

Påvisning av virus i vann ved hjelp av immunomagnetisk separasjon og PCR

Av Bjørn Grinde

Bjørn Grinde er ansatt ved Seksjon for Molekylærvirologi, Avdeling for Virologi, Statens Institutt for Folkehelse

Innlegg på Fagtreff 20. november 1995

Ved Avdeling for Virologi har vi engasjert oss i flere prosjekter knyttet til miljøvirologi. Et av disse er rettet mot å utvikle molekylærbioologiske metoder for påvisning av virus i miljøet. Et utgangspunkt for dette prosjektet er utviklingen av retningslinjer/krav til viruskontroll i forbindelse med badevann (beach water) og eventuelt drikkevann innen EU. Med miljø mener vi derfor i første omgang slike prøver, men metodikken vi utvikler er også interessant for noen typer pasientprøver og for smitteoppsporing knyttet til overføring av virus via for eksempel mat eller illegal narkotika.

Hovedstrategien for påvisning går ut på å fange opp virus ved hjelp av magnetiske kuler påheftet antistoffer rettet mot overflateantigener på viruspartiklene. Disse kulene blandes med vannprøver lenge nok til at virus binder seg til antistoffene. Kuler med virus kan så fjernes fra vannet, konsentreres og vaskes ved hjelp av en magnet. Vi kaller prosessen immunomagnetisk separasjon (IMS). Kulene kan deretter inngå direkte i tester for påvisning av viralt

genom. Dette gjøres med polymerase chain reaction (PCR), eventuelt etter først å ha gjort revers transkribering (RT) for de virus som inneholder et RNA genom. Genomet som i utgangspunktet er pakket i en viruspartikkel bestående av virale proteiner, blir gjort tilgjengelig for disse reaksjonene ved å varme opp viruset så mye at det går i stykker.

Denne strategien for viruspåvisning byr på flere fordeler:

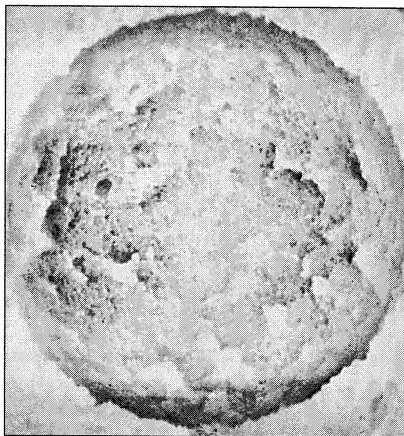
1. Den er svært sensitiv. En virusinfisert celle produserer gjerne et stort antall ikke-infeksiøse virale partikler. For hver virusenhet man fanger opp ved å dyrke prøver i cellekultur, kan det typisk være tusen enheter som kan fanges opp ved hjelp av IMS-RT-PCR. Dette gjør det mulig å analysere et mindre volum enn hva som må til i forbindelse med dyrkning. I de retningslinjer som er skrevet for analyse av badevann, inngår det for eksempel å lete etter virus i 10 l ved hjelp av dyrkning på cellekultur. Gitt at IMS-RT-PCR er 1000 ganger mer sensitive, ville 10 ml med denne metoden gi tilsvarende resultat.

2. Som alternativ til dyrkning av virus, har det vært foreslått å gjøre PCR

analyser. Det å sette opp IMS før PCR gir tre vesentlige fordeler. Det gir en effektiv metode for å anrike virus fra større volum. Man fjerner stoffer som kan hemme RT eller PCR, noe som gjør at kulene med virus kan settes opp direkte uten å først ekstrahere nukleinsy-
rer. For det tredje vil IMS-PCR forventes å korrelere bedre med infektivitet enn PCR alene ettersom man påviser virale genomer pakket inn i virale proteiner. Virale genomer sluppet løs fra ødelagte viruspartikler er ikke infeks-
øse, men vil være positive i en PCR test.

Vi har hittil utvikler IMS-RT-PCR metode for påvisning av hepatitis A virus og rotavirus. Disse virusene er valgt dels fordi de er egnet som modell-systemer, og dels fordi de på verdensbasis er viktige virus som overføres via miljøet. For to andre virusgrupper, Caliciviridae og astrovirus, har vi utviklet RT-PCR metoder, men mangler gode antistoffer for utvikling av IMS.

I steden for IMS er det mulig å bruke de magnetiske kulene til å fiske ut virale genomer i steden for hele viruspartikler. Dette kan man gjøre ved å hekte på kulene DNA-fragmenter som er komplementære til sekvenser i virusgenomet. Vi vurderer å prøve ut denne strategien.



På sikt håper vi at de metodene vi utvikler kan vinne aksept i EU som hensiktsmessige strategier for kontroll av virus i vannprøver. Vi er med i en EU-gruppe som vurderer bruk av PCR som alternativ til dyrkning i forbindelse med kontroll av virus i blodprodukter. Hvis PCR blir akseptert i en slik sammenheng, burde det åpne for bruk av PCR også i forbindelse med vannprøver.

For å teste ut metodene våre på vannprøver fra land med større miljøvirologiske problemer enn i Norge, har vi innledet et internasjonalt samarbeid for bruk av IMS-RT-PCR i viruspåvisning. Det er søkt EU midler for å koordinere dette arbeidet.