

Molekularbiologische Differenzierung von infektiösen enteralen humanpathogenen Viren im Wasser durch Aptasensoren

Mats Leifels, M. Sc.

Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin, Ruhr-Universität Bochum
leifels@hygiene.rub.de

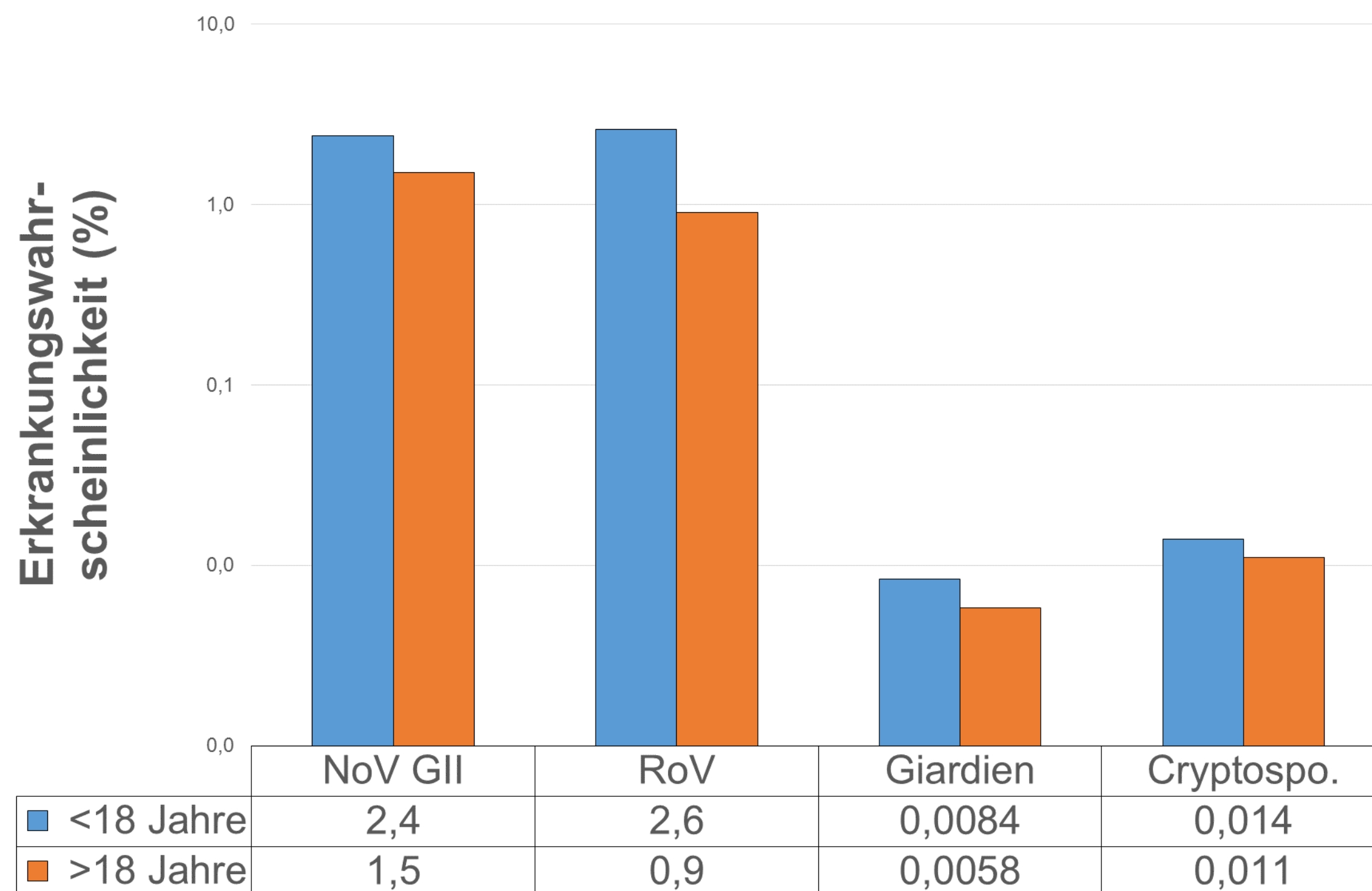


Abbildung 1: Erkrankungsrisiko für Badende in der Ruhr

Erkrankungswahrscheinlichkeiten von Personen unter und über 18 Jahren durch Pathogene für das Baden in der Ruhr. Die Daten wurden im Rahmen des Projekts „Sichere Ruhr“ des BMBF erhoben und berechnet.

Legende: NoV – Norovirus, RoV – Rotavirus, Cryptospo. – Cryptosporidien.

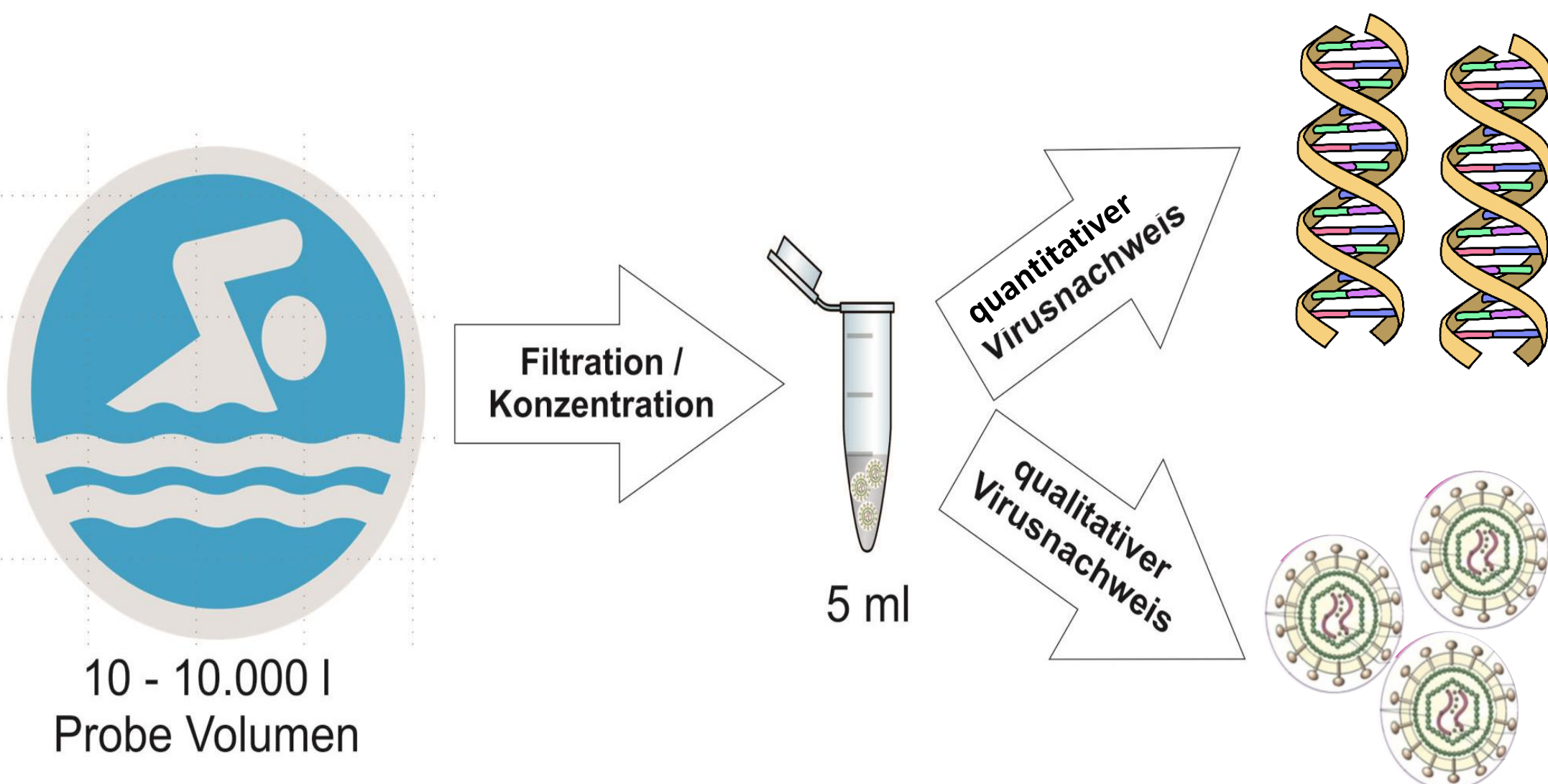


Abbildung 2: Ablauf der Aufbereitung von Umweltproben im Labor

Schematische Darstellung des Ablaufs einer Probenaufbereitung für die qualitative und quantitative Virusanalyse von Oberflächengewässern

Zielsetzung

Nordrhein-Westfalen deckt seinen Trinkwasserbedarf hauptsächlich durch die Aufbereitung von Oberflächenwasser (LANUV, 2014). Da nicht alle an den Flüssen operierende Klärwerke dazu in der Lage sind, enterale humanpathogene Viren wie Rotaviren rückstandsfrei zu entfernen, ist eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit nicht auszuschließen.

In **Abbildung 1** ist das Erkrankungsrisiko von in der Ruhr badenden Personen unter und über 18 Jahren dargestellt: Die größte Gefahr geht demnach vom humanen Rotavirus und dem Norovirus GII aus.

Die Untersuchung von Oberflächengewässern hinsichtlich ihrer viralen Last ist schwierig, da Probevolumina zwischen 10 und mehr als 10.000 Litern aufbereitet werden müssen. Erst anschließend ist die Detektion der im Gewässer enthaltenen enteralen Viren möglich. Nach Stand der Technik hat ein solcher Nachweis den Nachteil, dass die Infektiosität der zu untersuchenden Viren in den meisten Fällen nicht bestimmt werden kann (siehe **Abbildung 2**).

Im Rahmen des Fortschrittskollegs **FutureWater** soll deshalb eine innovative auf Aptameren basierende Methode entwickelt werden, um relevante Viren im Wasser nicht nur

zu quantifizieren sondern auch eine Aussage über ihre Infektiosität zu treffen.

Aptamere und Aptasensoren

Aus diesem Grund wurden von der Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin der Ruhr-Universität Bochum einige innovative Methoden zur Bestimmung der viralen Infektiosität hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit untersucht (Leifels et al., 2015).

Besonders vielversprechend scheint der Einsatz von Aptameren, kurzen – in der Regel 100 Nukleotide langen – einzelsträngigen und teilweise randomisierten DNA-Sequenzen, die durch ihren Aufbau eine hohe Affinität zu Molekülen, Proteinen oder ganzen (virealen) Zellen aufweisen (vgl. **Abbildung 3**).

Diese Sequenzen werden in hoher Konzentration in den Prozess der „Systemic Evolution of Ligands by exponential Enrichment“ (SELEX) eingebracht und diejenigen isoliert, die die höchste Affinität gegenüber dem gewünschten Ziel aufweisen. Im Anschluss an diesen Prozess werden die Aptamere mit Sonden gekoppelt und in die Durchflusszytometrie transferiert, welche die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Parameter mit hoher Sensitivität ermöglicht (vgl. **Abbildung 4**).

teilweise zufällige Nukleotide (incl. Primer ca. 100nt)



Abbildung 3: Teilweise zufällige einzelsträngige Nukleotidsequenz für den SELEX Prozess

Die eingestreuten definierten Nukleotide führen zu einer höheren Stabilität und Diversität der Aptamer Kandidaten

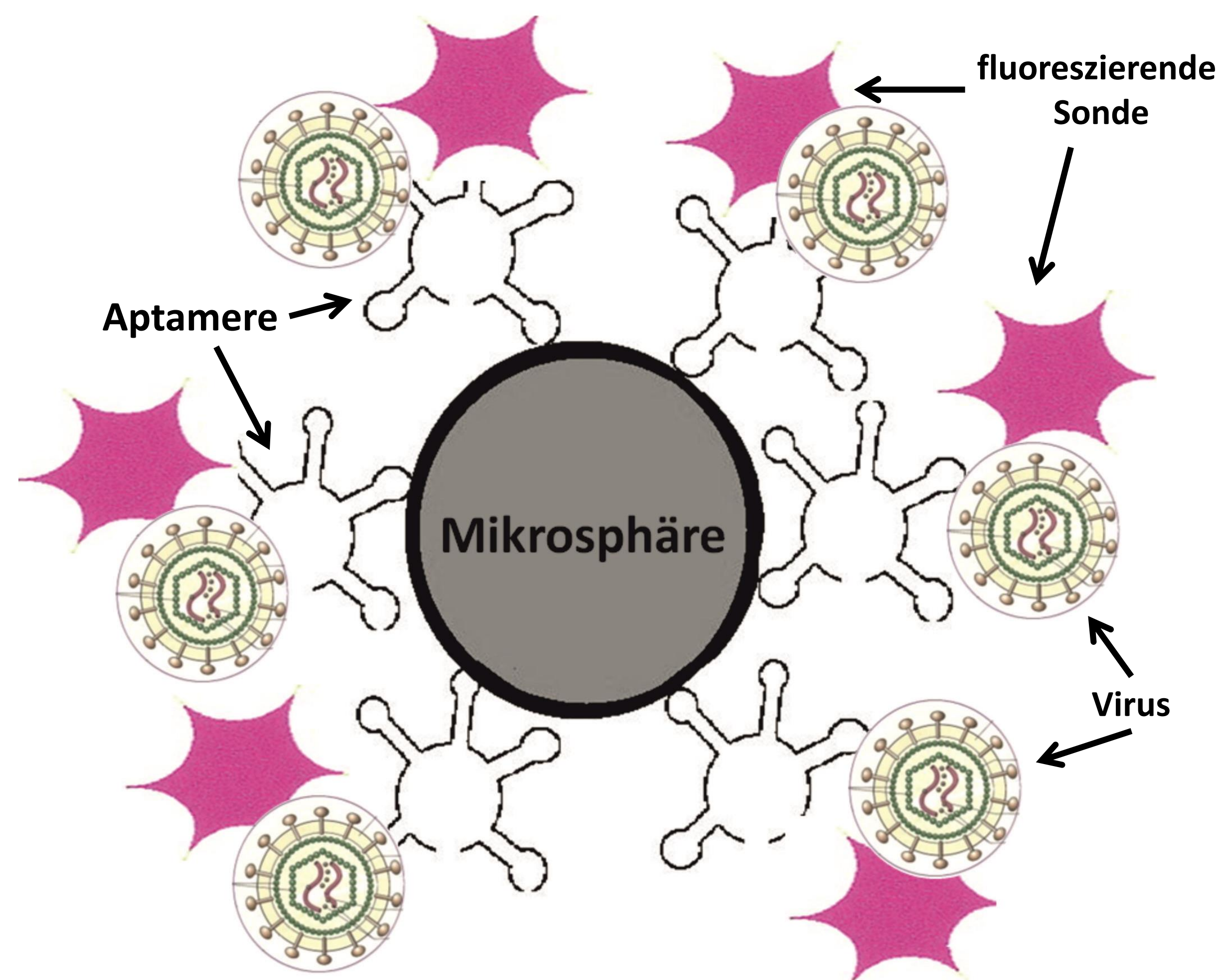


Abbildung 4: Aufbau einer auf Aptasensoren basierenden Methode zum Virusnachweis

Die Kopplung der im SELEX Prozess ermittelten Aptamere an eine fluoreszierende Sonde generiert einen Aptasensor, der in Anwesenheit der Viren zu einem messbaren Signal führt

Ausblick

Der große Vorteil der Nutzung von Aptameren zur Detektion infektiöser Viren im Wasser besteht in ihrer Fähigkeit, sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen zu treffen. Weiterhin ist es möglich, sie mit signalgebenden Verfahren zu koppeln (Feng et al., 2014).

Referenzen

- Feng, C., Dai, S., Wang, L., 2014, Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review. Biosens Bioelectron 59, 64-74.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., Wilhelm, M., 2011, Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. Water Res 45, 1358-1368.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015, Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. Int J Hyg Environ Health, 218(8), 686-693.
- Roushani, M., Shahdost-fard, F., 2015, A highly selective and sensitive cocaine aptasensor based on covalent attachment of the aptamer-functionalized AuNPs onto nanocomposite as the support platform. Anal Chim Acta 853, 214-221.



Mats Leifels, M. Sc.

RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM
Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin
Gebäude MA, Ebene 1 Nord,
Universitätsstraße 150
D-44801 Bochum
Tel: + 49 234 - 32 27168
leifels@hygiene.rub.de