



Kompletter PCR-basierter Workflow zum Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser

Einleitung

Die Analyse biologischer Parameter in Abwässern bietet ein zeit- und kosteneffizientes Instrument zur umfassenden Überwachung der öffentlichen Gesundheit und kann nützlich sein, um neue Pandemien zu antizipieren^[1]. Es ist bekannt, dass nicht-infektiöse SARS-CoV-2-Partikel mit den Fäkalien infizierter Personen ausgeschieden werden, unabhängig von deren klinischen Symptomen^[2]. Die Beprobung von Abwasser kann daher Aufschluss über die Prävalenz im Einzugsgebiet der Kläranlage geben, wobei die Extraktion und der Nachweis der viralen Partikel oder anderer Erreger und Mikroorganismen aufgrund des komplexen Probenmaterials sehr herausfordernd sind. Um diese Hürden zu überwinden, kann der folgende Arbeitsablauf ohne großen Aufwand umgesetzt werden: Damit die gesammelten Proben repräsentativ sind, wird vollautomatisch eine 24 h-Mischprobe mit der Liquistation CSF48 von Endress+Hauser generiert. Die stark verdünnten Viruspartikel innerhalb der Probenmatrix müssen vor dem Extraktionsprozess angereichert werden. Dies geschieht mittels eines elektronegativen Filters (Drittanbieter), von dem die Viren anschließend unter Verwendung von innuSPEED Lysis Tubes (Innuscreen GmbH) in der SpeedMill PLUS von Analytik Jena freigesetzt werden. Die so erzeugte partikelfreie Probe wird anschließend mit dem InnuPure C16 touch von Analytik Jena automatisch prozessiert. In Kombination mit der fein abgestimmten Extraktionschemie des innuPREP AniPath DNA/RNA Kit - IPC16 (Innuscreen GmbH) wird die effiziente Extraktion der viralen RNA (bzw. DNA) und die Entfernung von in der Probe vorhandenen inhibierenden Substanzen sichergestellt. Der Workflow wurde erfolgreich mit einer der Kläranlagen der EmscherGenossenschaft/Lippeverband umgesetzt. Die vor Ort extrahierte RNA wurde für den Nachweis viraler Zielsequenzen verwendet.

Herausforderung

Hochsensitiver Nachweis von SARS-CoV-2 in repräsentativen Abwasserproben.

Lösung

Ein einfach zu implementierender Arbeitsablauf, der mit der repräsentativen Abwasserprobenahme beginnt, sich über die effektive Anreicherung und Nukleinsäureextraktion fortsetzt und mit der Detektion mittels leistungsstarker Real-Time-PCR endet.

Die Amplifikation und Identifizierung von Zielsequenzen ist auf eine effiziente und leistungsstarke Instrumentierung in Kombination mit einem spezifischen Detektionsassay angewiesen. Hier wurde der Water SARS-CoV-2 RT-PCR Test (IDEXX Laboratories) auf dem qTOWER³ von Analytik Jena durchgeführt, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Für die Bereitstellung repräsentativer Proben sind die Autosampler von Endress+Hauser die erste Komponente in einem zuverlässigen Abwasser-Biosurveillance-Setup. Die Verwendung von Analytik Jena-Geräten für den gesamten Arbeitsablauf, der zur Detektion viraler Partikel in Abwasserproben führt, gewährleistet die optimale Kompatibilität zwischen den einzelnen Arbeitsschritten und die Generierung von zuverlässigen Ergebnissen.

Materialien und Methoden

Proben, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

- innuSPEED Lysis Tubes J (845-CS-1120100, Innuscreen GmbH)
- innuPREP AniPath DNA/RNA Kit - IPC16 (845-IPP-8016096 oder 845-PPP-8016096, Innuscreen GmbH)
- Water SARS-CoV-2 RT-PCR Test (98-0014718-00, IDEXX Laboratories)
- Elektronegative Filter, gemischte Celluloseester-Membran, hydrophil, 0,45 µm, Ø 50 mm (HAWP04700, Merck Millipore)
- 30 % HCl
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
- PCR 96-Well-Platte; weißer Kunststoff, z. B. 96 Well-PCR-Platte (0,2 ml; LP), full-skirted, weiß (844-70038-S, Analytik Jena)
- 100 ml einer 24-h-Mischabwasserprobe (Gesamtvolumen: 14,4 l); analysiert wurden Proben aus 8 verschiedenen 24-Stunden-Perioden (gekennzeichnet mit "A" bis "G")

Instrumente

- Liquistation CSF48 (71093061, Endress+Hauser)
- SpeedMill PLUS (845-00007-2, Analytik Jena)
- InnuPure C16 *touch* (845-00020-2, Analytik Jena)
- qTOWER³ (e.g. 844-00555-2 (qTOWER³ touch inkl. Farbmodul 1); 844-00521-0 (Farbmodul 2), Analytik Jena)
- Edelstahl-Druckfilterhalter (16249, Sartorius)
- Zentrifuge (für 2 ml-Röhrchen)
- Vortexmixer
- Pipetten
- Pinzetten

Methode

Mit der Liquistation CSF48 von Endress+Hauser wurden mehrere Abwasserproben jeweils über einen Zeitraum von 24 Stunden als Mischproben von 50 ml alle fünf Minuten gesammelt. Über den 24-Stunden-Zeitraum beträgt das Gesamtvolumen der Probe 14,4 l. Der pH-Wert von 100 ml dieser Probe wurde mit konzentrierter Salzsäure (HCl_{aq}) auf 3,5 - 4,0 eingestellt. Anschließend wurde die 100 ml Probe mit ca. 8 bar Druck durch einen elektronegativen Filter in einem Edelstahl-Druckfilterhalter geleitet. Die Viruspartikel haften am Filtermaterial und müssen anschließend in eine kleinvolumige Lösung überführt werden. Dazu wurde der Filter in sechs etwa gleich breite Streifen geschnitten und die Stücke in ein innuSPEED Lysis Tube J eingesetzt. Zwei der Lysis Tube Beads wurden vor dem Einsetzen des Filters auf den Boden des Gefäßes gegeben, zwei weitere Beads wurden auf die Filterstücke gelegt. Abschließend wurde 1 ml PBS in jedes Lysis Tube gegeben. Bei Verwendung der SpeedMill PLUS im kontinuierlichen Modus für zwei Minuten pelletierten die Beads in den Lysis Tubes das Filtermaterial, um Viruspartikel in die Lösung freizusetzen.

Danach wurden die Lysis Tubes zwei Minuten lang bei 10.000 U/min zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Beads und der großen Filterpartikel wurden die Tubes noch einmal mit denselben Einstellungen zentrifugiert, um einen klaren Überstand zu erzeugen. 400 µl des Überstandes wurden für die Extraktion der viralen RNA mit dem InnuPure C16 *touch* verwendet. Für die Extraktion wird der innuPREP AniPath DNA/RNA Kit - IPC16 verwendet, da dieser für die Extraktion von bakterieller und viraler DNA und RNA aus verschiedenen Ausgangsmaterialien optimiert ist. Die Anweisungen des Kits für das Protokoll 2 (Isolation from 400 µL cell-free body fluids) wurden ohne Änderungen befolgt. Dabei wurde der im Kit enthaltene Carrier Mix nicht verwendet, kann aber optional zu den Proben gegeben werden (12,5 µl / Probe). Die Nukleinsäuren wurden in 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Mit dem Water SARS-CoV-2 RT-PCR Test auf dem qTOWER³ wurden die Proben in Doppelbestimmungen auf das Vorhandensein der SARS-CoV-2 Zielsequenz analysiert. Der Nachweis der SARS-CoV-2-Targets (N1 und N2) erfolgt über eine FAM-markierte Sonde mit Farbmodul 1 im qTOWER³. Als interne Kontrolle wird das Gen für

humane RNase P mit einer HEX-markierten Sonde unter Verwendung des Farbmoduls 2 des qTOWER³ nachgewiesen. Die interne Kontrolle dient zur Validierung der Extraktion sowie der Real-Time-PCR-Reaktion. Eine Positivkontrolle (PC) und eine No-Template-Kontrolle (NTC) wurden ebenfalls in das PCR-Setup aufgenommen, um den korrekten Ablauf der Reaktion und die Abwesenheit von Kontaminationen in den Reagenzien zu bestätigen.

Lid temp. °C: 100 Preheat lid Device: qTOWER³G

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}\text{C})$	$\Delta t(\text{s})$	$\lambda(^{\circ}\text{C}/\text{s})$
1		50,0	15:00	--	---	--,-	---	8,0
2		95,0	01:00	--	---	--,-	---	8,0
3		95,0	00:15	--	---	--,-	---	8,0
4	◆	60,0	00:30	3	44	--,-	---	6,0
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Abbildung 1: Temperatur-Zeit-Protokoll des Water SARS-CoV-2 RT-PCR Tests (von IDEXX) auf dem qTOWER³ (von Analytik Jena).
Schritt 1 - reverse Transkription, Schritt 2 - initiale Denaturierung, Schritte 3 + 4 - Amplifikation (Denaturierung + Elongation), Datenerfassung erfolgt während Schritt 4.

Pos.	Channel	Dye	Gain	Measurement	Pass. Ref.
1	Blue	FAM	5	◆	
2	Green	HEX_2	5	◆	
3	Yellow	TAMRA	5		
4	Orange	ROX	5		
5	Red	Cy5	5		
6	NIR1	Cy5.5	5		

Meas. repeats: 3 Color compensation: Off

Abbildung 2: Scan-Einstellung des qTOWER³ in der qPCRsoft.

Ergebnisse und Diskussion

Sowohl die Extraktionen als auch der Real-Time-PCR-Lauf waren valide, da die Kontrollen die notwendigen Ergebnisse lieferten: Die Positivkontrolle zeigte Ergebnisse für beide Targets, SARS-CoV-2 und die interne Kontrolle. Die NTC zeigte keine Amplifikation für beide Targets. Alle Proben waren gültig, da die interne Kontrolle mit Ct-Werten unter 36 detektiert wurde (siehe Abbildung 4 und Tabelle 2), dem in der Anleitung des Detektionsassays angegebenen Grenzwert. Die Proben A und F enthielten SARS-CoV-2-RNA oberhalb der Nachweisgrenze (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1). Die Ergebnisse von Probe G sind nicht eindeutig, da eines der Duplikate einen Ct-Wert zeigt, während das andere keinen Ct-Wert aufweist. Bei allen anderen Proben zeigten beide Duplikate keine Amplifikation der SARS-CoV-2-Zielsequenz, was darauf hindeutet, dass SARS-CoV-2-RNA in diesen Proben nicht vorhanden ist oder unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

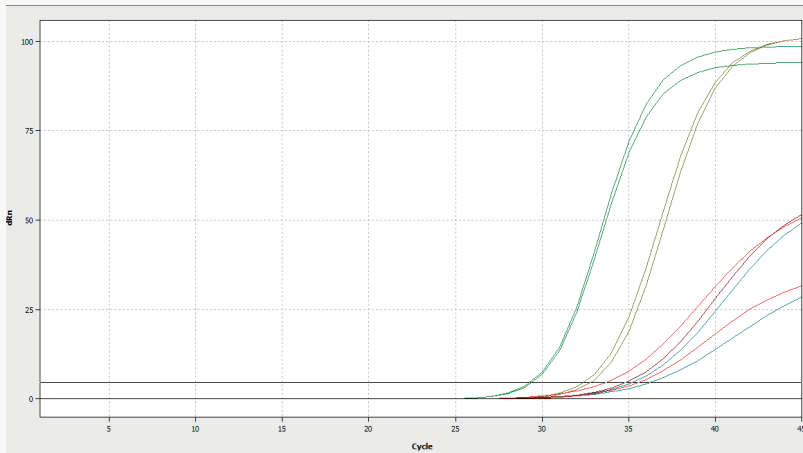


Abbildung 3: Amplifikationskurven der FAM-markierten SARS-CoV-2 Zielsequenzen (N Gen) Zwei Verdünnungen der Positivkontrolle (grün: unverdünnt; ocker: 1:10 Verdünnung) sowie verschiedene Abwasserproben wurden im Doppelansatz untersucht. Die entsprechenden Ct-Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Ct-Werte der SARS-CoV-2-Zielgen-Amplifikationskurven

Probe	Ct	
Probe A	34,89	35,78
Probe B	No Ct	No Ct
Probe C	No Ct	No Ct
Probe D	No Ct	No Ct
Probe E	No Ct	No Ct
Probe F	33,27	35,17
Probe G	34,46	No Ct
PC	29,18	29,09
PC 1:10	32,53	32,15
NTC	No Ct	No Ct

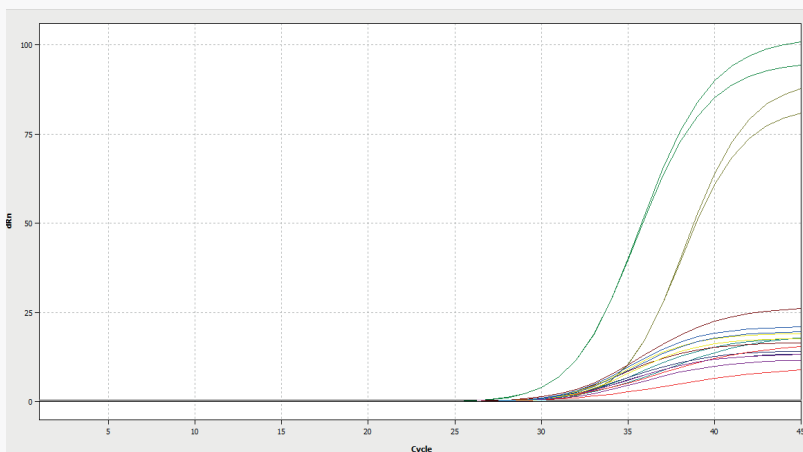


Abbildung 4: Amplifikationskurven der HEX-markierten Internal Control Sequenz Zwei Verdünnungen der Positivkontrolle (grün: unverdünnt; ocker: 1:10 Verdünnung) sowie verschiedene Abwasserproben wurden im Doppelansatz untersucht. Die entsprechenden Ct-Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Ct-Werte der Internal-Control-Amplifikationskurve

Probe	Ct	
Probe A	29,46	29,37
Probe B	29,13	29,31
Probe C	30,19	29,46
Probe D	29,73	29,42
Probe E	29,37	29,23
Probe F	29,02	30,47
Probe G	28,57	29,02
PC	27,14	27,12
PC 1:10	30,65	30,66
NTC	No Ct	No Ct

Schlussfolgerung

Diese Applikationschrift beschreibt den Arbeitsablauf der Extraktion und des Nachweises von viraler RNA aus Abwasserproben, der von der Emschergenossenschaft/Lippeverband durchgeführt wurde. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der hier beschriebene Ansatz den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA auch aus anspruchsvollen Probenmatrices sicherstellen kann. Der Nachweis im Abwasser ist repräsentativ für die Verbreitung der Infektion im Sammelgebiet der Kläranlage. Die automatisierte und standardisierte Probenentnahme gewährleistet die Vergleichbarkeit der Proben von Tag zu Tag. Die Kühlfunktion des CSF48 ermöglicht höchste Probenqualität und -integrität, was vor allem bei der Arbeit mit viralen Partikeln und RNA von besonderem Interesse ist. Außerdem ist eine Ansäuerung vor der Filtration nicht unbedingt notwendig, um gute Ergebnisse zu erzielen, wie eine aktuelle Studie^[3] zeigt. Durch den Wegfall des Ansäuerungsschritts kann die Probenvorbereitung weiter vereinfacht werden. Während die automatisierte Extraktion der RNA unter Verwendung des innuPREP AniPath DNA/RNA Kit - IPC16 mit dem InnuPure C16 *touch* zuverlässig reproduzierbare Ausbeuten liefert. Der qTOWER³ ermöglicht den schnellen und komfortablen Nachweis der Zielsequenzen innerhalb der eluierten Nukleinsäuren unter Verwendung des abwasserspezifischen SARS-CoV-2 RT-PCR Tests von IDEXX.

Des Weiteren kann der beschriebene Workflow auch für die Extraktion und den Nachweis von Nukleinsäuren - sowohl DNA als auch RNA - anderer Erreger angewendet werden. Die Kombination der zuverlässigen Probenentnahme und der vielseitigen Homogenisierungs- und Extraktionsprotokolle mit diversen Detektionsassays eröffnet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Biosurveillance. Darüber hinaus kann die automatisierte Probenentnahme mit dem tragbaren automatischen Wasserprobenehmer Liquiport CSP44 (von Endress+Hauser) in den hier vorgestellten Arbeitsablauf integriert werden, um eine flexible Beprobung einzelner Entnahmestellen sowie kurzfristige Probenahmekampagnen zu ermöglichen.

Referenzen:

- [1] Sci Total Environ. 2020 Oct 15;739:139076. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139076. Epub 2020 Apr 30
- [2] <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-IPC-WASH-2020.4>
- [3] Sci. Total Environ. 2020 Oct 15; 739:139960. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960.

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden, einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.