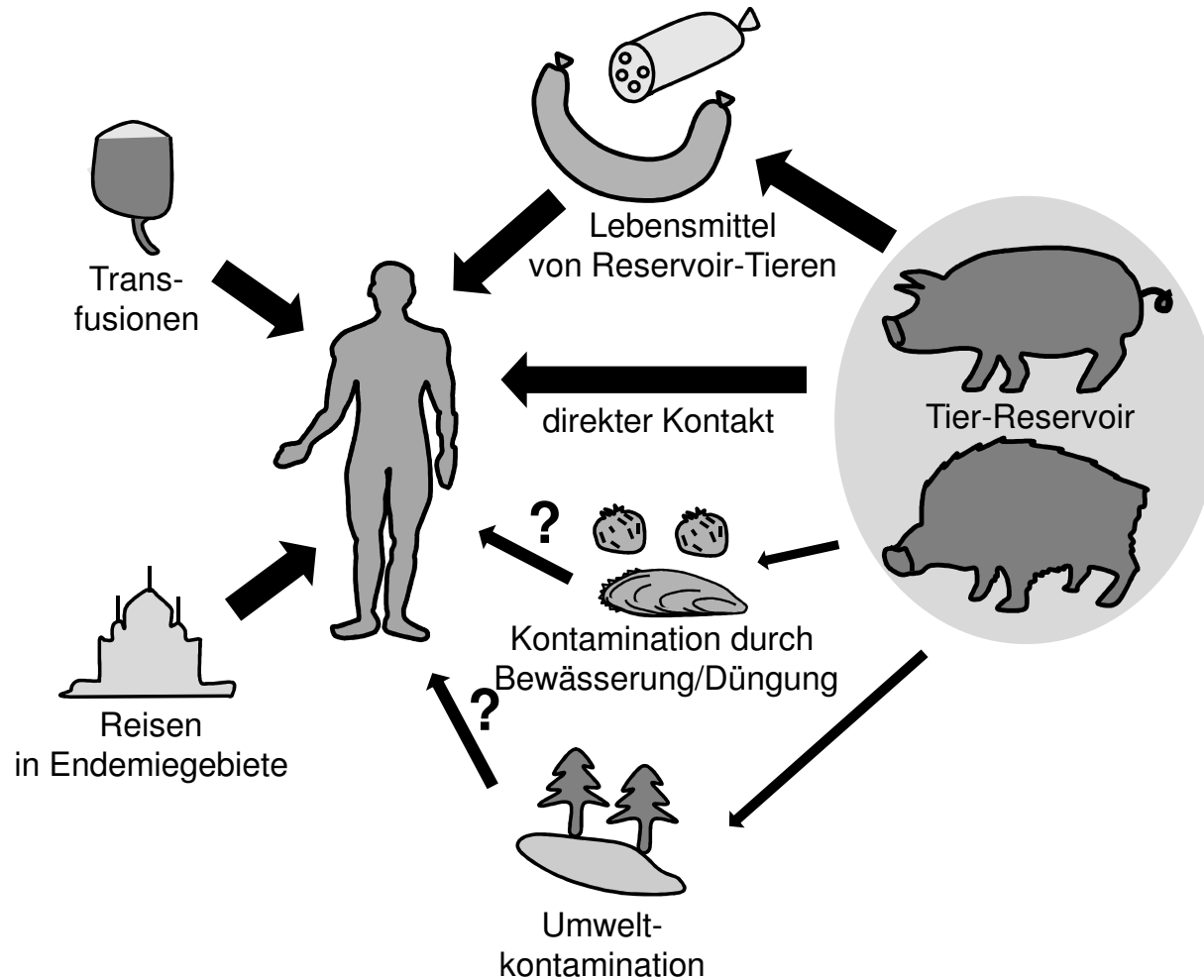


Optimierung eines Zellkultursystems für die Stabilitätstestung des Hepatitis E-Virus

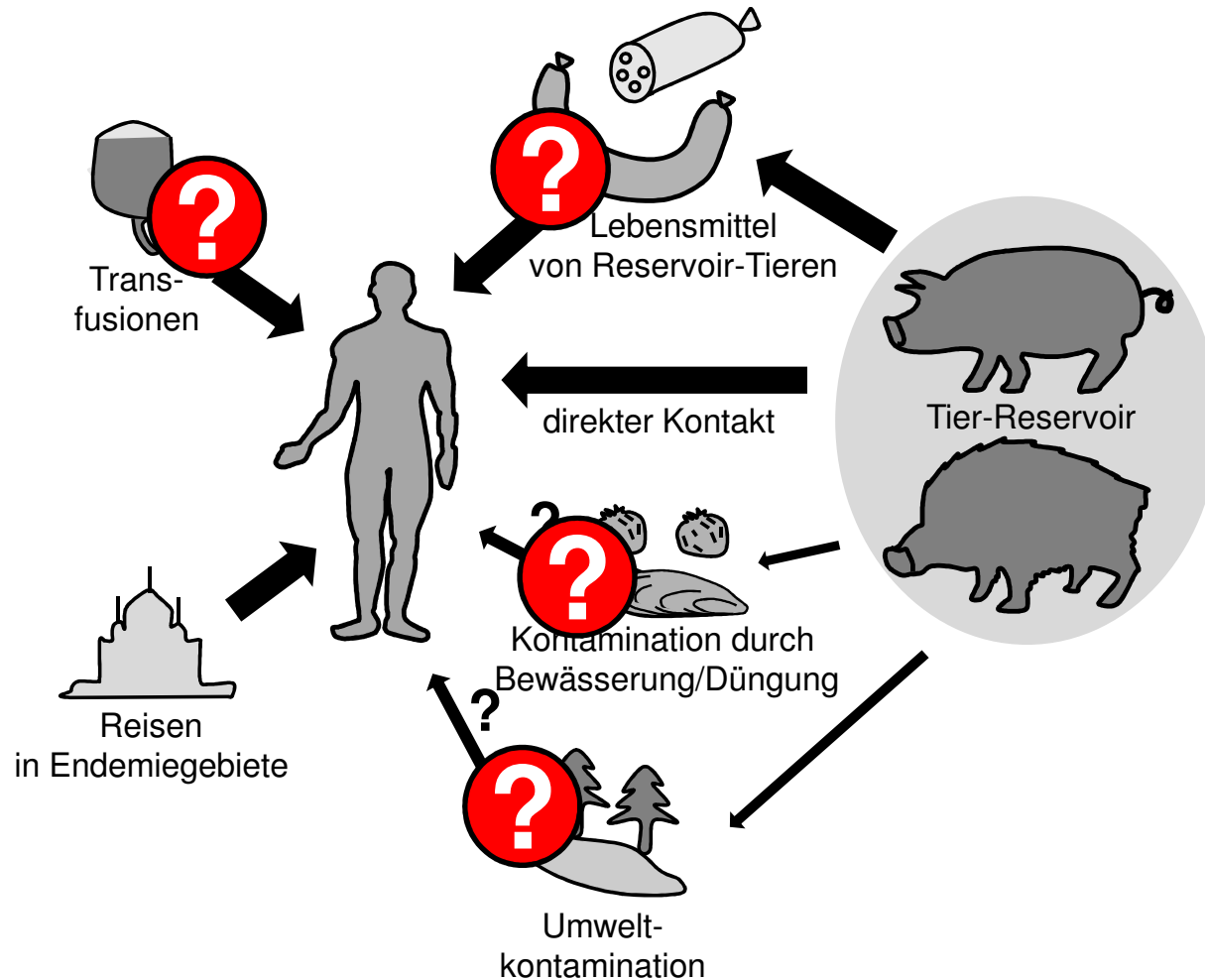
Reimar Johne, Jörg Hofmann, Eva Trojnar

Mögliche Übertragungswege des Hepatitis E-Virus



Mögliche Übertragungswege des Hepatitis E-Virus

→ **Wie lange / unter welchen Bedingungen bleibt HEV infektiös?**



Infektiositätstestung Hepatitis E-Virus

- Versuchstier

- Zellkultur

Hepatitis E-Virus - Zellkultur

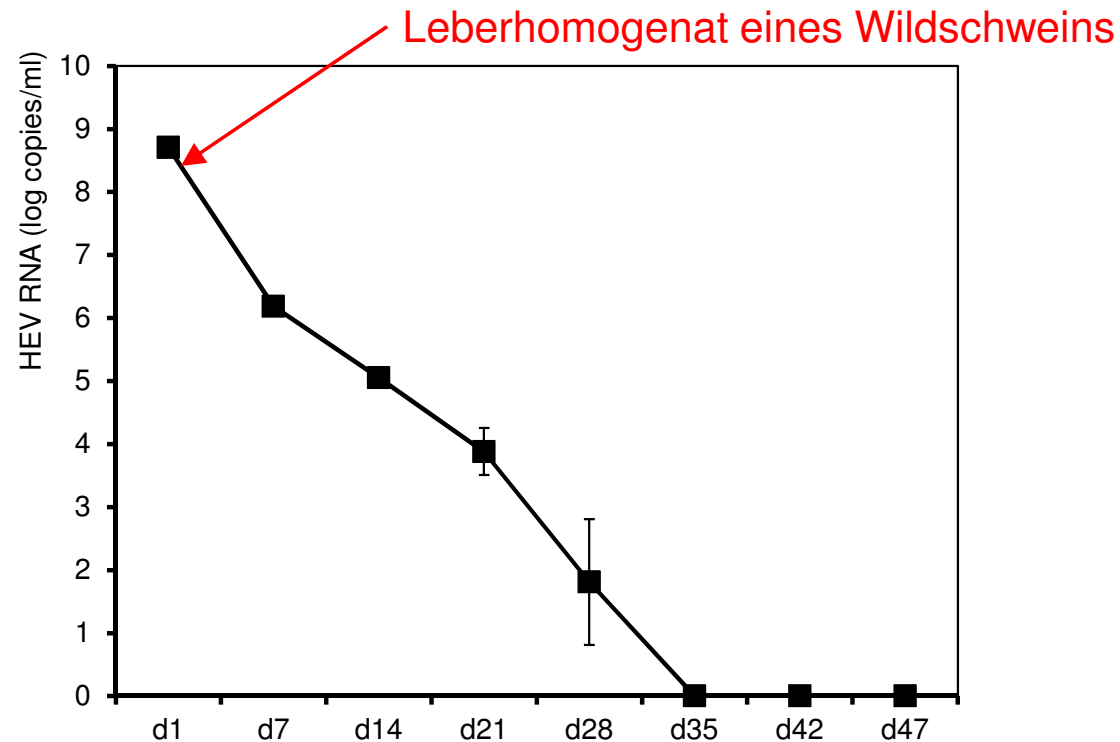
- kein robustes und effizientes Zellkultursystem vorhanden!
- widersprüchliche Befunde:
 - Isolierung und HEV-Wachstum (Tanaka *et al.* 2007, Takahashi *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2011, ...)
 - keine Isolierung und kein HEV-Wachstum (Schielke *et al.* 2011, Berto *et al.* 2013, ...)
- 2011/2012:
 - 2 Berichte über **erfolgreiche Anzucht** von HEV aus chronisch infizierten Patienten in den **USA** (Shukla *et al.* 2011, Nguyen *et al.* 2012)
 - beide Isolate zeigten ungewöhnliche Insertionen im Genom

Eigene Versuche der HEV-Anzüchtung in Zellkultur

- Auswahl der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549
- Inokulation von HEV-positiven Organhomogenaten und Seren
- Inkubation bei 34,5 °C für 7 Wochen
- täglich Abnahme von Aliquots für HEV-Genomnachweis (RT-qPCR)

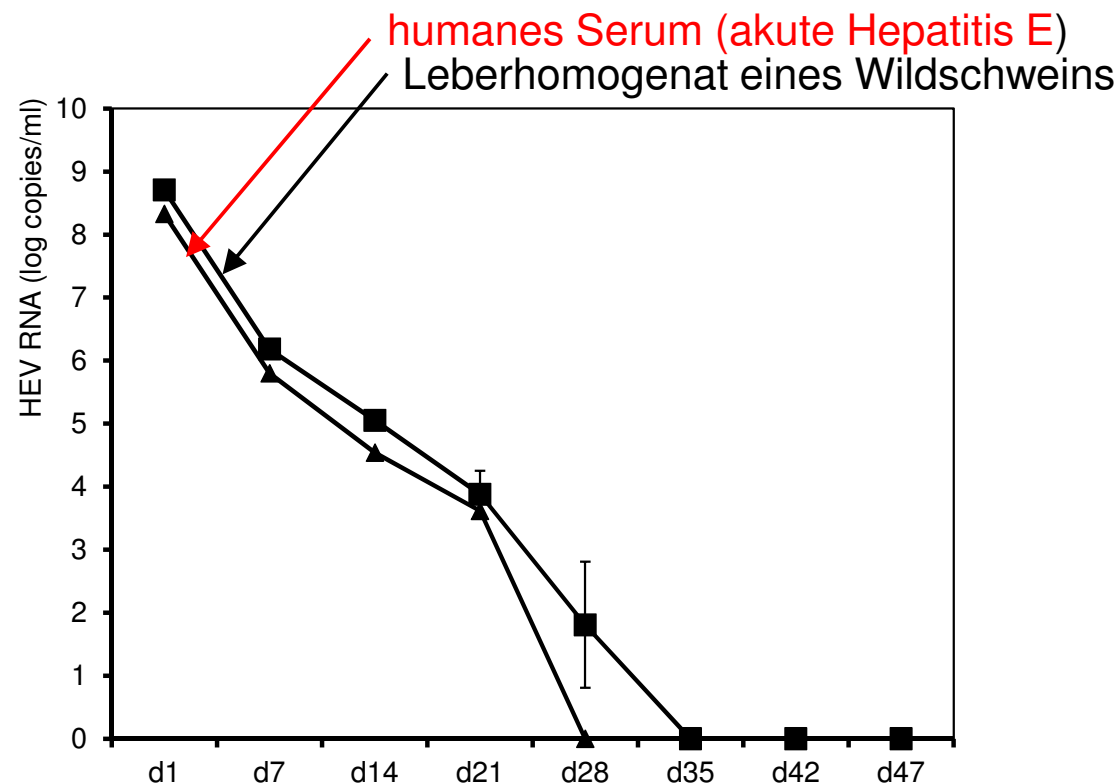
Eigene Versuche der HEV-Anzüchtung in Zellkultur

- Auswahl der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549
- Inokulation von HEV-positiven Organhomogenaten und Seren
- Inkubation bei 34,5 °C für 7 Wochen
- täglich Abnahme von Aliquots für HEV-Genomnachweis (RT-qPCR)



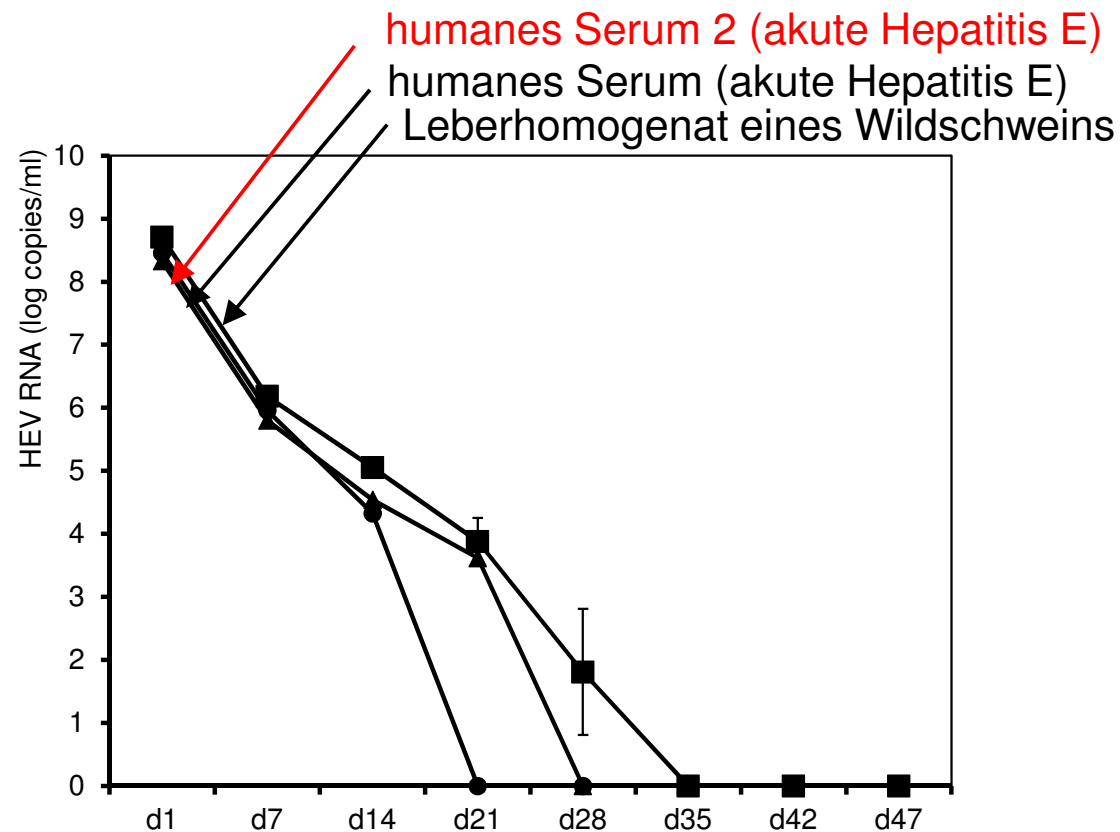
Eigene Versuche der HEV-Anzüchtung in Zellkultur

- Auswahl der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549
- Inokulation von HEV-positiven Organhomogenaten und Seren
- Inkubation bei 34,5 °C für 7 Wochen
- täglich Abnahme von Aliquots für HEV-Genomnachweis (RT-qPCR)



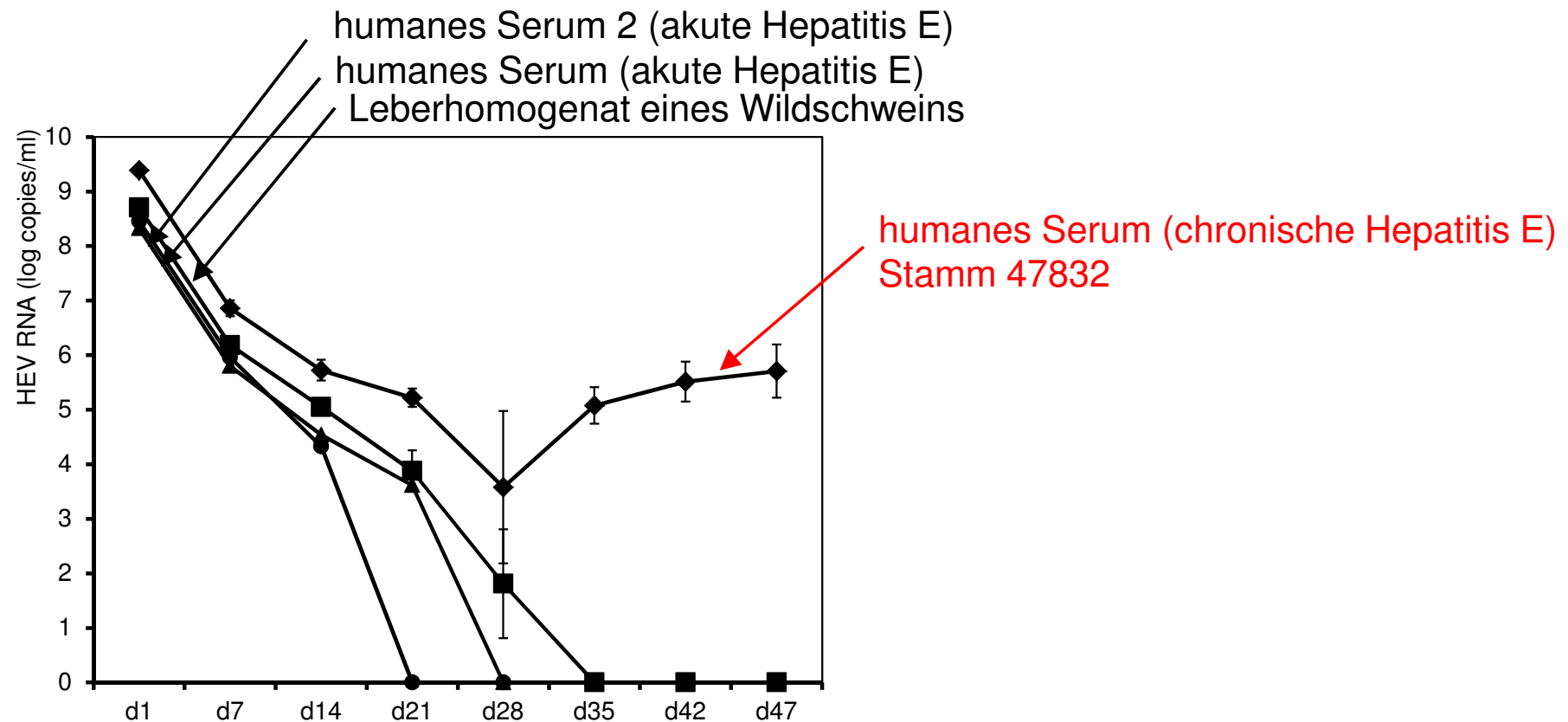
Eigene Versuche der HEV-Anzüchtung in Zellkultur

- Auswahl der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549
- Inokulation von HEV-positiven Organhomogenaten und Seren
- Inkubation bei 34,5 °C für 7 Wochen
- täglich Abnahme von Aliquots für HEV-Genomnachweis (RT-qPCR)



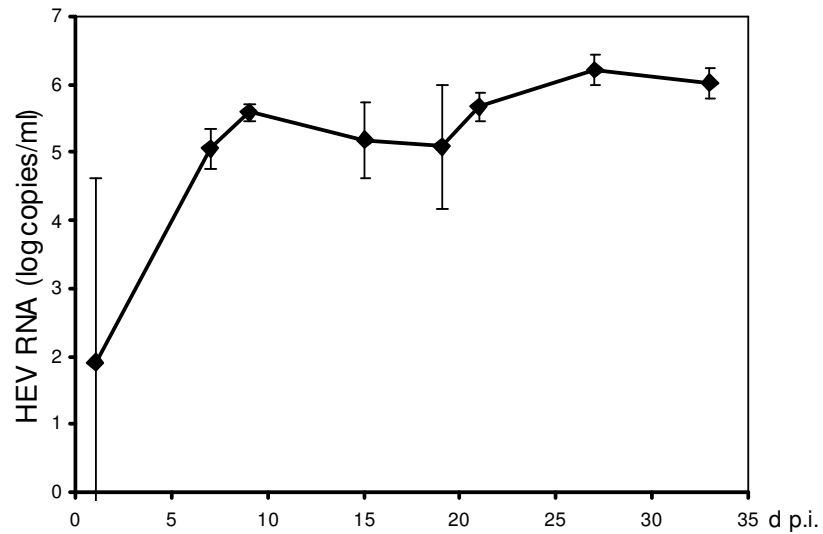
Eigene Versuche der HEV-Anzüchtung in Zellkultur

- Auswahl der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549
- Inokulation von HEV-positiven Organhomogenaten und Seren
- Inkubation bei 34,5 °C für 7 Wochen
- täglich Abnahme von Aliquots für HEV-Genomnachweis (RT-qPCR)

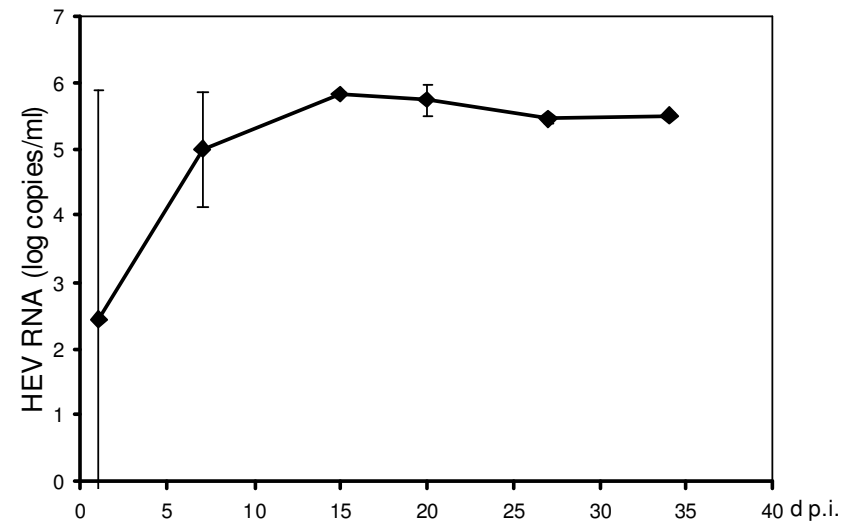


Wachstum von HEV 47832 nach Infektion der Zellkultur

2. Viruspassage



3. Viruspassage



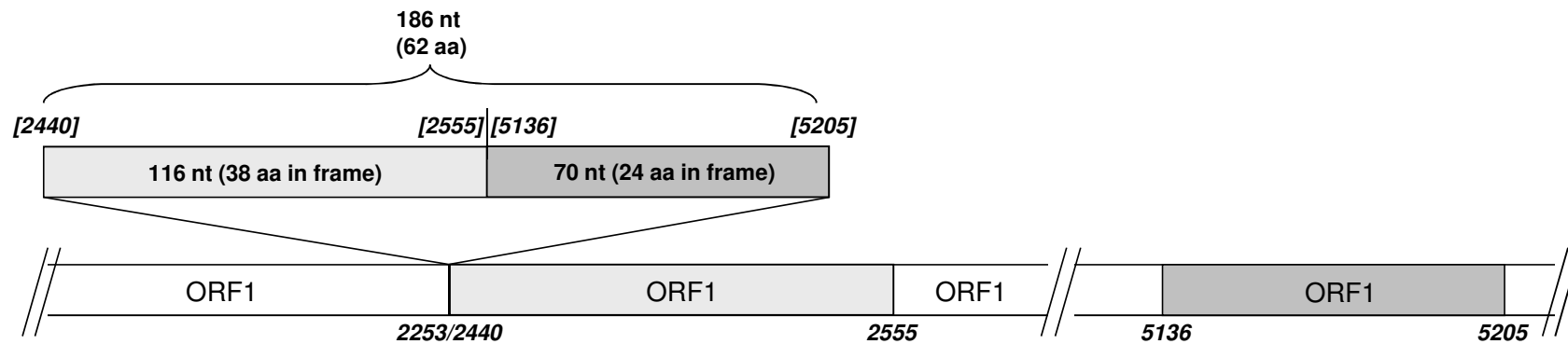
Genomsequenz von HEV 47832

→ Genotyp 3, verwandt mit HEV-Sämmen von Mensch und Wildschwein aus Deutschland

Genomsequenz von HEV 47832

→ Genotyp 3, verwandt mit HEV-Sämmen von Mensch und Wildschwein aus Deutschland

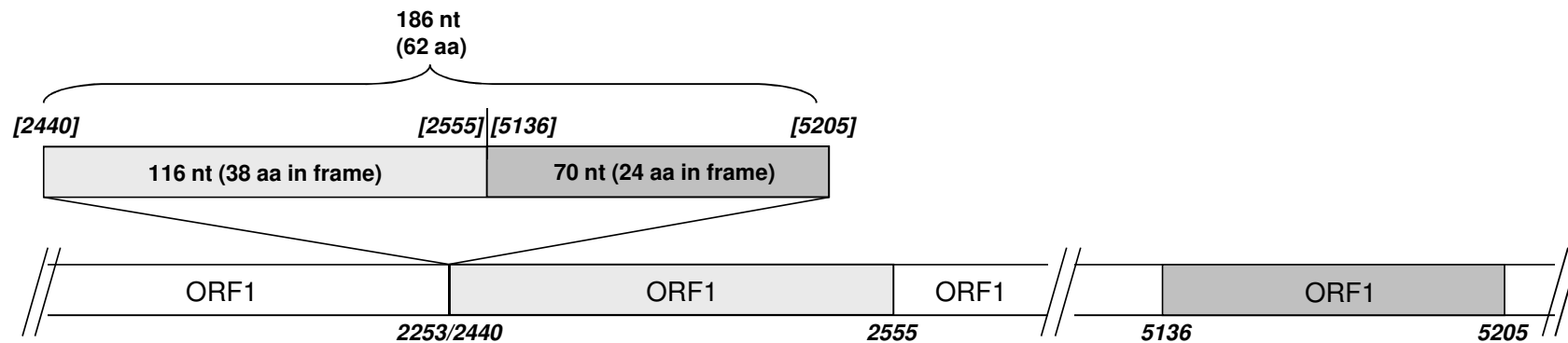
→ Insertion von 186 Nukleotiden im ORF1



Genomsequenz von HEV 47832

→ Genotyp 3, verwandt mit HEV-Sämmen von Mensch und Wildschwein aus Deutschland

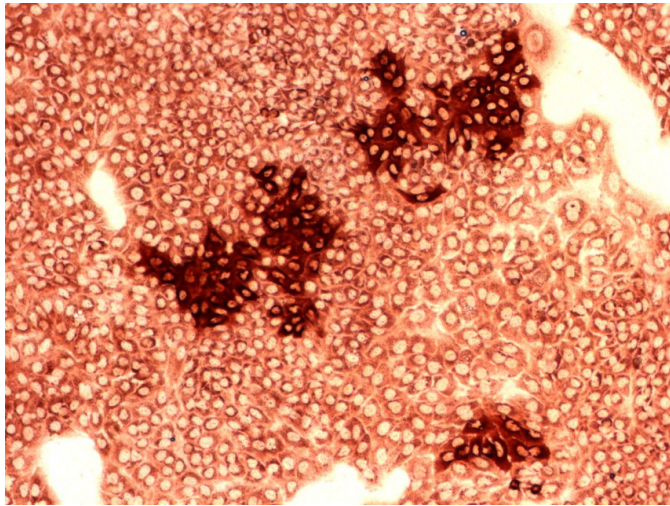
→ Insertion von 186 Nukleotiden im ORF1



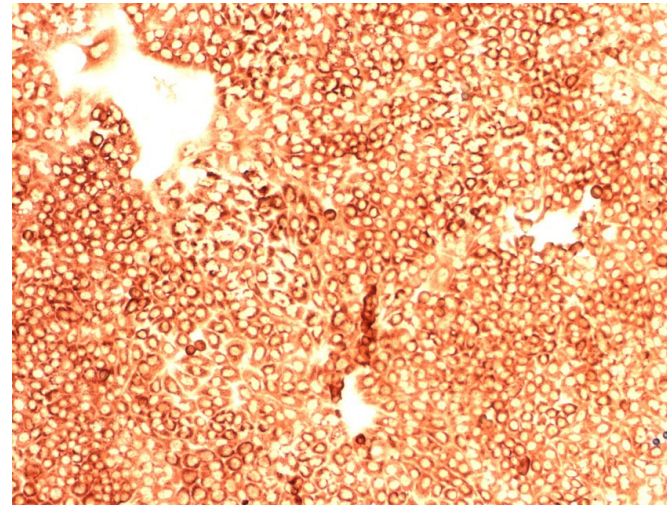
→ besonderer Stamm,
Mechanismus der Zellkultur-Adaption unbekannt

Nachweis von HEV 47832 in Zellkultur

Immunhistochemie, anti-HEV



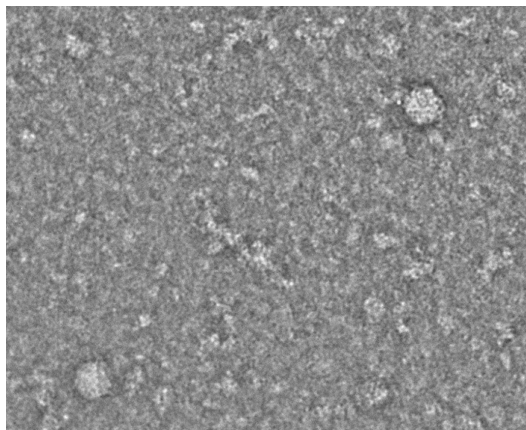
HEV-infiziert



nicht infiziert

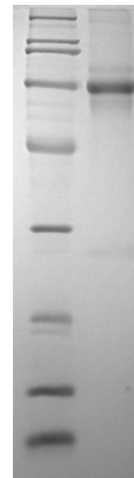
Nachweis von HEV 47832-Partikeln in Zellkultur

Kulturüberstand

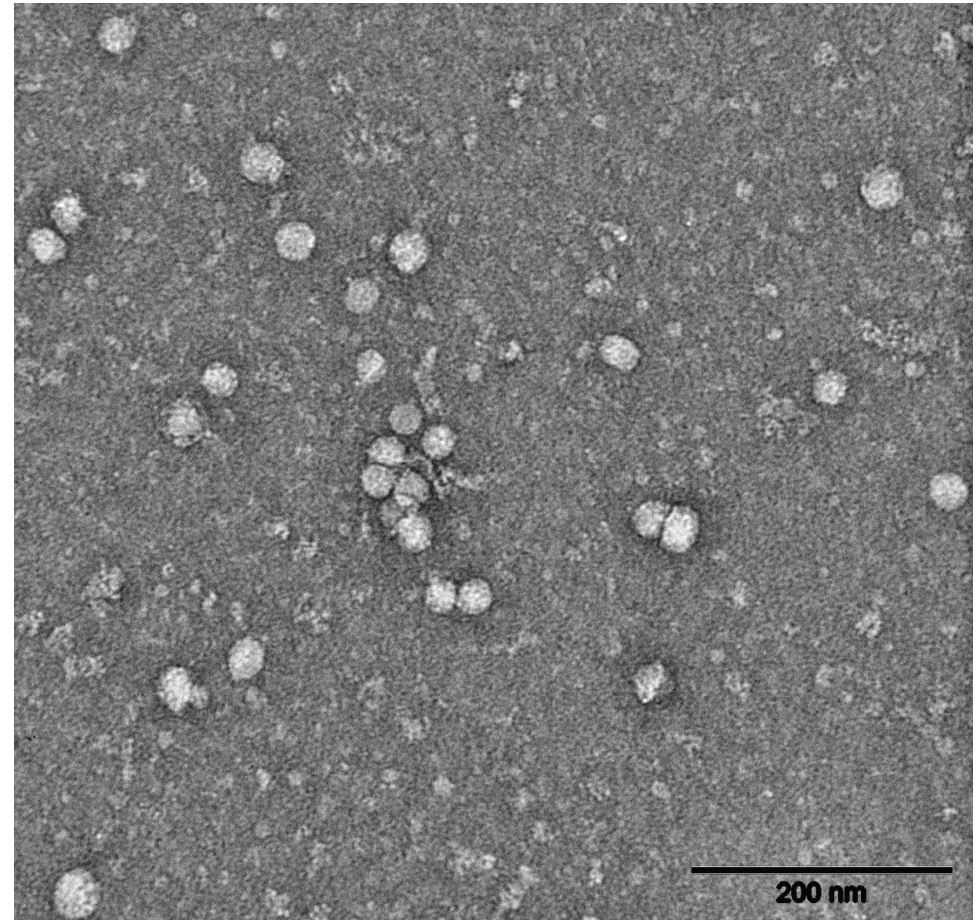


Negativkontrastierung
Elektronenmikroskopie

CsCl-Gradienten-
Reinigung



Coomassie-
Färbung



Negativkontrastierung
Elektronenmikroskopie

Optimierung der HEV-Infektion in Zellkultur

- Probleme:**
- variabler Verlauf des Viruswachstums nach Infektion
 - variable End-Virusmenge
 - Infektion nur mit unverdünntem Kulturüberstand erfolgreich

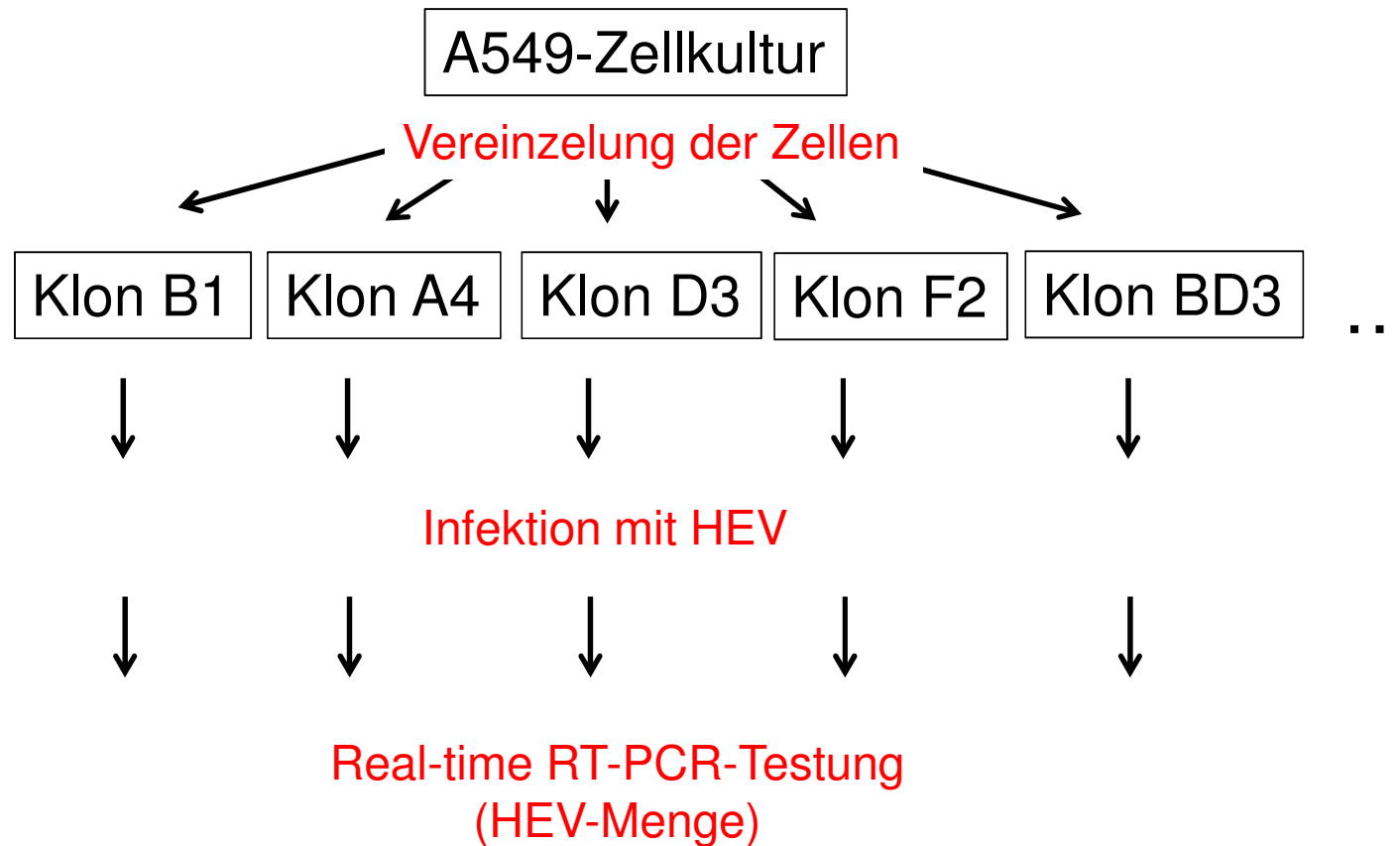
Optimierung der HEV-Infektion in Zellkultur

- Probleme:**
- variabler Verlauf des Viruswachstums nach Infektion
 - variable End-Virusmenge
 - Infektion nur mit unverdünntem Kulturüberstand erfolgreich

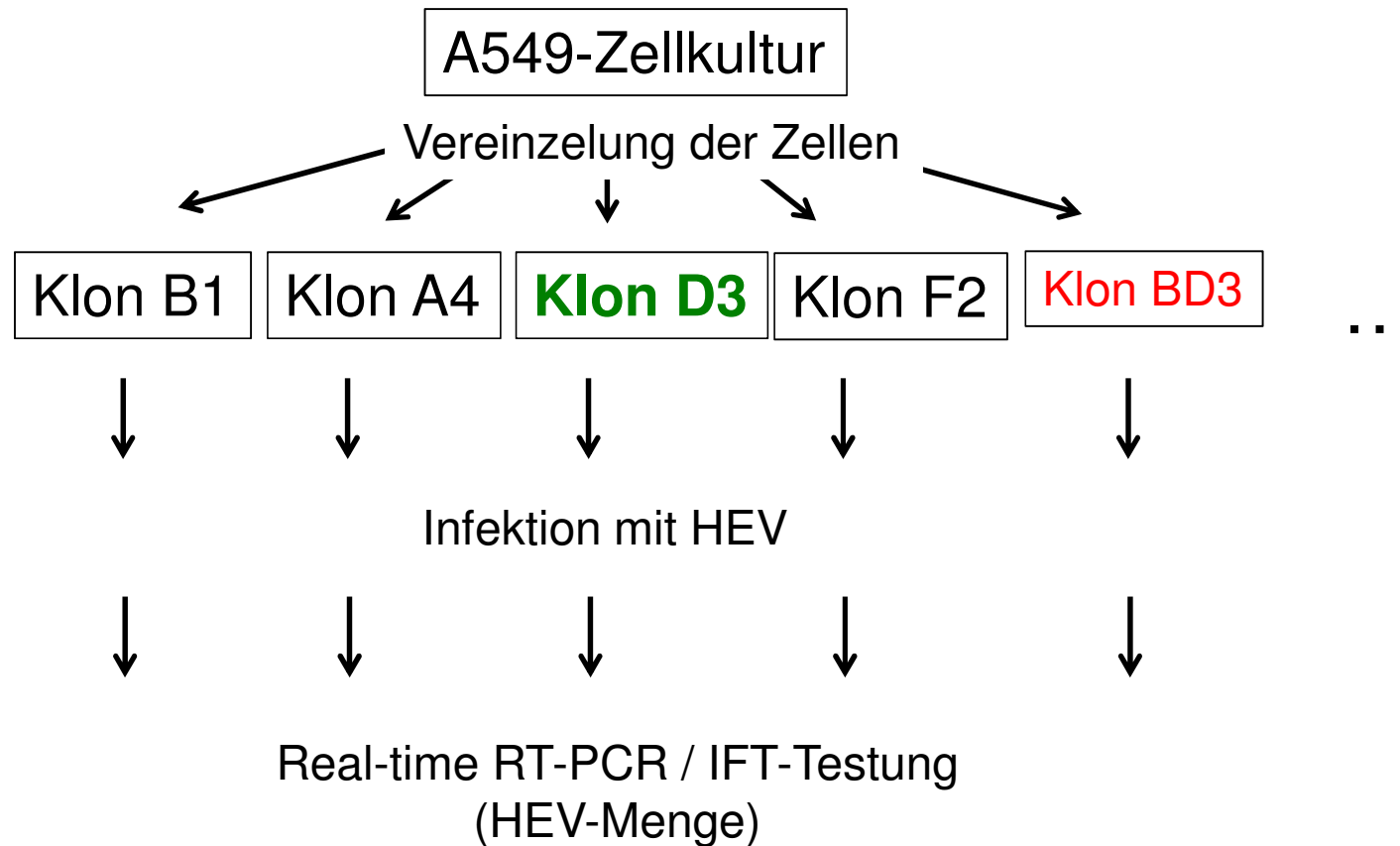
Untersuchungen zur Optimierung:

andere Zellen:	A594	PLC/PR/5
Temperatur:	34,5°C ↑	37°C ↓
Zelldichte:	dünn ↓	konfluent ↑
FKS:	2% ↑	10% ↓

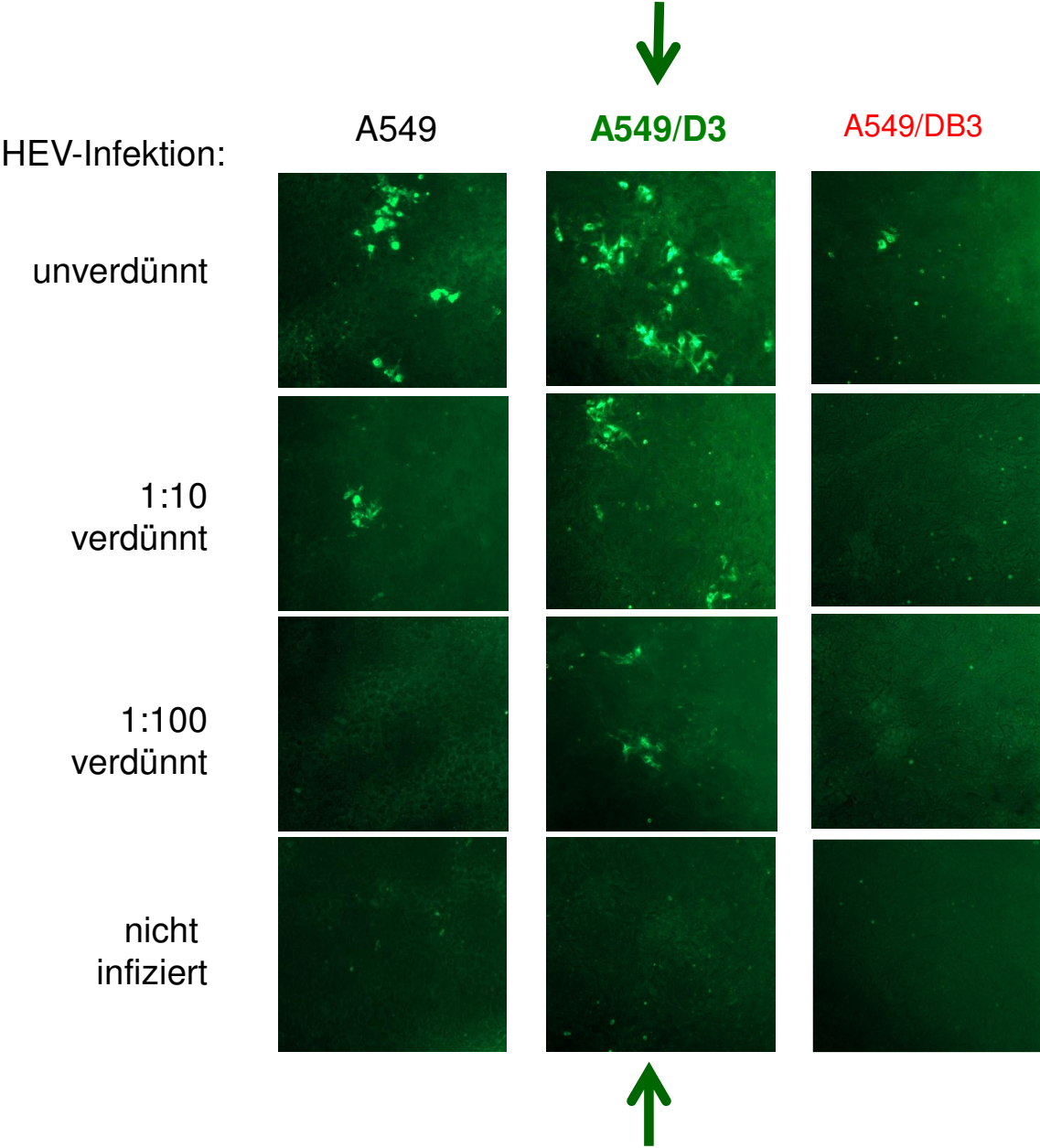
Herstellung von Zellkultur-Klonen



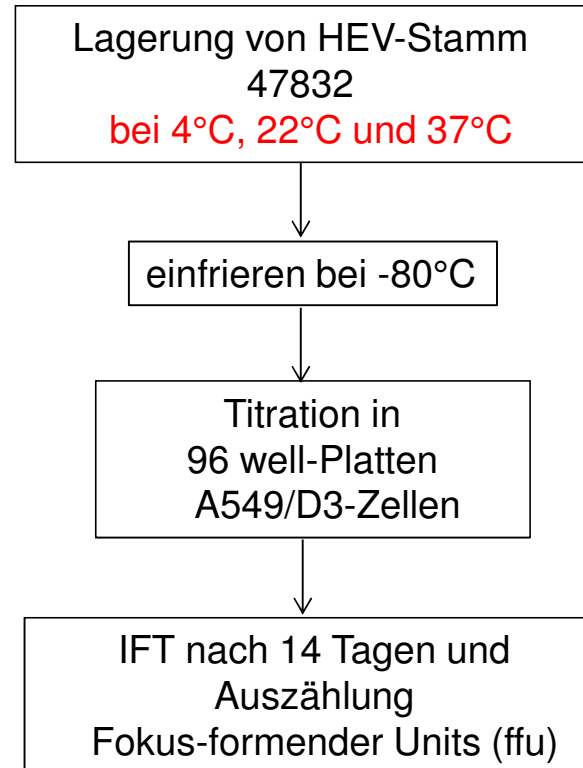
Herstellung von Zellkultur-Klonen



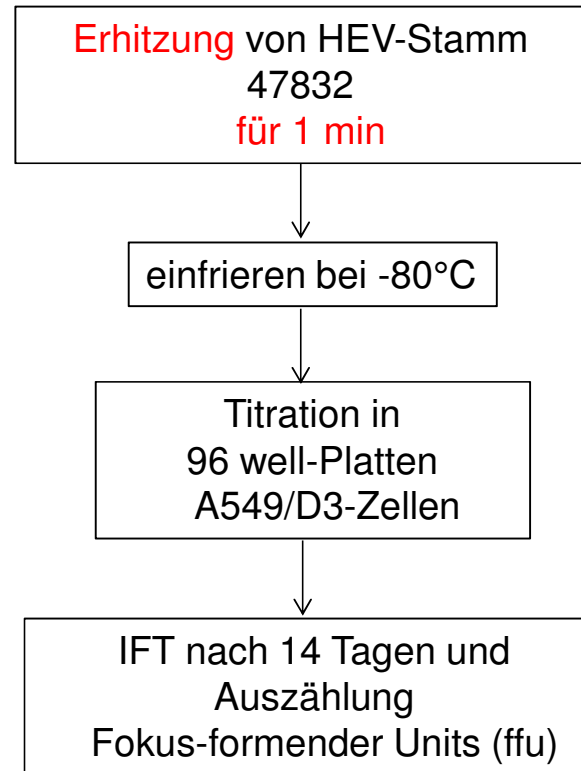
Herstellung von Zellkultur-Klonen



Langzeit-Stabilität von HEV



Hitze-Stabilität von HEV



Zusammenfassung

Ein **HEV**-Stamm wurde erfolgreich in der **Zellkultur** angezüchtet.

Der **Stamm** besitzt eine **ungewöhnliche** Insertion im Genom.

Die HEV-Zellkultur wurde **optimiert** und die besser infizierbare **Sub-Zelllinie A549/D3** generiert.

Erste Ergebnisse zur **Langzeit- und Hitzstabilität von HEV** wurden mit diesem System erhalten.

Acknowledgements



Risiken erkennen – Gesundheit schützen

*Federal Institute for Risk
Assessment (BfR):*

Jochen Reetz

Jens Hammerl

Patrycja Machnowska

Jana Sachsenröder

Eva Trojnar

Silke Apelt

*Friedrich-Loeffler-Institute
(FLI):*

Rainer Ulrich

Charité Medical School:

Peter Nickel

Jörg Hofmann



Federal Institute for Risk Assessment

DiedersdorferWeg 1 • D-12277 Berlin

Tel. 030 18412 - 1006 • Fax 030 18412 - 2064

Reimar.Johne@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de