

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 93 (2002)

**Heft:** 2

  

**Artikel:** Empfohlenes Verfahren für den Nachweis von "Norwalk-like" Viren (NLV) und Enteroviren in Wasser

**Autor:** Beuret, Christian / Baumgartner, Andreas

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-981715>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 01.05.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Empfohlenes Verfahren für den Nachweis von «Norwalk-like» Viren (NLV) und Enteroviren in Wasser

Christian Beuret<sup>1</sup> und Andreas Baumgartner<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kantonales Laboratorium Solothurn, Solothurn

<sup>2</sup>Bundesamt für Gesundheit, Bern

Eingegangen 21. Januar 2002, angenommen 7. März 2002

## Einleitung

Im Kontext infektiöser, gastrointestinaler Erkrankungen des Menschen spielen virale Erreger eine wichtige Rolle, wobei «Norwalk-like» Viren (NLV) klinisch mit Abstand die grösste Bedeutung zukommt. Die Übertragung enteritischer Viren erfolgt hauptsächlich von Mensch zu Mensch. Infektionen sind aber auch nach dem Konsum viral kontaminierter Lebensmittel, darunter Trinkwasser, möglich. Trinkwasser verdient in hygienischer Hinsicht besondere Aufmerksamkeit, da es Krankheitserreger in kurzer Zeit weit verbreiten und dadurch unter Umständen grosse Gruppenerkrankungen auszulösen vermag. Ursache solcher Ereignisse sind durchwegs Störfälle in der Wasseraufbereitung sowie Einbrüche von Abwässern oder Oberflächenwasser. Zur Sicherstellung hygienisch einwandfreien Trinkwassers ist eine mikrobiologische Analytik für Umgebungsuntersuchungen sowie Stufen- und Endproduktkontrollen unentbehrlich. Für bakterielle Erreger stehen entsprechende Nachweismethoden schon seit Jahrzehnten zur Verfügung, nicht aber für Viren. Lange Zeit konnten die wichtigsten enteritischen Viren des Menschen lediglich mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Voraussetzung zur Anwendung dieses aufwendigen Verfahrens war überdies eine hohe Viruskonzentration im Untersuchungsgut, was für Stuhlproben gegeben ist, nicht aber für Trinkwasser. Weil die relevanten viralen Erreger zudem auch nicht in Zellkulturen vermehrt werden können, war eine Wasserviropologie unter vertretbarem experimentellem Aufwand ausgeschlossen. Fortschritte in der Molekularbiologie haben in jüngster Vergangenheit nun aber die Entwicklung von Methoden zum qualitativen Nachweis enteritischer Viren auf der Basis der «Polymerase Chain Reaction» (PCR) möglich

gemacht. Testsysteme dieser Art erlauben aber lediglich auszusagen, ob im Untersuchungsgut virale Nukleinsäure vorhanden ist oder nicht. Genaue quantitative Bestimmungen und Ermittlung der Infektiosität sind damit nicht möglich. Wegen dieser fehlenden Voraussetzungen liessen sich noch keine amtlichen Höchstwerte (Grenzwerte) für enteritische Viren in Trinkwasser festlegen. Die verfügbaren Analysetechniken können aber mit gewisser Einschränkung trotzdem für lebensmittelrechtliche Beurteilungen zugezogen werden, und zwar bei Gruppenerkrankungen, wo die Beteiligung viral kontaminierten Trinkwassers aufgrund epidemiologischer Befragungen vermutet werden muss. Lassen sich im Rahmen eines solchen Szenarios sowohl in Patientenmaterial (Stuhlproben; Vomit) als auch Trinkwasser mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung identische Viren nachweisen, so wäre eine Kausalität gegeben und eine Intervention aufgrund des allgemeinen Artikel 2 der Lebensmittelverordnung möglich. Die Verfügbarkeit von Methoden zum qualitativen Nachweis enteritischer Viren ist aber auch aus anderer Optik von Interesse. So ist es nun möglich, die Wirksamkeit gewisser Verfahren zur Elimination von Viren aus Rohwasser (Filtration; Flokkulation) genauer zu überprüfen und bei Störfällen oder im Rahmen der Qualitätssicherung Betriebshygieneuntersuchungen oder Stufenkontrollen vorzunehmen. Als bedeutend sind die neuen Techniken auch im rein wissenschaftlichen Kontext zu sehen, denn sie erlauben erstmals, die Verbreitung und die Persistenz enteritischer Viren in der Umwelt sowie Infektionsketten eingehend zu studieren. Solche Untersuchungen sind eine Grundvoraussetzung für Risikoanalysen und darauf abgestützte, gezielte Massnahmen zur Elimination oder Eingrenzung von Schwachstellen in Trinkwasserversorgungssystemen.

Mit der zunehmenden Anwendung von PCR-Techniken zum Nachweis viraler Erreger in Trinkwasser stellte sich die Vergleichbarkeit von Ergebnissen als kritischer Punkt heraus. Vergleichsuntersuchungen, vorgenommen mit standardisiertem Untersuchungsgut und verschiedenen Methoden zum Nachweis von NLV, liessen Sensitivitätsunterschiede im Bereiche von 1,5 bis 2 Zehnerpotenzen erkennen. Unterschiede dieser Grössenordnung sind bei der Untersuchung von Materialien mit hoher Viruslast, wie zum Beispiel Stuhlproben, unerheblich. Bei der Untersuchung von Trinkwasser, das, wenn kontaminiert, Viren meist nur in sehr geringer Anzahl enthält, können die beobachteten Sensitivitätsunterschiede hingegen zu kontroversen Beurteilungen führen. Im Bereiche der amtlichen Kontrollanalytik, wo der Aspekt der Rechtssicherheit beachtet werden muss, ist dies nicht zulässig. Aus diesem Grund müssen zur Überprüfung bakteriologischer Höchstwerte amtlich vorgeschriebene Nachweismethoden verwendet werden und alternative Verfahren dürfen nur dann zum Einsatz gelangen, wenn damit im Vergleich zur Referenzmethode keine abweichende Beurteilung des Untersuchungsgutes resultiert. Diese Anforderungen haben selbstverständlich auch für amtlich-virologische Untersuchungen Gültigkeit. Das Bundesamt für Gesundheit empfiehlt deshalb bei Untersuchungen von Trinkwasser auf NLV oder Enteroviren die Verwendung nachfolgen-



# Qualitativer Nachweis von «Norwalk-like» Viren (NLV) und Enteroviren in Wasserproben

Isolation; RT-PCR; Agarose-Gel-Elektrophorese

## 1 Ziel und Zweck

Das vorliegende Verfahren beschreibt den qualitativen Nachweis zweier viraler Erreger von Gastroenteritis, «Norwalk-like» Viren (NLV) und Enteroviren.

## 2 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren eignet sich für die Untersuchung von Oberflächen, Grund-, Roh-, Trink- und Mineralwasser.

## 3 Definitionen

### *«Norwalk-like» Viren*

«Norwalk-like» Viren (NLV) bilden eine Gattung der Familie Caliciviridae. Sie gehören zu den RNA-Viren, weisen einen Durchmesser von ca. 30 nm auf und gelten als weltweit häufigste Erreger von Gastroenteritis (Darmgrippe).

### *Enteroviren*

Enteroviren bilden eine Gattung der Familie Picornaviridae. Sie gehören zu den RNA-Viren, weisen einen Durchmesser von ca. 30 nm auf und können Erkrankungen wie Gastroenteritis, seltener Meningitis, Myokarditis und Poliomyelitis bewirken.

### *Reverse Transkription (RT)*

Umschreibung von RNA in DNA (copie DNA, respektive cDNA) durch reverse Transkription (RT). Dabei wird nach Anlagerung eines spezifischen Primers mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase vom 3'-Ende der RNA eine cDNA-Kette synthetisiert.

### *Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Ein enzymatisches Verfahren, welches, auf den Prozessen der natürlichen Zellteilung basierend, zur Vervielfältigung (Amplifikation) definierter DNA- oder cDNA-Fragmente dient. Falls das Zielgenom aus RNA besteht, muss dieses zuerst durch RT in cDNA umgeschrieben werden. Voraussetzung für eine PCR ist die

Kenntnis der Basenfolge am Anfang und Ende des zu amplifizierenden Genomabschnittes. An diese Bereiche werden kurze DNA-Fragmente mit komplementärer Sequenz (Primer) gebunden, welche nach Zugabe eines hitzestabilen Enzyms (Taq-Polymerase) und den benötigten Nukleotiden (DNA-Bausteine) die Verdoppelung der Zielsequenz auf einem computergesteuerten Heizblock (Thermocycler) ermöglicht. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wird die Zielsequenz zu einer elektro-phoretisch messbaren Konzentration vervielfältigt. Durch PCR vervielfältigte DNA wird als PCR-Produkt respektive Amplikon bezeichnet.

### **Agarose-Gel-Elektrophorese**

Standardverfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und ihrer Grössenbestimmung anhand einer DNA-Leiter bestehend aus Fragmenten definierten Molekulargewichtes. DNA-Fragmente (Amplikons) werden mit Ethidiumbromid gefärbt, durch anschliessende UV-Bestrahlung sichtbar gemacht (Fluoreszenz) und fotografisch dokumentiert.

## **4 Prinzip**

Virenpartikel aus Wasser werden mittels Vakuumfiltration an eine Membran adsorbiert. Anschliessend wird das virale RNA-Genom extrahiert, durch RT in DNA umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Die Amplikons werden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese detektiert. In jeder Analysereihe wird eine Positiv- und mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt

## **5 Material und Reagenzien**

### *Hinweis*

Es wird empfohlen konsequent mit den aufgeführten Materialien und Reagenzien zu arbeiten, da die vorliegende Nachweismethode unter diesen Bedingungen validiert worden ist. Bei Abweichungen sind Sensitivitätsverluste nicht ausgeschlossen.

### **5.1 Virusisolation**

Vakuumfiltration:	Filtrationsgerät mit Aufsatzdurchmesser 47 mm
Vakuumpumpe:	maximale Leistung von 20 l/min
Vorfilter:	Bor-Silikat Mikroglassfaser (MILLIPORE AP2504700)
Filter:	Zetapor-Membran (0,45 µm) (LIGACON NM047-01-045SP)
Pinzetten:	Sterile Pinzetten 125 mm (SEMADENI 1947)

### **5.2 Extraktion viraler RNA**

Extraktions-Kit:	QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN 52906)
Serumröhrchen:	Reagenzröhrchen PPN 10 ml (GREINER 7.184.261)
Lysepuffer:	AVL-Puffer 155 ml (QIAGEN 19073)

- Vakuumfiltration: – QIAvac 24 (QIAGEN 19403)  
 – VacConnectors (QIAGEN 19407)  
 – Extensiontubes (QIAGEN 19555)
- Zentrifuge: für 1,5-ml-Röhrchen ausgelegt; Leistung min. 16000 x g

### 5.3 Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Thermocycler: Gerät mit 0,2-ml-Einsätzen
- RT-PCR-Röhrchen: – 96 Well (0,2 ml) PCR-Platte  
 – Micro-Caps 0,2 ml (8er-Streifendeckel)
- RT-Kit: RT-Sensiscript (QIAGEN 205211)
- RNase-Inhibitor: RNasin 2500 U (40 U/μl) (PROMEGA N2111)  
*Stammlösung*: 10 U/μl (1:4 in H<sub>2</sub>O dest. verdünnt)
- Polymerase: Taq-DNA Polymerase (INVITROGEN 10342-020)
- D’NTPs: d’NTP’s-Set (je 100 mM) (PROMEGA U1240)
- BSA: Bovines Serumalbumin (SIGMA B8894)  
*Stammlösung*: 20 μg/ml (in H<sub>2</sub>O dest.)

### 5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

- Agarose: Zur Auftrennung von PCR-Amplikons bis zu 100 bp Länge

- TBE-Puffer: *Stammlösung (10x)*  
 – 108,0 g Tris (FLUKA 933350)  
 – 55,0 g Borsäure (FLUKA 15670)  
 – 7,4 g EDTA (FLUKA 03710)  
 In 700 ml H<sub>2</sub>O dest. lösen, auf 1000 ml ergänzen,  
 autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

*Gebrauchslösung (1x)*

- Stammlösung 1:10 in H<sub>2</sub>O dest. verdünnt

- Ladepuffer: Glycerin-Ladepuffer (100 ml)  
 – 50 ml Glycerin  
 – 49,75 ml dest. H<sub>2</sub>O  
 – 0,25 g Bromphenolblau  
 Es können auch kommerziell erhältliche Ladepuffer  
 verwendet werden.

- Ethidiumbromid: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O dest.

- DNA-Leiter: DNA-100bp-Marker (CATALYS G2101)

- Transilluminator UV-Quelle von geeigneter Wellenlänge

- Kamera Digitales System oder Polaroid

### 5.5 Oligonukleotide (Primer) für RT und PCR

Mit den untenstehend aufgeführten Primern können die zur Zeit epidemiologisch dominanten Stämme von NLV und Enteroviren abgedeckt werden. Besonders NLV unterliegen aber einer genetischen Variabilität. Nach möglicher Entdeckung

genetisch neuer Typen ist es angezeigt, die Primersequenzen entsprechend anzupassen.

Primer	Region	Sequenz 5'-3'	Polarität	Lokalisation*
<b>A. NLV Genogruppe-spezifisch Primer (NLV gg II) (1)</b>				
SRII-2	RNA pol	TWC TCY TTY TAT GGT GAT GAT GA	Sense	4844-4866
SRII-3		TTW CCA AAC CAA CCW GCT G	Antisense	5046-5028
<b>B. NLV Generische Primer (2)</b>				
Mon 431	RNA pol	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	Sense	5093-5112
Mon 432	RNA pol	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	Sense	5093-5112
Mon 433	RNA pol	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	Antisense	5285-5305
Mon 434	RNA pol	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	Antisense	5285-5305
<b>C. Enterovirus (1)</b>				
EV05	5' UTR	CAC GGA CAC CCA AAG TAG T	Antisense	563-547
EV06		CAA GCA CTT CTG TTT CCC	Sense	164-184

\* Lokalisationen beziehen sich auf: *Norwalk virus* (M87661)/*Poliovirus* type Sabine 3 (X00596)

Degenerierte Basen sind: W=A/T, Y=C/T, K=G/T, R=A/G, S=(C/G), I=Inosine

Empfohlen wird die Verwendung kommerziell erhältlicher Primer, welche entweder in lyophilisierter Form oder in Lösung (gebrauchsfertige Aliquots) angeboten werden. Lyophilisierte Primer werden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt (Stammlösung). Für eine optimale Auflösung wird 5 min bei 65°C erwärmt, kurz gevortext und 3 min bei 65°C nachgewärmt. Gelöste Primer können bei 4°C (maximal 3 Monate) und bei -20°C (mehrere Jahre) aufbewahrt werden. Für den Gebrauch wird die Stammlösung 1:10 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnt, aliquotiert (200 µl) und bei -20°C tiefgefroren. Aufgetaute Aliquots sind bei 4°C aufzubewahren (maximal 3 Monate) und sollten nicht wieder tiefgefroren werden.

## 6 Kontrollen

### 6.1 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle besteht aus 1000 ml H<sub>2</sub>O dest. und besetzt die letzte Position einer Analysereihe von bis zu acht Proben. Bei einer höheren Probenzahl kann zu Beginn der Analysereihe und nach jeweils fünf Proben je eine Negativkontrolle eingesetzt werden. Mit mehr als einer Negativkontrolle erhöht sich die Wahrscheinlichkeit allfällige Kreuzkontaminationen zu erfassen.

### 6.2 Positivkontrolle

Die zweitletzte Stelle einer Analysereihe wird durch die Positivkontrolle besetzt.

Positive Kontrollproben sollten in Kühleinrichtungen aufbewahrt werden, die verschieden von den bei der Virusisolation und RNA-Extraktion verwendeten sind.

### 6.2.1 Norwalk-like Viren (NLV)

Als Ausgangsmaterial für Positivkontrollen wären Vakzinen ideal. Leider stehen solche aber nicht zur Verfügung, da NLV *in vitro* (Zellkultur) nicht vermehrt werden können. Als Positivkontrollen müssen deshalb Stuhlproben benutzt werden, welche unter Einsatz beider Primersysteme und Sequenzierung eindeutig als NLV-positiv identifiziert wurden. Von der positiven Stuhlprobe muss diejenige Verdünnungsstufe ermittelt werden, wo mit 10 µl Untersuchungsvolumen in der PCR gerade noch ein Signal erreicht wird. Von der Virensuspension der entsprechenden Verdünnungsstufe (Stammsuspension) werden Aliquots von je 200 µl hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Eine Stammsuspension sollte nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut und nicht länger als vier Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. NLV erfahren auch in stark verdünnten Stuhlproben bei 4°C einen langsamen Abbau.

#### *Gebrauchssuspension*

10 µl der Stammsuspension werden in 100 ml H<sub>2</sub>O dest. verdünnt.

### 6.2.2 Enteroviren

Als Positivkontrolle werden 10 µl einer 10<sup>-6</sup> verdünnten Polio-Impflösung (Poloral Berna 0,5 ml/Ds: BERNA BIOTECH LTD: Kat. No. 2360) in 100 ml dest. H<sub>2</sub>O verwendet.

Da aus einem DNA-Fragment bei 40 PCR-Zyklen bis zu 10<sup>12</sup> Kopien entstehen, kann eine unsorgfältige Arbeitsweise zu Umgebungskontaminationen führen. Dieses Risiko kann durch räumliche Trennung weitgehend beherrscht werden. Empfohlen werden fünf getrennte Arbeitsplätze, an welchen folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden: 1: Virusisolation; 2: RNA-Extraktion; 3: Mastermix-Herstellung; 4: RT, PCR und 5: Agarose-Gel-Elektrophorese sowie Gel-Dokumentation.

Schritte 1 und 2, Schritt 3 sowie Schritte 4 und 5 müssen in getrennten Räumen abgewickelt werden.

## 7 Vorgehen

### *Hinweis*

Alle Gebrauchsgegenstände und Lösungen, welche mit Proben oder Reagenzien in Kontakt kommen, müssen vorgängig sterilisiert werden. Um vorzeitige Enzymreaktionen in der RT und der PCR einzuschränken, sind die Mastermix-Lösungen bei 2-4°C und erst kurz vor Gebrauch zu pipettieren. Bei tieferen Temperaturen können PCR-Reagentien einfrieren und beschädigt werden. Da Handschuhpuder zur Hemmung der RT-PCR führen kann, sind puderfreie Fabrikate zu gebrauchen.

## 7.1 Virenisolation und RNA-Extraktion

### Vorbereitungen

Vor Beginn der Vakuumfiltration ist für jede Probe (und Kontrolle) ein Serumröhrchen mit 3 ml AVL-Puffer bereitzustellen. Abweichend zum Protokoll des QIAamp viral RNA mini kits wird im AVL-Puffer nur  $\frac{1}{5}$  der vorgegebenen Carrier-RNA Konzentration in AVL-Puffer eingesetzt.

Vakuumfiltrationsstation (QIAvac 24) bereit stellen und «VacConnectors», Filtrationssäulen (QIAamp viral RNA mini kit) und Extensiontubes zusammenfügen.

### Vorgehen

Wasserprobe (mindestens 1 Liter) durch Zetapor-Membranfilter der Porengrösse 0,45  $\mu\text{m}$  filtrieren. Bei trüben Wasserproben wird ein Vorfilter verwendet und mit einer sterilen Pinzette auf die Zetapor-Membran gedrückt, so dass keine Partikel zwischen die Filterschichten gelangen. Nach Durchfluss der Probe wird die Zetapor-Membran mittels steriler Pinzette vorsichtig gefaltet, in das Serumröhrchen transferiert und ganz in den AVL-Puffer eingetaucht. 60 s vortexen, 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen, 3ml Ethanol p.a. dazugeben und weitere 15 s mittels Vortex mischen. AVL-Puffer/Ethanol-Gemisch in drei Portionen à ca. 2 ml vakuumfiltrieren. Extensiontubes entfernen und hintereinander je 750  $\mu\text{l}$  AW1- und AW2-Puffer dazugeben (Gemäss QIAamp viral RNA mini kit-Protokoll). Filtrationssäule in Connectortubes geben und 60 s bei maximaler Drehzahl (16000–20000 x g) zentrifugieren.

Filtrationssäule in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführen und 60  $\mu\text{l}$  AVE-Puffer dazu pipettieren. 60 s bei Raumtemperatur stehen lassen und 60 s bei 6000 x g zentrifugieren. Zentrifugat in neues beschriftetes 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefrieren.

## 7.2 Reverse Transkription – Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR)

### Hinweis

Bei der Analyse klinischen Materials (Stuhlproben), wo sehr hohe Viruskonzentrationen vorliegen, ist keine maximale Testsensitivität nötig. In diesen Fällen können kostengünstigere Reagenzien verwendet werden. Zudem kann das beschriebene «two-step» RT-PCR (RT und PCR in getrenntem Mastermix) auf ein schnelleres «one-step» RT-PCR (RT und PCR im selben Mastermix) Verfahren reduziert werden. Alle Arbeitsschritte, welche der Herstellung der Mastermixe dienen, müssen auf Eis oder in Kühlblöcken durchgeführt werden.

### 7.2.1 Reverse Transkription (RT)

Die Zusammensetzung des Mastermix (10 µl pro Probe) wird gemäss Herstellerangaben (RT-Sensiscript) auf ein RNA-Probevolumen von 10 µl abgestimmt. Folgende Primer werden in drei Ansätzen verwendet:

#### *Norwalk-like Viren*

Genogruppe-spezifische Primer      Primer SR11-3  
 Generische Primer                      Primer Mon 431/432

#### *Enteroviren*

Enterovirus Primer                      Primer EV05

Nach sorgfältigem Mischen mittels Mikroliterpipette (vortexen beschädigt das Enzym) werden je 10 µl RT-Mastermix bei 2–4° C in 0,2 ml PCR-Röhrchen pipetiert und je 10 µl Proben-RNA dazugegeben. Die Röhrchen werden nach einem Handschuhwechsel mittels «Micro-caps» (Streifendeckel) verschlossen und sofort in den auf 37° C vorgeheizten Thermocycler übergeführt, welcher folgendem Programm folgt:

1. 37° C    60 min
2. 93° C    5 min
3. 4° C    endlos

Sobald die Schritte 1 und 2 abgeschlossen sind, werden die Röhrchen sofort für die PCR verwendet, oder aber für einen späteren Gebrauch bei –20° C tiefgefroren.

### 7.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Zusammensetzung der Mastermixe (60 µl pro 20 µl Probe) ist für die drei Primersysteme wie folgt:

<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration in 80 µl</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Wasser		Ergänzend	
Polymerasepuffer 10 x		1 x	
BSA 20 µg/ml		2 µg/ml	
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 mM	1,5 mM	3,0 mM
NTPs 4 mM		0,2 mM	
Primer 10 µM		Je 0,25 µM	
Taq Polymerase 5 U/µl		1 U/25 µl	

#### **60 µl Mastermix + 20 µl DNA pro Probe**

A. Genogruppe-spezifische NLV-Primer    SR11-2/SR11-3  
 B. Generische NLV-Primer                      Mon 431-34  
 C. Enterovirus-Primer                          EV05/EV06

Die Reagenzien müssen bei einer Temperatur von 2–4°C (Eis oder Kühlblock) und vorzugsweise unter einer PCR-Haube zusammengefügt werden. Höhere Temperaturen bewirken eine Aktivität der Taq-Polymerase, wodurch unspezifische Amplifikationen stattfinden und Primer-Dimere gebildet werden können. Die Mastermixe sollten kurz per Vortex gemischt und dann abzentrifugiert (5 s bei 1000 x g) werden. Die kühl gehaltenen Röhrchen mit cDNA aus der RT werden ebenfalls kurz abzentrifugiert, die Streifendeckel sorgfältig entfernt und verworfen. 60 µl PCR-Mastermix werden in jedes RT-Röhrchen zu den 20 µl cDNA gegeben. Für die erneute Verschlussung der Röhrchen werden nach einem Handschuhwechsel neue Streifendeckel («Micro-caps») verwendet, um Kontaminationen zu verhindern. Die nun verschlossenen «PCR-Röhrchen» werden sofort in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler gestellt, welcher folgendem Programm folgt:

<b>Thermocycler-Programmierung</b>		
«Denaturation»	95°C	180 s
<b>40 Zyklen mit:</b>		
Denaturation	95°C	40 s
Annealing	50°C	90 s
Elongation	72°C	30 s
Komplementierung	72°C	420 s
Abkühlen	4°C	endlos

Die resultierenden PCR-Amplikons können über einige Monate bei 4°C gelagert werden. Längeres Aufbewahren erfolgt bei –20°C.

### 7.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

2,7% Agarose werden in Elektrophorese Gebrauchspuffer (1x TBE) durch langsames Erhitzen (vorzugsweise im Mikrowellenherd) vollständig zur Auflösung gebracht. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen mehr vorhanden sind, da solche die Elektrophorese beeinträchtigen. Nach erfolgtem Lösen werden 10 µl Ethidumbromid-Stammlösung in die Agarose eingemischt und diese in die vorgesehene Elektrophoresewanne mit eingesetztem Rechen gegossen. Nach Abkühlen des Gels wird der Rechen entfernt und die Elektrophorese-Wanne mit 1x TBE gefüllt.

Auf einen Streifen Parafilm für jede Probe je 10 µl Ladepuffer pipettieren und mit je 10 µl Amplikons mischen. Die Probengemische werden sorgfältig in die Geltaschen pipettiert. Beidseitig der Analysereihe ist in einer Geltasche je 6 µl DNA-Leiter mit 10 µl Ladepuffer einzutragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel unter UV-Belichtung fotografisch dokumentiert und ausgewertet.

## 7.4 Auswertung und Beurteilung

Zur Auswertung wird die Grösse von aufgetrennten Amplikons mit Hilfe der DNA-Leiter bestimmt.

Die eingesetzten Primersysteme ergeben Amplikons der folgenden Grössen:

- A. Genogruppe-spezifische Primer 203 bp
- B. Generische Primer 213 bp
- C. Enterovirus Primer 400 bp

Falls die Amplikongrösse der Probe mit einem der unter A, B, C aufgeführten spezifischen Werten übereinstimmt, liegt ein positiver Befund vor.

## 7.5 Bestätigung der positiven Proben durch Sequenzierung

Die PCR-Amplikons der Proben und der positiven Kontrolle sollten zur Bestätigung einer Sequenzanalyse unterzogen werden; wofür 0,005–0,02 µg/µl DNA erforderlich ist. In einer Bande mit Amplikon ist diese Menge ungefähr dann enthalten, wenn die Intensität der Fluoreszenz derjenigen einer Bande der DNA-Leiter entspricht. Zum Vergleich darf jedoch nicht die Bande von 500 bp zugezogen werden, da diese im Vergleich zu den anderen eine rund dreimal so starke Fluoreszenz aufweist. Falls die Bande einer positiven Probe eine schwächere Intensität aufweist, muss eine neue RT-PCR mit 45- bis maximal 50 statt 40 Zyklen durchgeführt werden.

## 8 Qualitätsüberwachung

Die kritischen Punkte einer RT-PCR sind die Sensitivität und die Kontaminationsrisiken. Die Sensitivität kann mittels standardisiertem Polio-Impfstoff überwacht werden. Dabei sollte eine Verdünnung von  $10^{-9}$  detektierbar sein, was einer theoretischen Menge von 0,1–1 Virusäquivalenten entspricht. Dieser Wert erklärt sich durch die Tatsache, dass sich die Mengenangabe des Polio-Impfstoffes auf infektiöse Viren bezieht, mittels PCR aber auch vorhandene, inaktive Viren erfasst werden.

Zum Ausschluss von Kontaminationen sind mindesten 10 Proben à 1000 ml sterilem H<sub>2</sub>O dest. zu untersuchen, die ausnahmslos ein negatives Resultat ergeben müssen. Diese Kontrolle und auch die Überprüfung der Sensitivität sollten im Rahmen der Routineanalytik periodisch mindestens halbjährlich durchgeführt werden.

## 9 Status

Das beschriebene Verfahren zum qualitativen Nachweis von NLV und Enteroviren in Wasser hat den Status einer wissenschaftlich publizierten Methode (3). Es wurde unter Einbringung praktischer Erfahrung teilweise modifiziert und mehreren Ringversuchen und Methodenvergleichen unterworfen.

## 10 Literatur

- 1 Gilgen, M., German, D., Lüthy, J. and Hübner, Ph.: Three step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis-A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 189–199 (1997).
- 2 Persönliche Mitteilung von S. Monroe, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA.
- 3 Beuret, C., Kohler, D. and Lüthi, T.: “Norwalk-like” virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J. Food Prot.* **63**, 1576–1582 (2000).

Korrespondenzadresse: Christian Beuret, Kantonales Laboratorium Solothurn, Werkhofstrasse 5, CH-4509 Solothurn