, sie bei der Aufkonzentrierung von Trinkwasser einzusetzen, wie es in den USA häufig geschieht (Sobsey und Jones 1979; Abbaszadegan et al. 1999; Borchardt et al. 2003), da im Trinkwasser normalerweise mit sehr geringen Viruskonzentrationen zu rechnen ist. Weiter ergaben sich Zweifel bzgl. der Effizienz des Systems. Beim beschriebenen Experiment war das Konzentrat in der Adenovirus-PCR negativ. Andere Untersuchungen, in denen dieses System ebenfalls überprüft wurde, wiesen darauf hin, dass es schlechte Wiederfindungsraten lieferte (persönliche Mitteilungen: Dr. Jane Sellwood, Health Protection Agency, Großbritannien und Prof. Rosina Girones, Universität Barcelona, Spanien). Viren wurden zwar gut an das Filtermaterial gebunden, ließen sich aber schlecht wieder ablösen. Albinana-Gimenez et al. (2009a) ermittelten Wiederfindungsraten von nur 0,016 % für elektropositive Filter.

Mit Glaswolle als Filtrationsmaterial zeigte sich schon in den ersten Versuchen, dass die Wiederfindungsraten für humane Adenoviren und Influenzaviren unter 10 % lagen. Daher wurden verschiedene Schritte im Aufkonzentrierungsprozess variiert, um eine Steigerung der Raten zu erzielen. Außerdem wurde in einigen Experimenten versucht herauszufinden, in welchen Stufen der Aufkonzentrierung und des Virusnachweises es zu Verlusten kam.

Viren binden sowohl bei neutralem als auch bei saurem pH-Wert an Glaswolle (Vilagines et al. 1993; Albinana-Gimenez et al. 2009a). In den durchgeführten Vergleichsuntersuchungen stiegen die Wiederfindungsraten bei einer pH-Wert-Absenkung auf 3,5 von 1,7 % auf 8,0 % (s. IV. 4.1.2.). Albinana-Gimenez et al. (2009a) berichten ebenfalls von ungefähr viermal höheren Raten (4,2 gegenüber 0,95 %), wenn die Proben vor der Filtration angesäuert wurden. Die eingesetzte Glaswolle schien also neben den positiv geladenen (Lambertini et al. 2008) mehr negativ geladene Bereiche aufzuweisen. Daher wurden die Viren besser gebunden, wenn ihre Oberfläche durch pH-Wert-Absenkung im Wasser positiv geladen war. Aus zwei Gründen wurde die Methodenentwicklung trotzdem mit neutralem pH-Wert fortgeführt. Zum einen sollten mit dieser

Methode auch säureempfindliche Influenzaviren aufkonzentriert werden. Zum anderen sollte das Verfahren in der Praxis eingesetzt werden, wo mehrere hundert Liter Wasser direkt aus einem Brunnen oder einer Quelle filtriert werden. Hier wäre eine pH-Wert-Absenkung auf 3,5 schwer machbar.

Bei Filtrationsgeschwindigkeiten zwischen 0,5 und 1,5 Litern pro Minute waren keine signifikanten Änderungen in den Wiederfindungsraten auszumachen. Eine Unabhängigkeit der Raten von der Filtrationsgeschwindigkeit (0,5 bis 4 Liter pro Minute) wurde auch von Lambertini et al. (2008) beschrieben. Daher wurde die ursprünglich gewählte Geschwindigkeit von ca. 1 Liter pro Minute, die auch in anderen Studien verwendet wurde (Huber und Höller 2007; Albinana-Gimenez et al. 2009a), beibehalten.

In den Versuchen, in denen eine größere Menge Glaswolle pro Säule eingesetzt wurde – entweder in den Standard-Säulen oder in Säulen mit größerem Durchmesser – blieben die Wiederfindungsraten im Mittel unverändert (s. IV. 4.1.4). Ein Grund dafür könnte sein, dass den Viren zwar mehr Oberfläche zur Verfügung stand, um elektrostatisch gebunden zu werden, dass sie aber gleichzeitig aus dieser größeren Oberfläche auch schlechter eluiert werden konnten. Die Beobachtung, dass durch kleine Stücke Moskitonetz zwischen den Glaswolle-Fractionen die Wiederfindungsraten erhöht wurden (persönliche Mitteilung: Prof. Maureen Taylor, University of Pretoria, Südafrika), konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Hier könnte ebenfalls eine verbesserte Bindung aufgrund der längeren Verweildauer innerhalb der Glaswolle durch eine schlechtere Ablösung der Viren aufgehoben worden sein.

Es wurde Glaswolle verschiedener Hersteller überprüft. Das schon mehrfach beschriebene Produkt der Firma Ouest Isol (Vilagines et al. 1993; van Heerden et al. 2005; Lambertini et al. 2008) erwies sich dabei als das effektivste.

Statt Fleischextrakt- kann auch Magermilch-Glycin-Puffer (Pallin et al. 1997) zur Elution der Viren verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit führte dies jedoch zu schlechteren Wiederfindungsraten.

Zur sekundären Konzentrierung mit Hilfe organischer Flockung wurden die pH-Werte der Eluate auf 3,3 eingestellt, da eine weitere Senkung auf 3,2 zu keiner Verbesserung und eine Erhöhung auf 3,4 zur Verschlechterung der Ausbeuten führte.

Bei der Zentrifugationszeit erwies sich eine Verdopplung auf 60 min als geeignet, die Ausbeuten zu steigern (s. IV. 4.1.5.). Dies beruht vermutlich darauf, dass einige Proteinflocken länger zum Absetzen brauchten. Die längere Zentrifugationszeit wurde anschließend beibehalten.

Durch Ultrazentrifugation statt normaler Zentrifugation wurden die Ausbeuten zunächst deutlich verbessert. Die Reproduktion dieser Ergebnisse gelang allerdings nicht, in den weiteren Versuchen lagen die Ausbeuten in der gleichen Größenordnung wie bei normaler Zentrifugation. Die pH-Absenkung im Eluat führt zur Ausfällung von Proteinflocken, in die auch die meisten Viruspartikel eingebunden sind. Offenbar sind diese Flocken schwer genug, dass eine Zentrifugation bei 4.400 x g ähnlich gute Ergebnisse liefert wie eine Ultrazentrifugation.

Neben 3 %igem (Katzenelson et al. 1976; Lambertini et al. 2008) kann auch 0,5 %iger (Vilagines et al. 1993; Ehlers et al. 2005) Fleischextrakt-Glycin-Puffer zur Elution der Viren verwendet werden. Die Ausbeuten nach organischer Flockung und Zentrifugation waren für beide Möglichkeiten ähnlich groß. Statt mit Hilfe organischer Flockung können Eluate mit Polyethylenglykol (PEG) sekundär konzentriert werden (Vilagines et al. 1997b; Huang et al. 2000; van Heerden et al. 2005). Bei Verwendung von PEG wurden nach Fällung und Zentrifugation Ausbeuten erzielt, die ähnlich hoch waren wie diejenigen für organische Flockung. In einem Experiment, in dem eine künstlich kontaminierte Probe filtriert und das Eluat zur Fällung mit PEG versetzt wurde, konnten allerdings keine Viren nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender Verbesserungen der Ausbeuten durch ein anderes Elutionsmittel (0,5 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer) oder eine andere Art der Fällung (PEG) wurde das ursprüngliche Protokoll (3 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer und organische Flockung) beibehalten.

Ultrafiltration stellt eine Möglichkeit zur weiteren Konzentrierung von Wasserproben dar (Rutjes et al. 2005; Dubois et al. 2007). In der

vorliegenden Arbeit wurden Probenkonzentrate ultrafiltriert, im Retentat waren jedoch keine Viren detektierbar. Wahrscheinlich adsorbierten die Viren fest an die Membran statt nur von ihr zurückgehalten zu werden (Wyn-Jones und Sellwood 2001). Ein weiterer Elutionsschritt könnte die adsorbierten Viren wieder von der Membran lösen (Rajal et al. 2007b). Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht überprüft.

Da alle hier aufgeführten Variationen innerhalb des Aufkonzentrierungsprozesses nicht zu deutlichen Verbesserungen der Wiederfindungsraten führten, wurde zu ergründen versucht, wo die größten Virusverluste auftraten. Bei organischer Flockung und Zentrifugation allein wurden Ausbeuten von lediglich 23 % im Mittel erzielt. Wurden die Überstände ein weiteres Mal gefällt und zentrifugiert, ließ sich die Gesamtausbeute auf 30 % steigern. In vier der fünf Experimente zur Identifizierung des Virusverlusts bei der gesamten Aufkonzentrierung (s. IV. 6.1.7.2.) konnte diese relativ geringe Erhöhung der Ausbeuten durch eine weitere Fällung und Zentrifugation der Überstände der ersten Eluate bestätigt werden. In den gleichen vier Tests waren auch durch eine zweite Elution der Viren von der Glaswolle nur geringfügig höhere Ausbeuten zu verzeichnen. Bei der Filtration kam es zu völlig unterschiedlichen Virusverlusten von 0 bis 86 %. Erstaunlicherweise lagen dagegen die Wiederfindungsraten mit ca. 2 bis 5 % in der Standardmethode bzw. mit ca. 2 bis 8 % bei Einrechnung des zweiten Eluats und des Überstands des ersten Eluats in der gleichen Größenordnung. Der nur moderate Anstieg der Wiederfindungsraten durch eine zweite Elution und die erneute Fällung und Zentrifugation des ersten Eluats rechtfertigte nicht den wesentlich höheren Arbeits- und Zeitaufwand. Daher wurde bei den weiteren Versuchen wieder auf diese Zusatzschritte verzichtet.

Dass Fällung und Zentrifugation alleine schon ineffizient erscheinen, könnte auch auf Probleme bei der Nukleinsäureextraktion hindeuten. So könnte ein Großteil der Viren durchaus im Präzipitat vorliegen, eine unvollständige Extraktion würde allerdings das Ergebnis verfälschen. So könnten beispielsweise die Viren im Probenkonzentrat durch organische Substanzen aus dem Elutionspuffer geschützt sein. Der Lysepuffer in der Extraktion könnte somit seine volle Wirksamkeit nicht entfalten. Durch ein-

oder mehrmaliges Einfrieren und Auftauen sowie durch den Einsatz von Ultraschall (van Heerden et al. 2005) wurde versucht, die Proteinflocken aufzubrechen und die Viren dem Lysevorgang besser zugänglich zu machen. Dadurch konnten jedoch nur in zwei Fällen die Wiederfindungsraten erhöht werden, bei den übrigen Experimenten nahmen sie ab. Vermutlich wurde ein Teil der Viren oder sogar ihre Nukleinsäuren durch Einfrieren und Auftauen bzw. durch Ultraschallbehandlung zerstört. Die Verwendung eines kommerziellen Kits (Nucleo Spin® RNA Virus F Kit) zur Nukleinsäureextraktion (Calgua et al. 2008) statt der sonst durchgeführten Methode mit magnetischen Silikapartikeln erbrachte nur negative PCR-Ergebnisse. Dies kann wahrscheinlich unter anderem damit begründet werden, dass bei diesem Kit nur ein Fünftel des sonst üblichen Ausgangsvolumens von 5 ml eingesetzt werden kann.

Insgesamt lagen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten in künstlich kontaminierten 10 l-Wasserproben für humane Adenoviren bei 2,9 % und für Influenzaviren bei 6,0 % (s. IV. 4.1.1.). Diese Raten konnten nicht weiter gesteigert werden, obwohl verschiedenste Schritte im Aufkonzentrierungsprozess variiert wurden (s. o.). Aufeinanderfolgende Ergebnisse waren zum Teil widersprüchlich. So zeichnete sich häufig in einem Experiment ab, dass eine bestimmte Veränderung des Protokolls die Wiederfindungsrate erhöhte, beim nächsten Experiment war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Ein Grund für die Schwankungen könnte sein, dass der gesamte Nachweis sehr viele Schritte umfasste und mit relativ geringen Viruskonzentrationen in großen Wassermengen gearbeitet wurde. So kann schon jede kleine Veränderung in der Effizienz eines Einzelschrittes bedeutende Auswirkungen auf das Gesamtergebnis haben. Girones et al. (2010) beschrieben große Schwankungen der Wiederfindungsraten innerhalb eines Labors. Auch bei den Experimenten, in denen versucht wurde, die Schritte mit den größten Virusverlusten zu identifizieren, waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Besonders die Filtrationsverluste schwankten stark, wofür jedoch keine Ursache zu erkennen war. Trotzdem können mit der beschriebenen Methode geringe Viruskonzentrationen in großen Wasservolumina detektiert werden. Bei

Wiederfindungsraten von mindestens 2 % werden 1.000 Partikel von humanen Adenoviren in 10 l, d. h. 10 Partikel in 100 ml Wasser, nachgewiesen.

3. Erprobung der Methoden in der Praxis

Es wurden zehn Wasserversorgungen für das Untersuchungsprogramm ausgewählt. Die untersuchten Rohtrinkwässer konnten auch als repräsentativ für Tränkwässer angesehen werden. Als Tränkwasser wird in einem landwirtschaftlichen Betrieb entweder Trinkwasser aus dem öffentlichen System oder Wasser aus einem eigenen Brunnen verwendet. Da alle Versorgungen relativ schlecht geschützte Wasservorkommen nutzten, war die hygienische Wasserqualität vermutlich nicht besser als die Qualität üblicherweise genutzter Tränkwässer. Es wurden „problematische“ Wasserversorgungen gewählt und schwerpunktmäßig die Rohwässer untersucht, um die Chancen zu erhöhen, Viren nachzuweisen.

Wie erwartet ergab sich eine Reihe von Auffälligkeiten in der bakteriologischen und chemisch-physikalischen Untersuchung. In fast der Hälfte der 39 Proben waren sogar die mikrobiologischen Grenzwerte der TrinkwV 2001 überschritten. In acht Proben konnte eine fäkale Belastung durch den Nachweis von *E. coli* und/oder intestinalen Enterokokken bewiesen werden. Die in elf Proben detektierten coliformen Bakterien können allerdings auch von sich zersetzendem Pflanzenmaterial stammen. Ihre Anwesenheit im Trinkwasser ist trotzdem nicht erwünscht und nach TrinkwV 2001 nicht zulässig, da sie auf einen nicht ausreichenden Schutz des Wasservorkommens hindeutet. Bakterien der *Flexibacter-/Sporocytophaga*-Gruppe wurden in einem Großteil der Proben mit Grenzwertüberschreitungen und darüber hinaus in sechs weiteren Proben gefunden. Dieser Nachweis kann ebenfalls einen Hinweis auf mangelhafte Bodenfilterwirkung geben (Schindler und Metz 1989). Bei der chemisch-physikalischen Untersuchung waren knapp 60 % der Proben einwandfrei. Die Nichteinhaltung der Grenzwerte war hauptsächlich auf zu niedrige pH-Werte zurückzuführen (sechs Proben), zwei Proben überschritten jedoch die Grenzwerte für die Trübung. Die

sechs Proben mit zu niedrigen pH-Werten und acht weitere Proben lieferten auffällige Teilergebnisse, vor allem hohe Werte bei Trübung, Nitrat, Oxidierbarkeit und UV-Absorption. Grenzwertüberschreitungen bzw. erhöhte Werte bei diesen Parametern können schlechte Bodenfilterwirkung anzeigen. An hohen Nitratkonzentrationen kann man landwirtschaftliche Einflüsse erkennen. Nur bei Versorgung 9 waren alle bakteriologischen und chemisch-physikalischen Untersuchungen einwandfrei. Allerdings hatte auch diese Versorgung in der Vergangenheit Probleme mit erhöhten Pflanzenschutzmittel-Konzentrationen (persönliche Mitteilung des Wasserwerts).

Insgesamt waren nur zwei Proben für F-spezifische RNA-Bakteriophagen und somatische Coliphagen positiv, beide von Wasserversorgung 8. Es wurden also nicht in allen eindeutig fäkal belasteten Proben (s. o.) Bakteriophagen gefunden, obwohl die Methode mit einer Nachweisgrenze von einem Phagenpartikel in einem Liter Wasser sehr sensitiv war. Damit bestätigt sich auch hier der Einwand von Lewis (1995), dass die relativ geringe Häufigkeit von F-spezifischen Bakteriophagen es fragwürdig erscheinen lässt, ob sie als Indikatoren für virale Verunreinigungen geeignet sind.

Bei allen 39 virologischen Probenahmen konnten 300 bis 500 Liter über je eine Säule mit Glaswolle filtriert werden (s. IV. 5.3.). Es wurden keine humanen und porcinen Adeno-, keine Polyoma- und keine Influenzaviren detektiert. Falsch negative Ergebnisse wurden durch Prozess-, Extraktions-, Amplifikations-, Inhibitions- und PCR-Kontrollen verhindert. Die Amplifikations- und Inhibitionskontrollen, die bei den Real-Time (RT-) PCR-Nachweisen für humane Adeno- und Influenzaviren mitgeführt wurden, zeigten an, dass in den Nukleinsäureextrakten häufig PCR-Hemmstoffe enthalten waren. Diese Inhibitoren waren zusammen mit den Viren aufkonzentriert worden. Die Hemmung der PCR kann durch Verdünnung der Nukleinsäureextrakte abgeschwächt oder aufgehoben werden (Gregory et al. 2006). Für eine erfolgreiche PCR wurden die Nukleinsäureextrakte daher meist 1:2 oder 1:10 verdünnt, in einigen Fällen sogar 1:100. Die Verdünnung verringerte natürlich die Sensitivität der Gesamtmethode. Besser war es daher, im Mastermix bovines

Serumalbumin (BSA) zuzugeben, wie von verschiedenen Autoren vorgeschlagen (Kreader 1996; Wilson 1997; Abu Al-Soud und Radström 2000). Durch BSA wurden Hemmstoffe neutralisiert, so dass häufig die unverdünnten Extrakte analysiert werden konnten.

Der Nachweis humaner Adenoviren (HAdV) erfolgte nur mit Real-Time PCR, da die Voruntersuchungen zeigten, dass die nested PCR nicht empfindlicher war (s. IV. 2.1.). Alle Proben wurden als negativ angesehen, obwohl bei der Sommerprobe von Wasserversorgung 3 in der PCR ein sehr schwaches Signal erkennbar war. Das Ergebnis der Sequenzierung des PCR-Produkts (HAdV 2) machte es sehr wahrscheinlich, dass es sich um eine Kontamination handelte. HAdV 2 wurde nämlich sowohl in der Phase der Methodenentwicklung als auch während des Zeitraums der Probenahmen zur künstlichen Kontamination der (Kontroll-)Wasserproben eingesetzt. Während der Methodenentwicklung war es ebenfalls ganz vereinzelt vorgekommen, dass die negative Prozesskontrolle in der PCR schwach positiv getestet wurde. Probengefäße, Schläuche, Filtrations-säulen, Zentrifugationsgefäße oder die pH-Elektroden könnten mit HAdV-DNA kontaminiert gewesen sein. Gebrauchte Probengefäße und Schläuche wurden autoklaviert, gereinigt und erneut autoklaviert. Säulen, Zentrifugationsgefäße und pH-Elektroden wurden chemisch desinfiziert und gespült (s. Anhang: IX. 1.1.2.1). In beiden Fällen könnten unter Umständen DNA-Reste zurückgeblieben sein. Normalerweise war dies allerdings nicht der Fall, was durch Prozess-Negativkontrollen (nicht mit Viren versetzte 10 l-Proben aus destilliertem Wasser und Leitungswasser) bestätigt wurde. Die mit der zweiten Hälfte des Konzentrats der Sommerprobe von Versorgung 3 durchgeführte ICC-PCR war negativ. Hätte die Probe wirklich HAdV enthalten, wäre ein negatives Resultat hier zwar auch möglich. Ein Grund dafür wäre, dass die Konzentration der Viren nicht ausgereicht hätte, da die Nachweisgrenze für die ICC-PCR fünfmal höher lag als für den rein molekularbiologischen Nachweis (s. V. 2.3.). Weiter könnten die Viren durch den Aufkonzentrierungsprozess ihre Infektiosität verloren haben. Die weitaus wahrscheinlichere Begründung ist jedoch, dass es sich um eine Kontamination mit HAdV 2-DNA handelte und deshalb keine infektiösen Viren vorhanden waren. Zur Verhinderung

falsch negativer Ergebnisse wurden Prozess-, Extraktions-, Inhibitions- und PCR-Kontrollen verwendet. Für die zur Quantifizierung erstellten Standardkurven wurden die Ct-Werte für 10^2 , 10^3 und 10^4 Genomkopien eingesetzt (s. Abb. 13). Die Werte für 10^0 und 10^1 Kopien wurden zusätzlich erhoben. Sie dienten aber nur zur Überprüfung der Sensitivität des PCR-Laufs, für die Standardkurve waren sie nicht geeignet, da sie zu sehr schwankten (s. V. 2.2.).

Auch für die Nachweise von porzinen Adeno-, aviären und bovinen Polyoma- und Inflenzaviren wurden falsch negative Resultate durch diverse Kontrollreaktionen ausgeschlossen. Die PCR-Nachweise für porzine Adeno- und für Polyomaviren beinhalteten jedoch keine Amplifikations- oder Inhibitionskontrollen. Es ist zwar möglich, dass verschiedene PCR-Methoden unterschiedlich auf Hemmstoffe reagieren. Diese Möglichkeit wurde hier ausgeschlossen. Es wurde hingegen angenommen, dass die Verdünnungsstufen der Nukleinsäureextrakte, bei denen mit Hilfe der Amplifikations- bzw. Inhibitionskontrollen in der Inflenzavirus- und der HAdV-PCR keine Inhibition mehr feststellbar war, auch für die beiden anderen PCR-Nachweise keine Hemmstoffe mehr aufwiesen.

4. Bewertung der etablierten Methode zum Virusnachweis

Ein großer Vorteil der in dieser Arbeit etablierten Aufkonzentrierungsmethode ist, dass sie für verschiedene Viren angewendet werden kann, sowohl für behüllte und unbehüllte, für RNA- und DNA-Viren als auch für Viren unterschiedlicher Größe. Das Filtrationsmaterial Glaswolle ist kostengünstig und die meisten Gerätschaften, die benötigt werden, sind in einem mikrobiologischen Labor vorhanden. Glaswolle als Filtrationsmaterial machte es außerdem möglich, mehrere hundert Liter Wasser ohne Vorbehandlung zu filtrieren. Bei Verwendung von negativ geladenen Membranfiltern hätte zum einen der pH-Wert im Wasser auf ca. 3,5 abgesenkt werden müssen (Fong und Lipp 2005). Zum anderen wären hier Vorfilter erforderlich (Wyn-Jones et al. 2000). Beim Einsatz von Vorfiltern besteht die Gefahr, dass die Ausbeute sinkt, da an Partikel

gebundene Viren von den Vorfiltern zurückgehalten werden könnten. Die Viren wurden größtenteils nur molekularbiologisch detektiert. Bei der verwendeten Methode zur Nukleinsäureextraktion konnte ein für molekularbiologische Tests außergewöhnlich großes Ausgangsvolumen von 5 ml eingesetzt werden. Dies war bei den zu erwartenden geringen Viruskonzentrationen in den Probenkonzentraten sehr vorteilhaft. Die PCR-Nachweise waren unproblematisch und durch Kontrollen abgesichert. Der gesamte Virusnachweis könnte also in der Regel von einem nicht auf Viren spezialisierten mikrobiologischen Labor durchgeführt werden. Nur für den Nachweis infektiöser HAdV durch ICC-PCR waren in dieser Arbeit Zellkulturen erforderlich. Dass zumindest ein Teil der Adenoviren die Aufkonzentrierung ohne Verlust der Infektiosität überstand, wurde während der Methodenetablierung bestätigt (s. IV. 3.). In einer Studie, in der Oberflächenwasserproben mit einer ähnlichen Methode aufkonzentriert wurden, waren in 16 % der HAdV-PCR-positiven Proben auch infektiöse Viren zu finden (Huber und Höller 2007). Für porcine Adeno-, Polyoma- und Influenzaviren wurde die Infektiosität nach Aufkonzentrierung nicht überprüft. Allerdings sind für porcine Adeno- und für Polyomaviren ähnliche Ergebnisse wie für HAdV zu erwarten, da es sich ebenfalls um unbehüllte, widerstandsfähige Viren handelt (Frey et al. 2003). Influenzaviren sind dagegen behüllt und empfindlich gegenüber pH-Wert-Extremen (Goyal et al. 1980). Molekularbiologisch waren sie zwar problemlos nachweisbar, ihre Infektiosität hatten sie vermutlich jedoch verloren, da sie bei Elution und organischer Fällung hohen und niedrigen pH-Werten ausgesetzt waren. Mit Hilfe von Zellkultur-Nachweisen oder kombinierten Methoden wie ICC-PCR können Aussagen über das Infektionsrisiko getroffen werden. Mit rein molekularbiologischen Nachweisen ist dies nicht möglich. Nukleinsäuren im Wasser weisen aber auf eine Verunreinigung hin, die generell im Trinkwasser nicht erwünscht ist (Abbaszadegan et al. 1999). PCR-Nachweise haben den Vorteil, dass sie rasch Ergebnisse liefern, sensitiv sind und eine Identifizierung der Zielorganismen auf Spezies-, Serotyp- oder Genotyp-Ebene ermöglichen. Manche Viren sind zudem ausschließlich molekularbiologisch erfassbar, weil sie in Zellkulturen nicht vermehrt werden können (Girones et al. 2010).

Obwohl die etablierte Methode zum Virusnachweis diverse Vorteile beinhaltet, erscheinen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten von knapp 3 % und 6 % für HAdV bzw. Influenzaviren verbesserungswürdig. In den zahlreichen Experimenten, in denen Einzelschritte der Aufkonzentrierung variiert wurden, gelang dies jedoch nicht (s. V. 2.4.). Besonders in älteren Studien wurden Wiederfindungsraten von über 60 % für Entero- bzw. Polioviren bestimmt, wenn Glaswolle zur Filtration verwendet wurde (Vilagines et al. 1993; Vilagines et al. 1997a). Aber auch in einer neueren Untersuchung (Lambertini et al. 2008) wird eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 21 % für Adenovirus 41 angegeben. Albinana-Gimenez et al. (2009a) fanden dagegen Raten von im Mittel 0,95 % für 10 l- und 1,21 % für 50 l-Proben. Es handelte sich dabei um Proben, die mit denen in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar waren, da sie ebenfalls aus Leitungswasser und destilliertem Wasser bestanden und mit HAdV 2 gezielt versetzt worden waren. Die sehr unterschiedlichen Raten können mit den Methoden begründet werden, die für die Bestimmung der Ausgangskonzentrationen in den Wasserproben angewandt wurden. Man kann davon ausgehen, dass Werte von weit unter 10 % für die Wiederfindungsraten am ehesten der Realität entsprechen. In älteren Untersuchungen wurden die Ausgangskonzentrationen der zur künstlichen Kontamination der Proben verwendeten Virussuspensionen vermutlich meist stark unterschätzt, da die Quantifizierung damals mit Plaquetests erfolgte. Die Anzahl der dabei ermittelten „Plaque bildenden Einheiten“ entsprach normalerweise nicht der Anzahl der Viruspartikel. Erst durch die Zugabe zur Wasserprobe lösten sich die Einheiten in einzelne Partikel auf (Albinana-Gimenez et al. 2009a). So konnte es zur Berechnung der hohen Wiederfindungsraten von über 60 % kommen. Bei Verwendung quantitativer PCR-Methoden sollte es jedoch nicht zu derartigen Effekten kommen, da hier die Anzahl der Genomkopien bestimmt wird. Dabei kommt es nicht darauf an, ob verklumpte oder einzeln vorliegende Viruspartikel analysiert werden, vorausgesetzt die Verklumpung beeinflusst nicht die Effizienz der Lyse bei der Nukleinsäureextraktion. Auf ineffiziente Nukleinsäureextraktion und/oder PCR könnte man bei der oben zitierten Arbeit von Lambertini et al. (2008) schließen. Hier wurde vermutlich ebenfalls die

Ausgangskonzentration klar unterschätzt. Die Konzentration wurde zwar mit quantitativer PCR ermittelt, aber nicht direkt aus der Virussuspension. Vielmehr wurde das Konzentrat einer Negativkontrolle mit Viren gezielt versetzt und daraus die Ausgangskonzentration bestimmt. Diese Vorgehensweise erscheint nicht nachvollziehbar. Sie birgt die Gefahr, dass die Viruspartikel durch Inhaltsstoffe des Elutionspuffers vor der Lyse bei der Extraktion geschützt werden und/oder PCR-Inhibitoren zu geringeren Ergebnissen führen. Vermutlich lagen daher die vermeintlichen Wiederfindungsraten bei über 20 %. In der vorliegenden Arbeit und in der Studie von Albinana-Gimenez et al. (2009a) wurden die Ausgangskonzentrationen direkt aus den Virussuspensionen, mit denen die Proben versetzt worden waren, bestimmt. Zusammenfassend ergibt sich also, dass die erzielten Wiederfindungsraten von ca. 3 und 6 % durchaus zufriedenstellend sind, da sie in der gleichen Größenordnung wie in der neuesten Literatur beschriebene Werte liegen.

Anzumerken ist noch, dass im Allgemeinen Wiederfindungsraten aus verschiedenen Untersuchungen schwer zu vergleichen sind, selbst wenn die gleiche oder zumindest eine ähnliche Methode verwendet wird. Zum einen kommt es schon zu beträchtlichen Schwankungen zwischen verschiedenen Experimenten innerhalb eines Labors (Girones et al. 2010). Zum anderen hängen die Raten von der Zusammensetzung des verwendeten Wassers ab (Lambertini et al. 2008). Die darin enthaltenen Salze und multivalenten Kationen sowie der pH-Wert beeinflussen die Adsorption der Viren an das Filtermaterial (Hsu et al. 2007). Sogar die Wahl des Virus-Serotyps kann Auswirkungen auf die Ergebnisse haben (Lambertini et al. 2008). So kann die Effizienz der organischen Flockung je nach Serotyp variieren (Morris und Waite 1980).

Bei der Untersuchung von zehn Wasserversorgungen wurden weder Indikatorviren noch Influenzaviren detektiert, obwohl ein beträchtlicher Teil der Proben bakteriologisch und chemisch-physikalisch auffällig war. Die Proben waren entweder virusfrei oder die Konzentration an Viren war zu gering, um sie nachzuweisen. Bei sehr geringen Konzentrationen ist die Sensitivität der angewandten Methode von entscheidender Bedeutung. Die Wiederfindungsraten von ca. 3 und 6 % für HAdV und Influenzaviren

wurden mit Hilfe künstlich kontaminierter 10 l-Proben ermittelt. 1.000 Viruspartikel in 10 l sind mit dieser Methode sicher nachweisbar (s. V. 2.4.). Bei den Probenahmen wurden 300 bis 500 Liter filtriert. Hier stellt sich die Frage, ob sich die Nachweisgrenze extrapolieren lässt, d. h. ob auch 1.000 Viruspartikel in 300 bis 500 Litern, also 10 Partikel in drei bis fünf Litern, detektierbar sind. Möglich wäre auch eine geringere Nachweisgrenze, wenn bereits an die Glaswolle gebundene Viren durch neu hindurchströmendes Wasser wieder abgelöst würden. Eine direkte Überprüfung dieser Fragestellung, d. h. die Bestimmung der Wiederfindungsraten mit Hilfe künstlich kontaminierter Proben, die mehrere hundert Liter umfassten, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Vilagines et al. (1993) fanden eine Verschlechterung der Wiederfindungsraten, wenn sie 400 bis 1.000 l statt 100 l untersuchten. Diese Verschlechterung war jedoch nicht signifikant. In einer weiteren Untersuchung wurden keine signifikanten Änderungen der Raten bei Probenvolumina zwischen 10 und 1.597 l verzeichnet (Lambertini et al. 2008). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die hier angewandte Methode sensitiv war und wahrscheinlich schon eine geringe Kontamination mit Viren in den Wasserversorgungen nachweisbar gewesen wäre. Dies gilt vor allem für HAdV, da die Real-Time PCR mit ihrer Nachweisgrenze von einer Genomkopie pro Ansatz sehr empfindlich war. Anderen Autoren gelang der Nachweis von HAdV aus (Roh-) Trinkwasser, hauptsächlich außerhalb Europas (Lee und Kim 2002; van Heerden et al. 2003; Verheyen et al. 2009). Aber auch aus Spanien sind HAdV-Funde im Trinkwasser bekannt (Albinana-Gimenez et al. 2009b). Oberflächengewässer sind in Deutschland sehr häufig mit HAdV belastet (Huber und Höller 2007; Hamza et al. 2009). Dies legt nahe, dass diese Viren auch in den Trinkwasserkreislauf geraten könnten. Einige der hier untersuchten Wasserproben konnten aufgrund der Nachweise von *E. coli* und/oder intestinalen Enterokokken als eindeutig fäkal belastet bewertet werden. Ob die fäkale Belastung menschlicher oder tierischer Natur war, kann mit den Indikatorbakterien nicht entschieden werden. In ersterem Fall sollten auch HAdV ins Grundwasser gelangt sein. Ihre Konzentration könnte jedoch so gering gewesen sein, dass ein Nachweis nicht möglich war. Wäre die Kontamination tierischer Natur, könnte die Konzentration

von porzinen Adenoviren und bovinen Polyomaviren ebenfalls zu gering für einen Nachweis gewesen sein. Über die Sensitivität der hier verwendeten Methoden für diese Viren können keine genaueren Angaben gemacht werden. Bisher gibt es auch keine Untersuchungen zu deren Vorkommen in Umweltproben in Deutschland. In Spanien wurden sowohl porzine Adenoviren als auch bovine Polyomaviren in Flusswasser gefunden (Hundesda et al. 2006; Hundesa et al. 2010).

Insgesamt kann man feststellen, dass im Fall der hier untersuchten zehn Wasserversorgungen die bakteriologische Untersuchung mehr Aussagekraft bezüglich des hygienischen Zustands des Wassers hatte als die virologische Untersuchung und der Nachweis von Bakteriophagen. Trotzdem sind Fragestellungen denkbar, bei denen die etablierten Methoden sinnvoll verwendet werden könnten. Gibt es z. B. bei bakteriologisch und chemisch-physikalisch einwandfreiem Trink- oder Tränkwasser Hinweise auf wasserbürtige Infektionen, könnte eine Untersuchung auf virale Indikatoren angezeigt sein. Auch Schwächen in der Wasseraufbereitung sind prädestiniert dafür, über virale Indikatoren erkannt zu werden, da Viren widerstandsfähiger sind als Bakterien.

In der Umweltvirologie wird es nicht als sinnvoll angesehen, das an den Konsumenten abgegebene (aufbereitete) Wasser auf Viren zu untersuchen, da die Untersuchungsvolumina zu groß wären. Es sollen vielmehr Risikoanalysen und -bewertungen durchgeführt werden. Dafür werden jedoch zuverlässige Daten zur Viruskonzentration in Rohwässern und gegebenenfalls zur Aufbereitungseffizienz benötigt. Wie sich aber in vielen früheren Untersuchungen weltweit und auch in der vorliegenden Arbeit zeigte, bedeutet schon der Virusnachweis in (wenig belasteten) Rohwässern eine große Herausforderung. Es besteht noch ein großer Forschungsbedarf, besonders da es trotz jahrzehntelanger umweltvirologischer Untersuchungen bisher keine standardisierten Methoden für die Aufkonzentrierung großer Wasservolumina und für Virusnachweise gibt. Die molekularbiologischen Methoden haben zwar in den letzten zwei Jahrzehnten große Fortschritte gebracht, Standardisierungen sind trotzdem unerlässlich.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die hygienische Qualität von Trink- und Tränkwasser wird durch den Nachweis von Indikatorbakterien bestimmt. Bakteriologisch einwandfreies Wasser kann jedoch Viren enthalten und somit eine Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier darstellen, weil Viren resistenter gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmaßnahmen sind als Bakterien. Da es keine standardisierten Verfahren gibt, sollten im Rahmen dieser Arbeit Methoden zum Nachweis von viralen Indikatoren in Trink- und Tränkwasser etabliert und ihre Praxistauglichkeit überprüft werden.

Aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit und weiten Verbreitung wurden als Indikatoren für menschliche und tierische virale Belastungen humane und porcine Adenoviren sowie bovine Polyomaviren ausgewählt. Die etablierte Methode sollte auch für Inflenzaviren als empfindlichere Viren geeignet sein. Da im Trink- und Tränkwasser geringe Konzentrationen an Viren zu erwarten waren, mussten die Proben zunächst aufkonzentriert werden. Hauptsächlich wurde ein Adsorptions-/Elutionsverfahren mit Glaswolle als Filtrationsmaterial angewandt. Die Konzentrate wurden in der Regel nur molekularbiologisch untersucht. Die Methoden konnten für alle ausgewählten Viren erfolgreich etabliert werden. In zahlreichen Versuchsansätzen wurden Stufen des Aufkonzentrierungsprozesses verändert und solche identifiziert, die für die größten Virusverluste verantwortlich waren. Die Ergebnisse wiesen hierbei eine hohe Schwankungsbreite auf. Dies lässt sich mit der Komplexität des Verfahrens und den geringen Viruskonzentrationen in großen Wasservolumina begründen. Die Wiederfindungsraten in zehn Litern betragen im Mittel ca. 3 bzw. 6 % für humane Adenoviren und Inflenzaviren. Die ermittelten Raten lagen etwas höher als die Werte einer aktuellen Studie.

In 39 Proben von zehn bayerischen Wasserversorgungen wurden keine Viren detektiert, obwohl eine Mehrzahl der Proben bakteriologisch und chemisch-physikalisch nicht einwandfrei war. Es wurden zwar mehrere Hundert Liter Wasser filtriert, trotzdem war die Konzentration an Viren für einen Nachweis zu gering.

Die entwickelten Methoden können zum Nachweis vieler verschiedener Viren verwendet werden und sind sehr sensitiv. Da sie aber recht aufwändig sind, eignen sie sich nicht für Routineuntersuchungen. Für spezielle Fragestellungen, z. B. zur Ursachenforschung bei Ausbruchsgeschehen, können sie jedoch sinnvoll angewandt werden.

VII. SUMMARY

Development of methods for the detection of viral indicators in human and animal drinking water

The hygienic quality of human and animal drinking water is assessed by detecting indicator bacteria. Viruses are more resistant against environmental stress and disinfection procedures. Therefore water free of indicator bacteria may contain viruses and constitute a health risk for humans and animals. As standardised procedures are not yet available the aim of this work was to establish reliable detection methods for viral indicators. Moreover their applicability in the field was to be tested.

Due to their resistance and widespread occurrence human and porcine adenoviruses as well as bovine polyomaviruses were chosen as indicators for human and animal viral contamination. The method to be established should also be capable of detecting influenza viruses as examples for more sensitive viruses. As only small levels of viral contamination are to be expected in human and animal drinking water the samples had to be concentrated first. Essentially an adsorption/elution technique with glasswool filters was applied. The concentrates were generally analysed by molecular means only. The methods were successfully established for all chosen viruses. In numerous experiments several single steps of the concentration process were varied. Furthermore the sites of major virus losses were to be localised. The respective results showed a wide range of fluctuation. This may be due to the complexity of the method and to low virus concentrations being present in large water volumes. Average recovery rates of 3 and 6% for human adenoviruses and influenza viruses were obtained, respectively. The rates were somewhat higher as compared to a current study where a similar method was used.

In 39 samples of ten Bavarian water supplies viruses could not be detected although a majority of these samples was bacteriologically and physico-chemically not acceptable. Even though several hundreds of litres of water were filtered the virus concentrations were nonetheless too low to be revealed.

With the very sensitive methods developed here many different viruses can be detected. As they are quite laborious they are not suitable for routine investigations, though. However, special questions like identifying the source of outbreaks make them reasonable to be applied.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M (1999). A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol* 65(2): 444-449.

Abu Al-Soud W, Radström P (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 38(12): 4463-4470.

Adah MI, Jaji Z, Agwazim BF, el-Yuguda AD, Mani AU (2002). Detection of human rotavirus in faeces from diarrhoeic calves in north-east Nigeria. *Trop Anim Health Prod* 34(1): 1-6.

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R (2006). Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol* 40(23): 7416-7422.

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R (2009a). Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods* 158(1-2): 104-109.

Albinana-Gimenez N, Miagostovich MP, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R (2009b). Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res* 43(7): 2011-2019.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B (2007). Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81(8): 4130-4136.

Allard A, Albinsson B, Wadell G (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 39(2): 498-505.

- Alpers K, Stark K, Hellenbrand W, Ammon A (2004). Zoonotische Infektionen beim Menschen. Bundesgesundhbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 47(7): 622-632.
- Antonis AF, Brusckke CJ, Rueda P, Maranga L, Casal JI, Vela C, Hilgers LA, Belt PB, Weerdmeester K, Carrondo MJ, Langeveld JP (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. Vaccine 24(26): 5481-5490.
- Aslanzadeh J (2004). Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. Ann Clin Lab Sci 34(4):389-396.
- Bannik C, Engelmann B, Fendler R, Frauenstein J, Ginzky H, Hornemann C, Ilvonen O, Kirschbaum B, Penn-Bressel G, Rechenberg J, Richter S, Roy L, Wolter R. (2008). Grundwasser in Deutschland. 10.08.2010, <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3642.pdf>.
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2010). Trinkwasserherkunft. 10.08.2010, <http://www.lfu.bayern.de/wasser/fachinformationen/trinkwasserherkunft/index.htm>.
- Bendig J, Earl P (2005). The Lim Benyesh-Melnick antiserum pools for serotyping human enterovirus cell culture isolates - still useful, but may fail to identify current strains of echovirus 18. J Virol Methods 127(1): 96-99.
- Blackmer F, Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL (2000). Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. Appl Environ Microbiol 66(5): 2267-2268.
- Bloch AB, Stramer SL, Smith JD, Margolis HS, Fields HA, McKinley TW, Gerba CP, Maynard JE, Sikes RK (1990). Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. Am J Public Health 80(4): 428-430.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. Appl Environ Microbiol 66(1): 238-245.

- Bofill-Mas S, Girones R (2001). Excretion and transmission of JCV in human populations. *J Neurovirol* 7(4): 345-349.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7894-7896.
- Böhm R (2000). Mikrobielle Kontaminanten in Trink- und Tränkwasser *Dtsch Tierärztl Wschr* 107(8): 305-310.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3): 495-503.
- Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA (2003). Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1172-1180.
- Borchardt MA, Haas NL, Hunt RJ (2004). Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Appl Environ Microbiol* 70(10): 5937-5946.
- Bosch A (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol* 1(3): 191-196.
- Botzenhart, K (2007). Viren im Trinkwasser. *Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 50: 296-301.
- Botzenhart K, Feuerpfeil I (2008). Bewertung. In: *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Feuerpfeil I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 325-358.
- Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2001). Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001) vom 21. Mai 2001. *BGBI I* 24: 959-980.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2007). Orientierungsrahmen zur futtermittelrechtlichen Beurteilung der hygienischen Qualität von Tränkwasser. 10.08.2010, http://www.bmelv.de/cIn_154/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Futtermittel/Orientierungsrahmen-Traenkewasser.html.

Büttner M (2007). Allgemeine Virologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Rolle M und Mayr A. Enke Verlag, Stuttgart: 136-343.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, Lopez-Pila JM, Girones R (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods* 153(2): 79-83.

Carducci A, Casini B, Bani A, Rovini E, Verani M, Mazzoni F, Giuntini A (2003). Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. *Water Sci Technol* 47(3): 261-266.

Carter MJ (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* 98(6): 1354-1380.

Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 66(6): 2520-2525.

Codex Alimentarius Commission (2004). Code of practice on good animal feeding. 10.08.2010, http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=10080.

Committee on Indicators for Waterborne Pathogens (2004). Executive Summary. In: Indicators for Waterborne Pathogens. Council NR. The National Academies Press, Washington D.C.: 1-16.

Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K, Havelaar A, Pierzo V, Boque M, Gawler A, Höller C, Lambiri M, Mirolo G, Moreno B, Niemi N, Sommer R, Valentin B, Wiedenmann A, Young V, Jofre J (2002). Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res* 36(20): 4963-4974.

Crabtree KD, Gerba CP, Rose JB, Haas CN (1997). Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Sci Technol* 35(11-12): 1-6.

Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL (2009). KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin Cancer Biol* 19(4): 270-275.

Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M (2008). Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 8(11): 698-709.

DIN (2001a). DIN EN ISO 10705-1: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Bakteriophagen - Teil 1: Zählung von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen.

DIN (2001b). DIN EN ISO 10705-2: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Bakteriophagen - Teil 2: Zählung von somatischen Coliphagen.

Divizia M, Gabrieli R, Donia D, Macaluso A, Bosch A, Guix S, Sanchez G, Villena C, Pinto RM, Palombi L, Buonomo E, Cenko F, Leno L, Bebeci D, Bino S (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci Technol* 50(1): 57-61.

Dubois E, Hennechart C, Merle G, Burger C, Hmila N, Ruelle S, Perelle S, Ferre V (2007). Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: Characterization of the method performances. *Int J Food Microbiol* 117(2): 141-149.

Dubrou S, Kopecka H, Lopez Pila JM, Marechal J, Prevot J (1991). Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in wastewater and surface water samples by gene probe assay. *Water Sci Technol* 24(2): 267-272.

EG (1998). Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 330: 32-54.

EG (2002). Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 31: 1-24.

EG (2005). Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Januar 2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 35: 1-22.

Ehlers MM, Grabow WOK, Pavlov DN (2005). Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Res* 39(11): 2253-2258.

Enriquez CE, Abbaszadegan M, Pepper IL, Richardson KJ, Gerba CP (1993). Poliovirus detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. *Water Res* 27(7): 1113-1118.

Enriquez CE, Hurst CJ, Gerba CP (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Res* 29(11): 2548-2553.

Exner M, Gornik V (2004). Durch Trinkwasser übertragene parasitäre Zoonosen. *Bundesgesundhbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 47(7): 698-704.

Feuerpfeil I (2008a). Enterokokken. In: *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Feuerpfeil I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 143-155.

Feuerpfeil I (2008b). Koloniezahl. In: *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Feuerpfeil I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 79-85.

- Fong TT, Lipp EK (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2): 357-371.
- Formiga-Cruz M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Albinana-Gimenez N, Allard A, Girones R (2005). Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J Virol Methods* 125(2): 111-118.
- Fout GS, Martinson BC, Moyer MWN, Dahling DR (2003). A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3158-3164.
- Frey HR, Haas L, Harder T, Moennig V, Müller H, Schlotfeldt H-J, Truyen U (2003). Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Schlütersche, Hannover.
- Gantzer C, Senouci S, Maul A, Levi Y, Schwartzbrod L (1997). Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J Virol Methods* 65(2): 265-271.
- Girones R, Ferrus MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Correa A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Res* 44(15): 4325-4339.
- Goyal SM, Hanssen H, Gerba CP (1980). Simple method for the concentration of influenza virus from allantoic fluid on microporous filters. *Appl Environ Microbiol* 39(3): 500-504.
- Grabow WOK (2001). Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27(2): 251-268.
- Grabow WOK, Taylor MB, de Villiers JC (2001). New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci Technol* 43(12): 1-8.

Greening GE, Hewitt J, Lewis GD (2002). Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol* 93(5): 745-750.

Gregory JB, Litaker RW, Noble RT (2006). Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 72(6): 3960-3967.

Häfliger D, Hübner P, Lüthy J (2000). Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54(1-2): 123-126.

Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Überla K, Wilhelm M (2009). Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res* 43(10): 2657-2668.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S (2005). Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2403-2411.

Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S (2010). Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res* 44(6): 1747-1752.

Havelaar AH, van Olphen M, Drost YC (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 59(9): 2956-2962.

He JW, Jiang S (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2250-2255.

Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4523-4533.

Hinton M (1993). Spoilage and pathogenic microorganisms in animal feed. *Int Biodeter Biodegr* 32 (1-3): 67-74.

Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 136(1-2): 200-209.

Hornberg A, Fernandez SR, Vogl C, Vilcek S, Matt M, Fink M, Köfer J, Schöpf K (2009). Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol* 135(3-4): 205-213.

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* 37(19): 4703-4710.

Hsu BM, Chen CH, Kung CM, Wan MT, Shen SM (2007). Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere* 66(5): 964-969.

Huang PW, Laborde D, Land VR, Matson DO, Smith AW, Jiang X (2000). Concentration and detection of caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4383-4388.

Huber S, Höller C (2007). Virusnachweis in Badegewässern (EU-Projekt "Virobathe"). Vortrag beim Kongress "Medizin und Gesellschaft", 17. - 21.09.2007, Augsburg, 10.08.2010, <http://www.egms.de/static/de/meetings/gmds2007/07gmds836.shtml>.

Huber S (2008). Bakteriophagen. In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerpfel I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 233-245.

Hughes LE, Ryan MD (2008). Enteroviruses of animals. In: *Encyclopedia of virology*. Academic Press, Oxford: 123-129.

Hummel A (2008). Clostridien. In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerpfeil I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 156-168.

Hundesda A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7886-7893.

Hundesda A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, Rosina Girones R (2009). Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods* 158(1-2): 130-135.

Hundesda A, Bofill-Mas S, Maluquer de Motes C, Rodriguez-Manzano J, Bach A, Casas M, Girones R (2010). Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods* 163(2): 385-389.

Robert Koch-Institut (2004). Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. *Epidemiologisches Bulletin* 36: 301-302.

Jiang S, Noble R, Chu W (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol* 67(1): 179-184.

Jimenez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Mansilla C, Gomez N, Cordoba L, Roblas N, Ponz F, Ley V, Saiz JC (2005). Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3536-3543.

Johne R, Wittig W, Fernandez-de-Luco D, Hofle U, Müller H (2006). Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using Multiply Primed Rolling-Circle amplification of their genomes. *J Virol* 80(7): 3523-3531.

Johnson FB, Fenn LB, Owens TJ, Faucheux LJ, Blackburn SD (2004). Attachment of bovine parvovirus to sialic acids on bovine cell membranes. *J Gen Virol* 85(8): 2199-2207.

Jothikumar N, Khanna P, Paulmurugan R, Kamatchiammal S, Padmanabhan P (1995). A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 55(3): 401-415.

Jothikumar N, Cromeans TL, Hill VR, Lu X, Sobsey MD, Erdman DD (2005). Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol* 71(6): 3131-3136.

Kamphues J, Böhm R, Flachowsky G, Lahrssen-Wiederholt M, Meyer U, Schenkel H (2007). Empfehlungen zur Beurteilung der hygienischen Qualität von Tränkwasser für Lebensmittel liefernde Tiere unter Berücksichtigung der gegebenen rechtlichen Rahmenbedingungen. *Landbauforschung Völkenrode* 57(3): 255-272.

Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, Zaidi SZ, Delwart E (2009). Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol* 90(12): 2965-2972.

Karanis P (2000). Parasitäre Zoonoseerreger im Trink- und Tränkwasser. *Dtsch Tierärztl Wschr* 107(8): 311-315.

Katzenelson E, Fattal B, Hostovesky T (1976). Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl Environ Microbiol* 32(4): 638-639.

Kay D, Fleisher JM, Salmon RL, Jones F, Wyer MD, Godfree AF, Zelenauch-Jacquot Z, Shore R (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet* 344(8927): 905-909.

Kharenko A (2006). Untersuchungen über die Bedeutung von Salmonellen bei Schweinen in der vertikalen Infektionskette bei Zukaufftieren. *Prakt Tierarzt* 87(6): 466-473.

Khuroo MS, Khuroo MS (2008). Hepatitis E virus. *Curr Opin Infect Dis* 21(5): 539-543.

Kitajima M, Matsubara K, Sour S, Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S (2009). First detection of genotype 3 hepatitis E virus RNA in river water in Cambodia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(9): 955-957.

Kreader CA (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62(3): 1102-1106.

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, von Bonsdorff CH, Jaatinen P (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 29(4): 415-418.

Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH (1999). Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 180(6): 1771-1776.

Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Appl Environ Microbiol* 74(10): 2990-2996.

Lau SKP, Woo PCY, Tse H, Fu CTY, Au W-K, Chen XC, Tsoi HW, Tsang THF, Chan JSY, Tsang DNC, Li KSM, Tse CWS, Ng TK, Tsang OTY, Zheng BJ, Tam S, Chan KH, Zhou B, Yuen KY (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J Gen Virol* 89(8): 1840-1848.

Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M (1994). Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3665-3671.

Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM (2000). Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J Appl Microbiol* 88(1): 5-21.

Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E (2002). Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 28(4): 371-409.

Lee C, Lee SH, Han E, Kim SJ (2004). Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6695-6705.

Lee HK, Jeong YS (2004). Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol* 70(6): 3632-3636.

Lee SH, Kim SJ (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 36(1): 248-256.

Lee SH, Lee C, Lee KW, Cho HB, Kim SJ (2005). The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. *J Appl Microbiol* 98(5): 1020-1029.

Lewis GD, Metcalf TG (1988). 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(8): 1983-1988.

Lewis GD (1995). F-specific bacteriophage as an indicator of human viruses in natural waters and sewage effluents in Northern New Zealand. *Water Sci Technol* 31(5-6): 231-234.

Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2000). Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microb Rev* 13(1): 67-82.

Lodder WJ, de Roda Husman AM (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 71(3): 1453-1461.

Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martin M, Girones R (2004). Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 70(3): 1448-1454.

Martin-Acebes MA, Gonzalez-Magaldi M, Vazquez-Calvo A, Armas-Portela R, Sobrino F (2009). Internalization of swine vesicular disease virus into cultured cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 83(9): 4216-4226.

Mayr A, Kaaden OR (2007). Viruskrankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Rolle M und Mayr A. Enke Verlag, Stuttgart: 136-343.

McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR, Lukasik JO (2006). Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7567-7574.

Meleg E, Banyai K, Martella V, Jiang B, Kocsis B, Kisfali P, Meleg B, Szucs G (2008). Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage. *Appl Environ Microbiol* 74(11): 3394-3399.

Mena KD, Gerba CP (2009). Waterborne adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol* 198: 133-167.

Meng XJ (2010). Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 140(3-4): 256-265.

Morris R, Waite WM (1980). Evaluation of procedures for recovery of viruses from water - I Concentration systems. *Water Res* 14(7): 791-793.

Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS (2006). Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 19(1): 63-79.

- N. N. (2005). Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts vom 1. September 2005. BGBl I 55: 2618-2669.
- Okelo PO, Joseph SW, Wagner DD, Wheaton FW, Douglass LW, Carr LE (2008). Improvements in reduction of feed contamination: an alternative monitor of bacterial killing during feed extrusion. *J Appl Poult Res* 17 (2): 219-228.
- Pallin R, Wyn-Jones AP, Place BM, Lightfoot NF (1997). The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 67(1): 57-67.
- Papageorgiou GT, Moce-Llivina L, Christodoulou CG, Lucena F, Akkelidou D, Ioannou E, Jofre J (2000). A Simple Methodological Approach for Counting and Identifying Culturable Viruses Adsorbed to Cellulose Nitrate Membrane Filters. *Appl Environ Microbiol* 66(1): 194-198.
- Paul JH, Jiang SC, Rose JB (1991). Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl Environ Microbiol* 57(8): 2197-2204.
- Payment P, Franco E (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 59(8): 2418-2424.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64(9): 3376-3382.
- Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R (2001). Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 82(12): 2955-2963.
- Pogranichniy RM, Janke BH, Gillespie TG, Yoon KJ (2003). A prolonged outbreak of poliomyelitis due to infection with a group I porcine enterovirus. *J Vet Diagn Invest* 15(2): 191-194.

- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 60(8): 2963-2970.
- Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schröter-Bobsin U, Höhne M, Röske I, Schreier E (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol* 150(5): 929-947.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S (2007a). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 41(7): 1411-1422.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S (2007b). Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Res* 41(19): 4287-98.
- Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL (1996). Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 62(4): 1424-1427.
- Rutjes SA, Italiaander R, van den Berg HHJL, Lodder WJ, de Roda Husman AM (2005). Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3734-3740.
- Rutjes SA, van den Berg HHJL, Lodder WJ, de Roda Husman AM (2006). Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Appl Environ Microbiol* 72(8): 5349-5358.
- Schijven J, Rijs GB, de Roda Husman AM (2005a). Quantitative risk assessment of FMD virus transmission via water. *Risk Anal* 25(1): 13-21.
- Schijven J, Teunis PFM, de Roda Husman AM. (2005b). Quantitative risk assessment of avian influenza virus infection via water. RIVM report, 10.08.2010, <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/703719012.pdf>.

- Schindler PRG, Metz H (1989). Keime der Flexibacter/Sporocytophaga-Gruppe und violett-pigmentierte Bakterien als Indikatoren für hygienisch bedenkliches Trinkwasser. Zbl Hyg 189: 29-36.
- Schindler P (2008). *E. coli* - coliforme Bakterien (einschließlich pathogener Varianten). In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerpfeil I und Botzenhart K. Wiley-VCH, Weinheim: 85-115.
- Schuurman R, van Steenis B, van Strien A, van der Noordaa J, Sol C (1991). Frequent detection of bovine polyomavirus in commercial batches of calf serum by using the polymerase chain reaction. J Gen Virol 72(11): 2739-2745.
- Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD (1996). Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. Appl Environ Microbiol 62(6): 2086-2094.
- Sedmak G, Bina D, MacDonald J, Couillard L (2005). Nine-Year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a wastewater treatment plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). Appl Environ Microbiol 71(2): 1042-1050.
- Shieh YC, Wong CI, Krantz JA, Hsu FC (2008). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture-RT-PCR. J Virol Methods 149(1): 184-189.
- Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C (2004). Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. Appl Environ Microbiol 70(6): 3644-3649.
- Smyth JA, Benko M, Moffett DA, Harrach B (1996). Bovine adenovirus type 10 identified in fatal cases of adenovirus-associated enteric disease in cattle by in situ hybridization. J Clin Microbiol 34(5): 1270-1274.
- Sobsey MD, Jones BL (1979). Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. Appl Environ Microbiol 37(3): 588-595.

Sobsey MD, Oglesbee SE, Wait DA (1985). Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Appl Environ Microbiol* 50(6): 1457-1463.

Soule H, Genoulaz O, Gratacap-Cavallier B, Chevallier P, Liu JX, Seigneurin JM (2000). Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Res* 34(3): 1063-1067.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue MIL, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40(9): 3256-3260.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Marin J (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol* 89(7): 1690-1698.

Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Inf Dis* 13(3): 396-403.

Szewzyk R, Lopez-Pila J, Feuerpfeil I (2006). Entfernung von Viren bei der Trinkwasseraufbereitung - Möglichkeiten einer Risikoabschätzung. *Bundesgesundhbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 49(10): 1059-1062.

Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP (2003). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 69(1): 577-582.

Tree JA, Adams MR, Lees DN (1997). Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a 'viral indicator'. *Water Sci Technol* 35(11-12): 227-232.

Umweltbundesamt (2008). Trinkwasseraufbereitung. 10.08.2010, <http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/trinkwasser/trinkwasseraufbereitung.htm>.

Unites States Environmental Protection Agency (2001a). Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge 1MDS cartridge filters and organic flocculation. USEPA Manual of Methods for Virology. 10.08.2010, <http://www.epa.gov/microbes/chapt14.pdf>.

Unites States Environmental Protection Agency (2001b). Total culturable virus quantal assay. USEPA Manual of Methods for Virology. 10.08.2010, <http://www.epa.gov/microbes/chapt15.pdf>.

van der Poel WHM, van der Heide R, Verschoor F, Gelderblom H, Vinjé J, Koopmans MPG (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in the Netherlands. *Vet Microbiol* 92(4): 297-309.

van Heerden J, Ehlers MM, Van Zyl WB, Grabow WO (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Res* 37(15): 3704-3708.

van Heerden J, Ehlers MM, Heim A, Grabow WOK (2005). Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *J Appl Microbiol* 99(2): 234-242.

Vemulapalli R, Gulani J, Santrich C (2009). A real-time TaqMan® RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples. *J Virol Methods* 162 (1-2): 231-235.

Verheyen J, Timmen-Wego M, Laudien R, Boussaad I, Sen S, Koc A, Uesbeck A, Mazou F, Pfister H (2009). Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl Environ Microbiol* 75(9): 2798-2801.

Victoria M, Guimaraes F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, Leite JP, Miagostovich M (2009). Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *J Virol Methods* 156(1-2): 73-76.

Vilagines P, Sarrette B, Husson G, Vilagines R (1993). Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Sci Technol* 27(3-4): 299-306.

Vilagines P, Sarrette B, Champsaur H, Hugues B, Dubrou S, Joret JC, Laveran H, Lesne J, Paquin JL, Delattre JM, Oger C, Alame J, Grateloup I, Perrollett H, Serceau R, Sinegre F, Vilagines R (1997a). Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking water and sea water. *Water Sci Technol* 35(11-12): 445.

Vilagines P, Suarez A, Sarrette B, Vilagines R (1997b). Optimisation of the PEG reconcentration procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. *Water Science and Technology* 35(11-12): 455-459.

Wallis C, Henderson M, Melnick JL (1972). Enterovirus concentration on cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol* 23(3): 476-480.

Walter R, Rüdiger S (1981). Ein Zweistufenverfahren zur Virusanreicherung aus Lösungen mit geringem Virustiter (z. B. Trinkwasser). *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 25(1): 71-81.

Wang J, Horner GW, O'Keefe JS (2005a). Detection and molecular characterisation of bovine polyomavirus in bovine sera in New Zealand. *New Zeal Vet J* 53(1): 26-30.

Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ (2005b). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Inf Dis* 11(12): 1874-1881.

Wang QH, Souza M, Funk JA, Zhang W, Saif LJ (2006). Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J Clin Microbiol* 44(6): 2057-2062.

Wiedenmann A, Kruger P, Dietz K, Lopez-Pila JM, Szewzyk R, Botzenhart K (2006). A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of

- Escherichia coli, intestinal enterococci, Clostridium perfringens, and somatic coliphages. *Environ Health Perspect* 114(2): 228-236.
- Wilson IG (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63(10): 3741-3751.
- Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, Scholes P, Greening GE (2007). Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 73(17): 5464-5470.
- Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, Scholes P, Savill M, Greening GE (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol* 133(1-2): 184-189.
- Wolf S, Hewitt J, Greening GE (2010). Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 76(5): 1388-1394.
- Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen KY (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med* 234(10): 1117-1127.
- Wyn-Jones AP, Pallin R, Dedoussis C, Shore J, Sellwood J (2000). The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Methods* 87(1-2): 99-107.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J (2001). Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91(6): 945-962.
- Zell R, Krumbholz A, Dauber M, Hoey E, Wutzler P (2006). Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. *J Gen Virol* 87(2): 375-385.
- Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Vlasova A, Janies D, Jones LR, Ghedin E, Saif LJ (2007). Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology* 363(1): 1-10.

Veröffentlichungen

Huber S, Höller C (2008). Aviäre Influenza und Tränkwasser. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim.

Huber S, Schalch B, Höller C (2008). Virusnachweis in Tränk- und Trinkwasser. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), 29.9. - 2.10.2008, Garmisch-Partenkirchen. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe 47, ISSN 0945-3296, 36.

IX. ANHANG

1. Material und Methoden

1.1. Aufkonzentrierung der Wasserproben

1.1.1. Geräte und Materialien

Pumpe

Schlauchpumpe Typ 620R (Watson-Marlow, Rommerskirchen)

Filtermaterialien

Glaswolle „Bourre 725 QN“ (Ouest Isol, Alizay, Frankreich)

Glaswolle, langfaserige DMCS-behandelt (Macherey-Nagel, Düren)

Glasfaserwatte silanisiert, feinstfaserig (Macherey-Nagel, Düren)

Steinwolle Isover (BayWa, Unterschleißheim)

Virosorb® 1MDS-Filterkartusche (3M, Neuss)

Kunststoffsäulen

Transparente Filtrationssäulen mit Schraubkappen und Schlaucholiven

Größe 1 (Standard-Säule): Höhe: 29,5 cm; Durchmesser: 3,2 cm

Größe 2 : Höhe: 29,5 cm; Durchmesser: 6,0 cm

Spezialanfertigungen der Firma Kunz (Owen/Teck)

1.1.2. Reinigung und Vorbereitung der Gerätschaften

1.1.2.1. Reinigung der Kunststoffsäulen, Zentrifugationsgefäße und der pH-Elektrode

Die Kunststoffsäulen und die Zentrifugationsgefäße konnten nicht autoklaviert werden. Deshalb wurden sie mit einer Desinfektionsmittel-Lösung behandelt (3 %ige Korsolex® AF-Lösung; Bode Chemie, Hamburg). Die Lösung wurde wöchentlich frisch hergestellt. Die Säulen wurden eine Stunde im Desinfektionsmittelbad belassen, anschließend mit warmem Wasser, Haushaltsspülmittel und einer Flaschenbürste gereinigt und mit entionisiertem Wasser gespült. Die Zentrifugationsgefäße wurden

über Nacht mit der Korsolex®-Lösung desinfiziert und dann in der Spülmaschine gewaschen.

Nach der Einstellung des pH-Werts im Eluat auf ca. 3,3 (s. III. 2.1.1) wurde die pH-Elektrode 30 min in einer arbeitstäglich frisch hergestellten 1 %igen Natrium-Hypochloritlösung desinfiziert und anschließend gründlich mit entionisiertem Wasser abgespült. Da die Desinfektion nach jeder Probe erforderlich war, wurden zwei Elektroden verwendet, damit eine immer einsatzfähig war. Nach der Desinfektion wurden die Elektroden neu geeicht.

1.1.2.2. Vorbereitung der Kunststoffsäulen für die Konzentrierung

Für die Befüllung der Säulen Größe 1 wurden 10 bzw. 15 g Glaswolle, für die Säulen der Größe 2 40 bzw. 50 g abgewogen. Um zu vermeiden, dass Fasern der Glaswolle eingeatmet wurden, erfolgte die Einwaage in einem Unterdruckabzug für Wiegearbeiten von Pulvern (Unterdruckabzug 870 P; Cruma, El Prat de Llobregat, Spanien) in der Nährbodenküche des LGL.

Die Glaswolle wurde in der Säule, an die die untere Kappe schon angeschraubt war, mit Hilfe einer Metallstange zusammengepresst (Größe 1, 10 g Glaswolle: auf eine Höhe von 6 bis 8 cm; Größe 1, 15 g Glaswolle: auf eine Höhe von 8 bis 10 cm; Größe 2, 40 g Glaswolle: auf eine Höhe von 8 bis 10 cm; Größe 2, 50 g Glaswolle: auf eine Höhe von 10 bis 12 cm). Die Säule wurde an einem Laborstativ befestigt und die Glaswolle gewaschen. Dazu wurden zuerst 50 ml 1 N Salzsäure, dann 50 ml Leitungswasser sowie 50 ml 1 N Natronlauge und zuletzt mindestens 1 l Leitungswasser zugegeben. Der pH-Wert des Filtrats musste danach im neutralen Bereich liegen.

1.1.3. Pufferlösungen

Die Lösungen wurden nach der Herstellung 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank.

1.1.3.1. Phosphatpuffer

PBS-Puffer

Zwei Stück Gibco® PBS-Tabletten (Invitrogen, Karlsruhe) wurden in 1000 ml Wasser aufgelöst. Die Pufferlösung enthielt laut Herstellerangaben 0,14 M NaCl, 0,01 M PO₄-Puffer und 0,003 M KCl.

1.1.3.2. Elutionspuffer

3 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer

30,0 g Fleischextrakt
3,75 g Glycin
1000 ml destilliertes Wasser

0,5 %iger Fleischextrakt-Glycin-Puffer

5,0 g Fleischextrakt
3,75 g Glycin
1000 ml destilliertes Wasser

Magermilch-Glycin-Puffer

1,0 g Magermilchpulver
3,75 g Glycin
1000 ml destilliertes Wasser

Fleischextrakt bzw. Magermilch und Glycin wurden jeweils in Wasser gelöst und die pH-Werte mit 1 N Natronlauge auf $9,5 \pm 0,1$ eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurde bei jeder Charge überprüft, ob es bei einem pH-Wert über 3,0 zu einer Protein-Fällung kam. Dazu wurden 10 ml Puffer in ein steriles Plastikröhrchen pipettiert und 0,1 N Salzsäure wurde zugegeben, bis der pH-Wert bei ca. 3,5 lag. Dann erfolgte die weitere Zugabe von 0,1 N Salzsäure nur noch tropfenweise. Der pH-Wert, bei dem sich eine deutliche Flockenbildung zeigte, wurde dokumentiert. Die jeweilige Charge wurde nur verwendet, wenn die Flockenbildung bei einem pH-Wert über 3,0 auftrat.

1.2. Nukleinsäureextraktion

NucleoSpin® RNA Virus F Kit (Macherey-Nagel, Düren)

Zu 1 ml Probenkonzentrat wurden 4 ml Puffer RAV1, der Carrier-RNA enthielt, und bei einigen Proben zusätzlich 133 µl Proteinase K-Lösung gegeben. Die Lösung wurde zunächst mit der Pipette gemischt und anschließend 15 s gevortext. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 70 °C wurden 4 ml Ethanol (96-100 Vol.-%) zupipettiert. Die Mischung wurde 15 s gevortext, die Säule damit beladen und bei 3.000 x g 5 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das 50 ml-Zentrifugationsröhrchen, in dem das Filtrat aufgefangen wurde, durch ein neues ersetzt. Danach folgten drei Waschschrirte mit den Puffern RAW (5 ml) und RAV3 (8 ml und 2 ml). Zentrifugiert wurde jeweils bei 3.000 x g für 3, 3 und 10 min. Nach jedem Waschschrirte wurde ein neues Zentrifugationsröhrchen verwendet. Um letzte Spuren von Ethanol zu entfernen, wurde schließlich ein weiteres Mal in einem neuen Röhrchen 10 min zentrifugiert. Vor der Elution wurde ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß am unteren Ende der Säule befestigt und beide in einem Zentrifugationsröhrchen platziert. Dann wurden 50 µl auf 70 °C vorgewärmtes RNase-freies Wasser auf die Säulenoberfläche pipettiert, bei Raumtemperatur 2 min inkubiert und 3 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Elutionsschrirte wurde mit weiteren 50 µl Wasser wiederholt, so dass man insgesamt 100 µl Nukleinsäureextrakt erhielt, die bei -80 °C gelagert wurden.

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

140 µl Probe (Virussuspension, Zellkulturüberstand etc.) und 560 µl Puffer AVL (mit Carrier RNA) wurden mit Hilfe des Vortexers 15 s pulsierend gemischt und anschließend bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Zur Entfernung von Tropfen auf der Innenseite des Deckels wurden die Reaktionsgefäße für ca. 10 s zentrifugiert. Nach Zugabe von 560 µl Ethanol (96-100 Vol.-%) wurde erneut 15 s pulsierend gevortext und ca. 10 s zentrifugiert. Dann wurde eine Säule, die sich in einem 2 ml-Auffanggefäß befand, mit 630 µl des Gemisches beladen und 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß gesteckt, der Rest des Probengemisches zupipettiert und wieder wie oben

zentrifugiert. Dann folgten Waschschriffe, bei denen jeweils ein neues Auffanggefäß verwendet wurde. Es wurden 500 µl Puffer AW1, dann 500 µl AW2 zugegeben (Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g, dann für 3 min bei 20.000 x g). Anschließend wurde die Säule in einem neuen Gefäß für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um alle Reste von Puffer AW2 zu entfernen. Zur Elution wurden 40 µl Puffer AVE verwendet, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde dieser letzte Schritt zweimal durchgeführt. Das Endvolumen der extrahierten Nukleinsäuren betrug hier also 80 µl pro Probe. Die Extrakte wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert.

1.3. Bakteriophagen-Nachweis

Für den Bakteriophagen-Nachweis wurde eine Reihe von Nährmedien und Lösungen benötigt. Nach der Sterilisation wurden alle Medien im Kühlschrank aufbewahrt.

1.3.1. Medien für den Nachweis somatischer Coliphagen

Calciumchlorid-Lösung

14,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

100 ml destilliertes Wasser

Calciumchlorid wurde unter vorsichtigem Erhitzen in Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Hilfe eines 0,2 µm-Membranfilters sterilisiert.

Modifizierte Scholtens' Bouillon, 10fach konzentriert

100 g Pepton

30 g Hefeextrakt

120 g Fleischextrakt

30 g NaCl

50 ml Na_2CO_3 -Lösung (150 g/l)

3 ml MgCl_2 -Lösung (2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ / ml)

1000 ml destilliertes Wasser

Nach dem Lösen der Substanzen in Wasser und der Zugabe der Lösungen wurde der pH-Wert mit 1 N Natronlauge oder 1 N Salzsäure auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt. Die Bouillon wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

Modifizierter Scholtens' Agar

10 g Pepton
3 g Hefeextrakt
12 g Fleischextrakt
3 g NaCl
5 ml Na₂CO₃-Lösung (150 g/l)
0,3 ml MgCl₂-Lösung (2 g MgCl₂ · 6 H₂O/ml)
16 g Agar
1000 ml destilliertes Wasser

Wie oben beschrieben wurden die Substanzen in Wasser gelöst, der pH-Wert eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 45 bis 50 °C wurden 6 ml Calciumchlorid-Lösung zugegeben und jeweils ca. 20 ml Medium in eine Petrischale gegossen.

Modifizierter Scholtens' Weichagar

Im Unterschied zum Modifizierten Scholtens' Agar wurden hier nur 8 g Agar eingesetzt. Ansonsten waren alle Herstellungsschritte identisch. Calciumchloridlösung wurde nicht zugegeben.

Vor einem Bakteriophagen-Nachweis wurde der Weichagar aufgeschmolzen, in 2,5 ml-Portionen aufgeteilt und in einem Wasserbad bei 45 °C flüssig gehalten. Zu 2,5 ml Weichagar wurden 1 ml Wirtskultur und 1 ml Pepton-Salzlösung (1 g Pepton und 8,5 g NaCl in 1000 ml destilliertem Wasser, pH-Wert 7,2 ± 0,2) gegeben, vermischt und auf eine Modifizierte Scholtens' Agarplatte aufgebracht.

1.3.2. Medien für den Nachweis F-spezifischer RNA-BakteriophagenCalcium-Glucose-Lösung:

3 g CaCl₂ · 2 H₂O
10 g Glucose, wasserfrei
100 ml destilliertes Wasser

Die Substanzen wurden unter vorsichtigem Erhitzen gelöst, die Sterilisation erfolgte mit einem 0,2 µl-Membranfilter.

Trypton-Hefeextrakt-Bouillon, 10fach konzentriert

100 g Trypton (pankreatisch verdautes Casein)

10 g Hefeextrakt

80 g NaCl

1000 ml destilliertes Wasser

Die Substanzen wurden gelöst, der pH-Wert auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt und die Bouillon wie oben autoklaviert.

Trypton-Hefeextrakt-Glucose (TYG)-Agar:

10 g Trypton

1 g Hefeextrakt

8 g NaCl

16 g Agar

1000 ml destilliertes Wasser

Nach Lösung der Substanzen, pH-Wert-Einstellung und Autoklavieren wurden bei 45 bis 50 °C 10 ml Calcium-Glucose-Lösung zugegeben und Agarplatten wie oben hergestellt.

TYG-Weichagar:

Im Unterschied zum TYG-Agar wurden hier nur 8 g Agar eingesetzt. Ansonsten waren alle Herstellungsschritte identisch. Calcium-Glucose-Lösung wurde nicht zugegeben.

Wie beim Modifizierten Scholtens' Weichagar dargestellt, wurde auf TYG-Agarplatten eine Schicht aus Weichagar, Wirtskultur und Pepton-Salzlösung aufgebracht.

2. Ergebnisse

Tabelle 9: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen von zehn Wasserversorgungen im Detail

	colif. B.	<i>E. coli</i>	Enterok.	<i>C. p.</i>	Kol.	EHEC	Flexib.
V 1 1 W 1 F 1 S 1 H	x		x				x x x x
V 2 2 W 2 F 2 S 2 H	x x x x	x x x	x			x	x x x
V 3 3 W 3 F 3 S	x						x
V 4 4 W 4 F 4 S 4 H	x x x						x
V 5 5 W 5 F 5 S 5 H							
V 6 6 W 6 F 6 S 6 H							x x
V 7 7 W 7 F 7 S 7 H	x x						x
V 8* 8 W 8 F 8 S 8 H	x x x x	x	x x	x	x		x x x x
V 9 9 W 9 F 9 S 9 H							
V 10 10 W 10 F 10 S 10 H	x x x x		x x	x			x x x

*: Von Versorgung 8 wurden zusätzlich Proben nach Ultrafiltration entnommen. Hier werden jedoch nur die Ergebnisse des Rohwassers dargestellt. Das aufbereitete Wasser war bakteriologisch einwandfrei.

colif. B.: coliforme Bakterien

E. coli: *Escherichia coli*

Enterok.: Intestinale Enterokokken

C. p.: *Clostridium perfringens*

Kol.: Koloniezahl

EHEC: enterohämorrhagische *E. coli*

Flexib.: *Flexibacter-/ Sporocytophaga*-Gruppe

V: Versorgung

W: Winterprobe

F: Frühlingsprobe

S: Sommerprobe

H: Herbstprobe

x: Nachweis (bzw. bei Koloniezahl: Überschreitung des Grenzwerts)

Tabelle 10: Ergebnisse der chemisch-physikalischen Untersuchungen von zehn Wasserversorgungen im Detail

	pH	Lf	Oxi	NH ₄	NO ₃	NO ₂	Fär	UV	Trüb	Fe	Mn
V 1 1 W 1 F 1 S 1 H											
V 2 2 W 2 F 2 S 2 H								a			
V 3 3 W 3 F 3 S			a								
V 4 4 W 4 F 4 S 4 H			a a a a		a			a a a	a G	a a	
V 5 5 W 5 F 5 S 5 H	G G G G				a a a a						
V 6 6 W 6 F 6 S 6 H											
V 7 7 W 7 F 7 S 7 H			a		a						
V 8* 8 W 8 F 8 S 8 H			a		a a a			a	G		
V 9 9 W 9 F 9 S 9 H											
V 10 10 W 10 F 10 S 10 H									a		

*: Von Versorgung 8 wurden zusätzlich Proben nach Ultrafiltration entnommen. Hier werden jedoch nur die Ergebnisse des Rohwassers dargestellt. Das aufbereitete Wasser wies keine Auffälligkeiten auf.

pH: pH-Wert

Lf: Leitfähigkeit bei 20 °C

Oxi: Oxidierbarkeit

NH₄: Ammonium

NO₃: Nitrat

NO₂: Nitrit

Fär: Färbung bei 436 nm

UV: UV-Absorption bei 254 nm

Trüb: Trübung

Fe: Eisen, gesamt

Mn: Mangan, gesamt

V: Versorgung

W: Winterprobe

F: Frühlingsprobe

S: Sommerprobe

H: Herbstprobe

G: Grenzwert der TrinkwV 2001 nicht eingehalten

a: auffälliger Wert

DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Barbara Schalch, Frau Prof. Christiane Höller und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Andreas Stolle für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Margit Schade, Herrn Willi Kopf und vor allem Frau Dr. Hilde Lemmer vom Bayerischen Landesamt für Umwelt für ihre Unterstützung.

Außerdem danke ich Frau Bettina Fürholzner sowie Frau Gaby Hohenberger, Frau Silvia Kühnel, Frau Helga Kaiser, Frau Ingrid Müller, Frau Marijana Duilo-Bening und Herrn Niedermann aus dem mikrobiologischen und dem chemischen Wasserlabor des LGL für ihre Untersuchungen.

Auch bei Herrn Prof. Mathias Büttner und Frau Heike Lang möchte ich mich für ihre Hilfe bedanken, besonders für die Bereitstellung von Virussuspensionen.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Peter Schindler für seine Erläuterungen zu Fragen der Trinkwasser-Mikrobiologie und Herrn Dr. Werner Höbel für die Erklärungen zu den chemischen Befunden.

Ich danke auch den Wasserversorgern und den Wasserwarten für ihre Teilnahme am Untersuchungsprogramm und die Unterstützung bei den Probenahmen.

Für die finanzielle Förderung gilt mein herzlicher Dank dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit.