

Handreichung zur Probenaufbereitung und molekularbiologischen Analytik von SARS-CoV-2 Genfragmenten und Surrogatviren im Abwasser

Diese Anleitung vermittelt die Grundlagen für das Vorgehen zum quantitativen Nachweis von SARS-CoV-2 Genfragmenten und Fragmenten von Kontrollviren (Surrogatviren) mittels molekularbiologischer Nachweismethoden und beschreibt die wichtigsten Kontrollparameter, die für eine qualitätsgesicherte Analytik beachtet werden müssen.

Allgemeines

Nach einer Infektion mit dem Pandemievirus SARS-CoV-2 scheidet ein Großteil der infizierten Personen bereits vor dem Auftreten von Krankheitssymptomen das Virus und Abbauprodukte des Virus mit dem Stuhl aus. Das Monitoring von SARS-CoV-2 Viren im Abwasser ermöglicht daher einen frühen Einblick in das Infektionsgeschehen der Bevölkerungsgruppe, deren Abwässer in der beprobten Kläranlage erfasst werden. Für diese Nachweise von SARS-CoV-2 in Abwasserproben gibt es zahlreiche Protokolle, jedoch noch keine genormten Verfahren. Um zuverlässige qualitative Messdaten zu erhalten, müssen daher grundlegende Verfahrensschritte und Kontrollmaßnahmen eingehalten werden.

Der Nachweisprozess beinhaltet folgende grundlegenden Arbeitsschritte:

1. **Probenahme** (siehe Handreichung zur Probenahme)
2. **Aufkonzentrierung der Viruspartikel** aus der Abwasserprobe
3. **Extraktion der viralen Nukleinsäuren**
4. Umschreiben (**Reverse Transkription**) des viralen RNA-Genoms in cDNA für die Verwendung in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
5. **Vermehrung der viralen Gensequenzen** mit Hilfe verschiedener Methoden der PCR
6. **Analyse und Relativierung der Messergebnisse durch Normierung der Daten**

Aufkonzentrierung der Viruspartikel

Die Aufkonzentrierung von SARS-CoV-2 Viruspartikeln kann durch verschiedene Methoden erfolgen, wie z.B. Fällung der Partikel mit Polyethylenglycol (PEG), zentrifugale Ultrafiltration oder Ultrafiltration, die je nach der verwendeten Methode unterschiedliche Ausgangsvolumina erfordern und damit auch unterschiedliche Nachweisgrenzen und Effizienzen aufweisen. Wichtige Parameter für die Wahl der Aufkonzentrierungsmethode sind das Volumen, das mit der jeweiligen Methode aufkonzentriert werden kann (normalerweise 100 – 500 mL, für manche Methoden dagegen mehrere Liter), die Effizienz der Methode, die Eignung der Methode für die zu untersuchenden Viren, sowie eine praxisnahe Durchführbarkeit und Kosteneffizienz.

Im Rahmen einer Messreihe für einen Kläranlagenstandort sollten sowohl die Probennahme, die Aufkonzentrierungsmethoden und die nachfolgenden Detektionsmethoden nicht signifikant verändert werden, um die einzelnen Messwerte der Kläranlage über die Zeit vergleichen zu können (essentiell für das Abwassermonitoring von SARS-CoV-2). Um einen besseren Vergleich der Messdaten mit den Daten anderer Kläranlagen zu ermöglichen, sollte das getestete Probenvolumen und die verwendete Aufkonzentrierungsmethode mit den Messwerten angegeben werden.



Extraktion der viralen Nukleinsäuren

Nach der Aufkonzentrierung der Viruspartikel aus der Abwasserprobe muss die virale RNA in guter Qualität extrahiert werden. Die häufigsten dafür verwendeten Techniken beruhen auf der organischen Extraktion mit Phenolen, Wasser und Alkohol sowie Silika-Material und werden von vielen Firmen als Kits angeboten. Die viralen RNA-Moleküle werden dabei meistens in einem Volumen von 50 – 200 µL eluiert. Die Reinheit der RNA kann photometrisch bei Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm kontrolliert werden. Die Effizienz der RNA Extraktionsmethode kann durch das regelmäßige Mitführen von Proben mit Zugabe einer bekannten Kopienzahl gereinigter RNA eines Kontrollvirus mit RNA-Genom (z.B. RNA des Bakteriophagen MS2) überprüft werden.

Umschreiben der viralen RNA in DNA

Die enzymatische Umschreibung der viralen RNAs in komplementäre doppelsträngige DNAs (cDNA) wird als Reverse Transkription bezeichnet. Bei SARS-CoV-2 wird dieser Schritt häufig direkt mit der nachfolgenden PCR in einem „One-Step“ Verfahren gekoppelt. Dieser Vorgang ist bei Umweltproben der problematischste Schritt, da er sehr anfällig ist gegenüber inhibitorischen Stoffen, die in der Umweltprobe vorhanden waren und nicht entfernt wurden, weshalb nicht alle reversen Transkriptasen geeignet sind. In manchen Fällen kann die Verwendung einer zweistufigen RT-PCR (d.h. die Synthese der cDNA und die Quantifizierung werden in zwei einzelne Schritte aufgeteilt) dazu beitragen, Probleme aufgrund von Inhibitoren in den RNA-Extrakten zu überwinden.

Vermehrung der viralen Gensequenzen mit Hilfe verschiedener Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für den quantitativen Nachweis der Viren werden keine vollständigen Genomsequenzen benötigt, sondern nur einzelne charakteristische Genbereiche vermehrt. Die häufigsten verwendeten Methoden für die Vermehrung und Quantifizierung von Genfragmenten der SARS-CoV-2 Coronaviren sind die Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) oder die digitale PCR (dPCR). Die Vermehrung der charakteristischen Genbereiche kann durch die Verwendung von Primer/Sonden Systemen erfolgen, die auch im medizinischen Bereich für den molekularbiologischen Nachweis von SARS-CoV-2 verwendet werden. Zielbereiche dieser Tests liegen in Genabschnitten, in denen sich das SARS-CoV-2 Virus von anderen Coronaviren unterscheidet, z.B. im Bereich des Nukleokapsidgens (N1, N2, N3), der Genbereiche für das Hüllprotein E sowie der Polymeraseregion (RdRp) und der ORF-Region (ORF). Bereiche im Gen des Spike-Proteins sind dagegen weniger geeignet die gesamte SARS-CoV-2 RNA Konzentration zu messen, da diese Regionen besonders bei Virusvarianten eine hohe Zahl an Mutationen aufweisen können. Zum eindeutigen Nachweis von SARS-CoV-2 sollten mindestens zwei geeignete Genbereiche des Virus (z.B. N1 und N2, oder N2 und E, etc.) nachgewiesen werden (Nachweis von zwei sogenannten Biomarkern). Die Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren erfolgt durch den Vergleich mit einem internen spezifischen Standard, d.h. Gensequenzen des SARS-CoV-2 Virus mit bekannten Konzentrationen über einen Bereich von 4 – 6 Zehnerpotenzen, die von den jeweiligen Primer/Sonden-Systemen erkannt werden (solche Standards werden kommerziell angeboten). Es ist bekannt, dass die PCR-Effizienz zwischen verschiedenen qPCR-Läufen variieren kann. Daher ist es wichtig, die Standardkurve für jedes Zielgen in jedem qPCR-Lauf mit mindestens 4 verschiedenen Konzentrationen der internen Standards durchzuführen. Außerdem sollten für alle Proben, Positiv- und Negativkontrollen in jeder PCR-Platte in dreifacher Ausführung durchgeführt werden. Die Quantifizierung der Proben einer dPCR erfolgt durch statistische Analysen von Endpunktmessungen.



Analyse und Relativierung der Messergebnisse

Die gemessenen Konzentrationen von SARS-CoV-2 in Abwasserproben können durch spezifische Umwelteinflüsse in den Kläranlagen beeinträchtigt werden, wie z.B. Starkregeneinflüsse bei Mischwasserkanalisation, die zu signifikanten Veränderungen in den Anteilen an industriellem/gewerblichem und häuslichem Schmutzwasser führen können. Um auch in solchen Situationen valide Messergebnisse zu erhalten, sollten die SARS-CoV-2 Messergebnisse von diesen Ereignisproben durch die Berücksichtigung weiterer Faktoren (z.B. Einbeziehung von Abflussmengen und Frachten, Charakterisierung der Qualität des kommunalen Abwassers durch chemische Parameter) normiert werden. Bewährt hat sich dazu auch der Vergleich der Virenkonzentrationen mit den gemessenen Konzentrationen anderer im Abwasser enthaltenen Viren, die nachweislich aus humanen Fäkalien stammen (z.B. der Bakteriophage CrAssphage oder das Pflanzenvirus Pepper-Mild-Mottle Virus (PMMoV), die als Surrogatviren für die Normierung der SARS-CoV-2 Konzentrationen von Ereignisproben dienen können. Die Konzentrationsbestimmungen dieser Surrogatviren müssen dabei über die gleiche Methode (RT-PCR bzw. dPCR) bestimmt werden wie die RNA Konzentrationen der SARS-CoV-2 Viren. Diese verschiedenen Normierungsfaktoren werden im Rahmen der projektübergreifenden Qualitätskontrollen innerhalb des Pilotprojekts genauer untersucht und ausgewertet.

Zur Gewährleistung der Qualitätssicherung seitens des Projekts ESI-CorA wird darum gebeten, dass die beauftragten Labore das verwendete Analyseprotokoll an das Helpdesk (Kontakt s. unten) übermitteln.

Für die Übermittlung der Laborergebnisse wird nach Projektstart eine weitere Handreichung erarbeitet, die den Datentransfer im Projekt ESI-CorA genauer beschreibt.

Kontakt zum Helpdesk ESI-CorA
am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Telefon: 0721 608 23130

E-Mail: helpdesk-esicora@ptka.kit.edu

Die Handreichung wurde erstellt durch die Mitglieder des Begleitkreises von ESI-CorA:

Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Robert Koch-Institut (RKI),
Technische Universität Darmstadt (TUDa), Umweltbundesamt (UBA),
Projekte des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF):

Biomarker – www.cee.ed.tum.de/sww/forschung/mikrobielle-systeme/biomarker/

CoroMoni – <https://de.dwa.de/de/coromoni.html>

CovidReady – www.covidready.de

Sars-GenASeq – www.iwar.tu-darmstadt.de/abwasser

Der Inhalt dieser Handreichung gibt nur die Meinung der Autoren wieder. Die Europäische Kommission ist nicht verantwortlich für die Verwendung der in dieser Handreichung enthaltenen Informationen.

Stand: Februar 2023

