

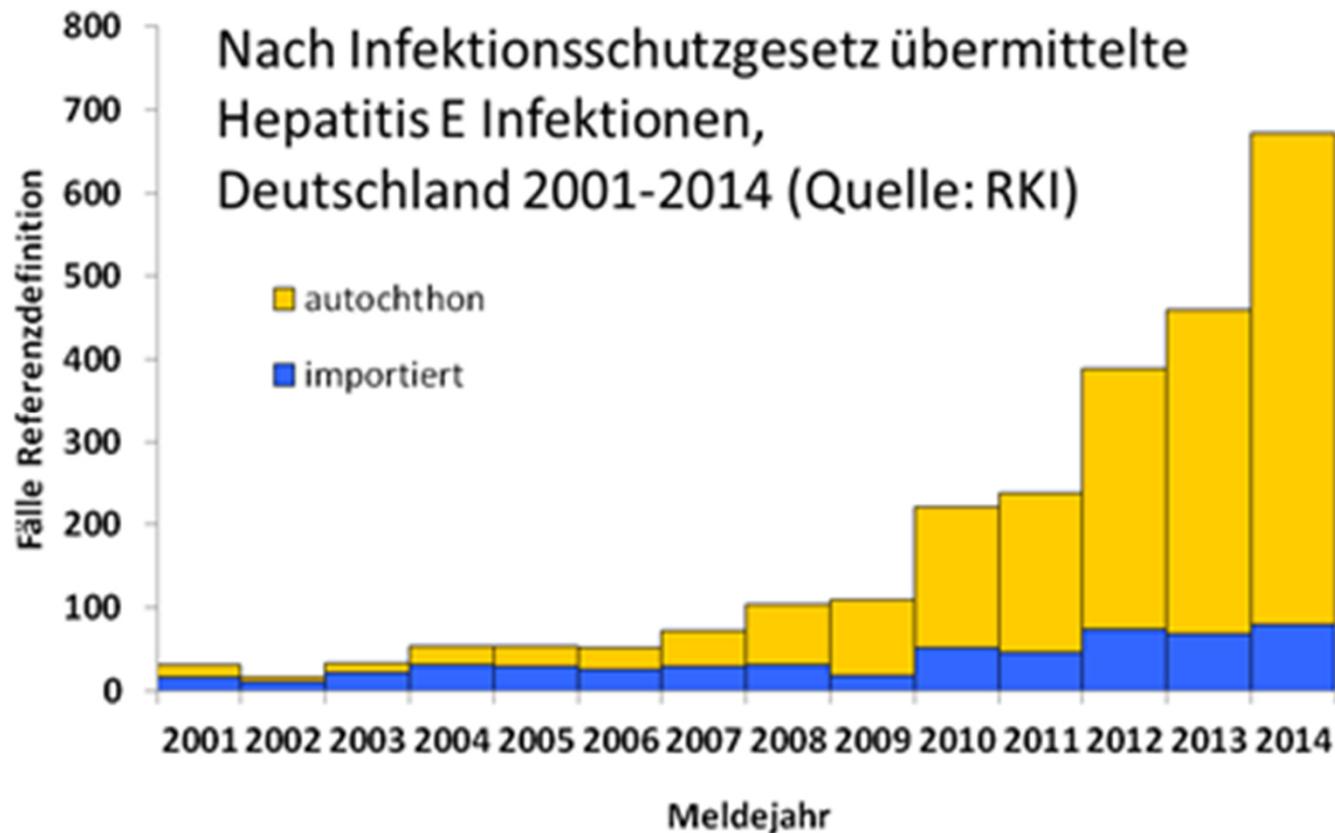
Entwicklung eines sensitiven Nachweisverfahrens für Hepatitis E- Viren in Rohwurstprodukten und Leberwurst

Dr. Eva Trojnar

Dr. Kathrin Szabo

Hepatitis E in Deutschland

- seltene Form der viralen Hepatitis, jedoch **ansteigende Zahlen**
- Einzelerkrankungen, **keine Übertragung über Trinkwasser**
- meist autochthone HEV-Infektion, selten Reise-assoziiert



Datenquelle: Dr. med. Mirko Faber, RKI, FG 35 (Gastrointestinale Infektionen, Zoonosen, tropische Infektionen)

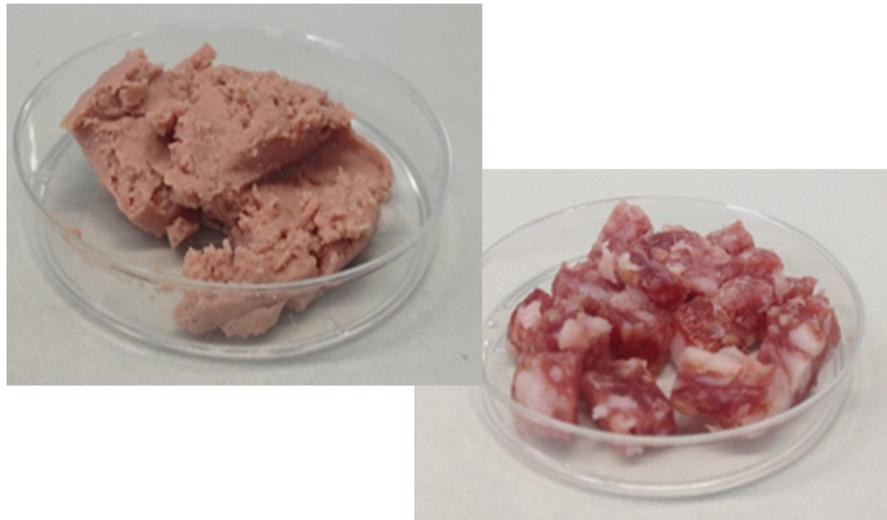
Hepatitis E: Übertragung und Verbreitung

	Hepatitis E in Afrika und Asien	Hepatitis E in Industrienationen
HEV-Genotypen	1 und 2	3 und 4
Verbreitung	epidemisch und sporadisch	sporadisch (autochthon)
Infektionsquellen	Trinkwasser	zoonotische Übertragung (insbesondere Schweinefleisch) (Blutprodukte)
Fulminante Verläufe bei Schwangeren	häufig	selten
Chronische Verläufe	nicht beschrieben	bei Immunsupprimierten und selten bei Immunkompetenten

Epidemiologisches Bulletin Nr. 15, 13. April 2015 / Nr. 15

Ziel der Studie

- bisher keine einheitliche Methode zum Nachweis von Hepatitis E-Virus in Fleischerzeugnissen
- **Ziel:** Entwicklung eines zuverlässigen und sensitiven Nachweisverfahrens für den Nachweis von HEV in Fleischerzeugnissen
- insbesondere für Rohwurst und Leberwurst





Methodenentwicklung

- bei HEV „interne“ Kontamination des Lebensmittels
- Testung diverser Methoden zum Zellaufschluss
- Homogenisator, Stomacher, Vortexer
- Analyse freigesetzter Schweine-DNA

Durchführung:

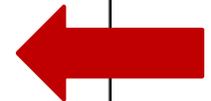
- Matrix: Salami
- Probenmenge: 5 g
- manuelle Zerkleinerung
- Homogenisierung in 10 ml PBS
- Zentrifugation: 10.000 x g, 20 min, 4°C
- DNA-Extraktion: NucliSense (BioMerieux)
- Nachweis von freigesetzter „Schweine-DNA“ mittels real time PCR

Salami-Proben	<u>Homogenisator</u> CT-Wert PIG-DNA	<u>Stomacher</u> CT-Wert PIG-DNA	<u>Vortexer</u> CT-Wert PIG/DNA
1. PBS	20,4	20,1	23,7
2. PBS	21,9	21,6	23,0
3. PBS	21,9	21,5	24,5

Methodenentwicklung

- Testung diverser Ansätze für den Nachweis von HEV aus der Literatur

Methodenentwicklung	Aufarbeitung	Lebensmittel-matrix	Referenz	WFR% im Mittelwert
Direkte RNA-Extraktion mit Trizol® Reagent	Homogenisieren in TRIzol® Reagent, RNA Extraktion aus Überstand	Verzehrsfertige Lebensmittel	Baert et al. (2008)	4,90 %
Entfettung/PBS	Manuelle Entfernung von Fett, Suspension in PBS, RNA Extraktion aus Überstand	Leberwurst	Colson et al. (2010)	0,60 %
RNeasy® Midi Kit (Qiagen)	Homogenisieren in RLT-Puffer, RNA Isolation mit RNeasy Midi Kit	Leber, Fleisch, Wurst	Di Bartolo et al. (2012)	0,04 %



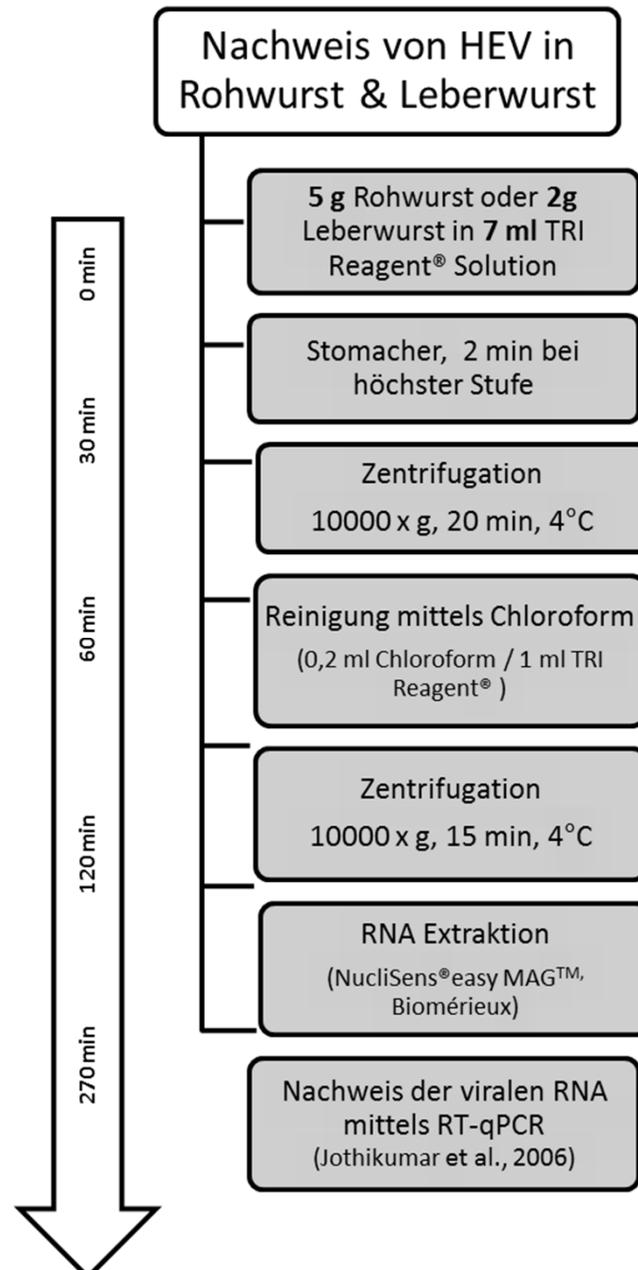
Methodenoptimierung

- Aufarbeitung der Rohwurst- und Leberwurstproben in TriReagent
- 5 g Probe im Stomacher homogenisiert
- RNA-Extraktion aus dem Überstand
- zusätzlicher Reinigungsschritt mittels Chloroform (Phasentrennung)
- Wiederfindungsraten (WFR) bei der Salami ca. 11%
- Wiederfindungsraten bei der Leberwurst unter **1 % !**



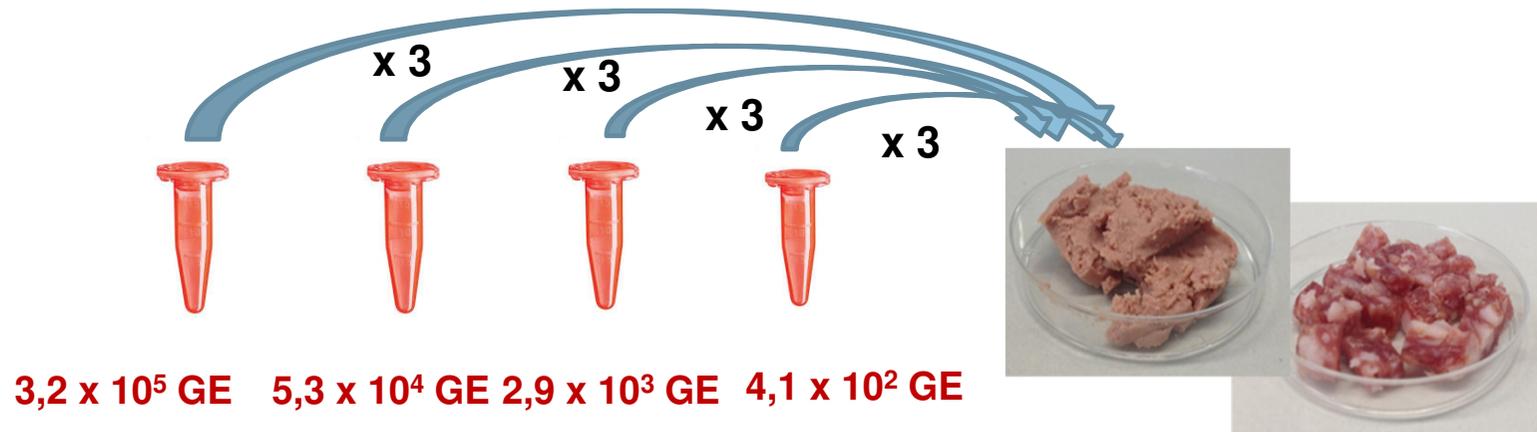
- Probenmenge, Puffer, Reinigungs- und Konzentrierungsschritte variiert (PBS, TriReagent®, Tris-Glycine-Beef-Extrakt-Puffer, Glycine-Puffer, Chloroform, Butanol, Chloroform-Butanol-Lösung)
- Aufarbeitung bei verringertes Probenmenge (2 g)
- Wiederfindungsraten **>1%**

Methode zum Nachweis von HEV



Ermittlung der WFR* und der Nachweisgrenzen

- Inokulation der Proben mit HEV (mindestens 3 Verdünnungen bekannter Konzentration)
- jeweils Dreifachbestimmung



	Salami	Leberwurst
Wiederfindungsrate	ca. 11 %	>1%
Nachweisgrenze	2,9 x 10 ³ GE / 5 g	5,3 x 10 ⁴ GE / 2 g

WFR* Wiederfindungsrate

Untersuchung von Lebensmitteln aus dem Handel

- 120 Lebensmittel (70 Rohwürste, 50 Leberwürste) untersucht
- Ziel: Verbreitung von HEV-Kontamination in „Risiko-Lebensmitteln“ ermitteln

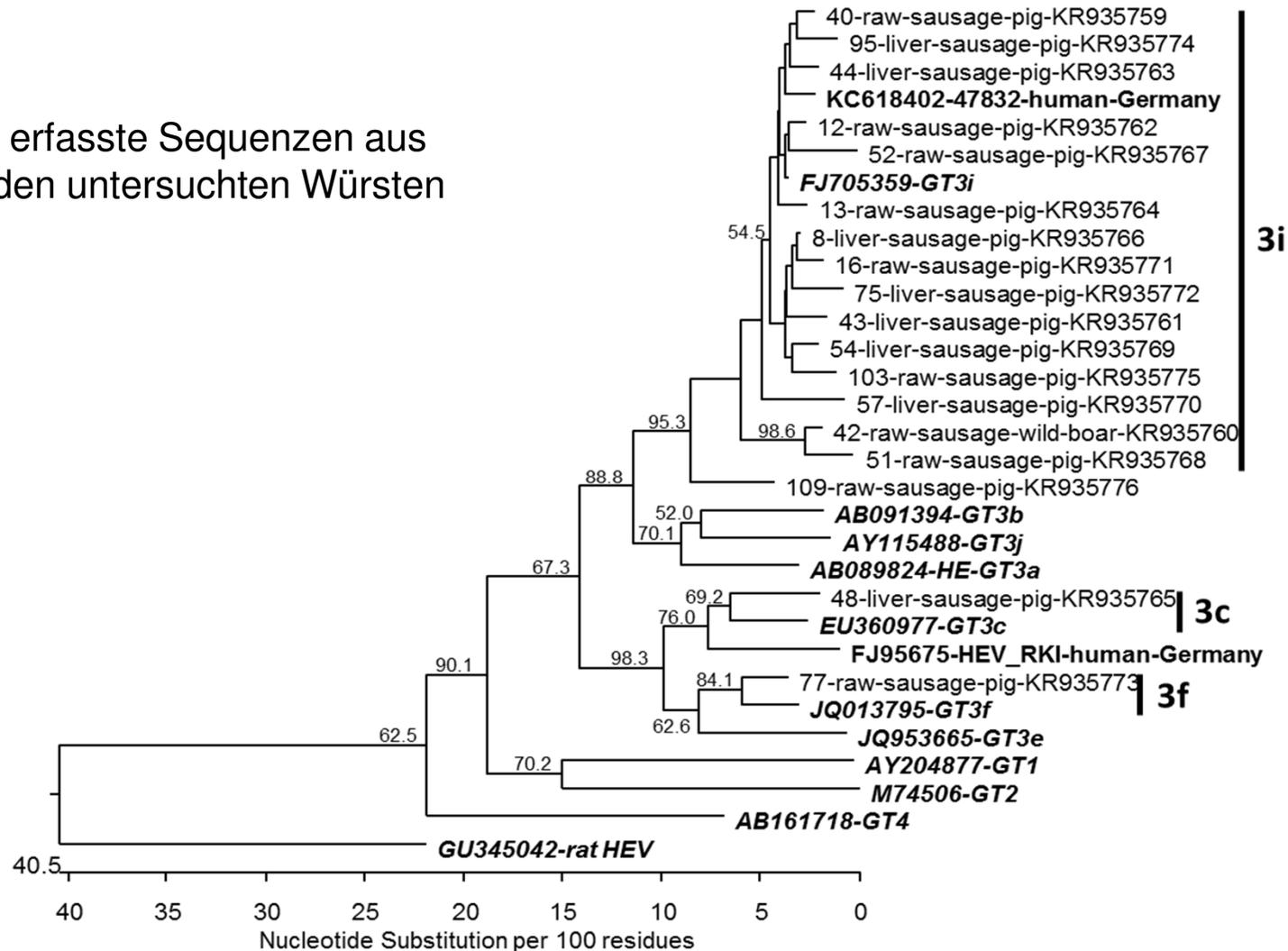
Matrix	Anzahl getestet	Anzahl positiv	HEV-positiv in %	erfolgreich sequenziert
Rohwurst, (Schwein)	50	13	26 %	9 / 13
Rohwurst (Wildschwein)	10	1	10 %	1 / 1
Rohwurst (im Ausland produziert)	10	0	0 %	/
Rohwurst gesamt	70	14	20 %	10 / 14
Leberwurst	50	11	22 %	8 / 11



- 14 von 70 (20%) Rohwürste & 11 von 50 (22%) Leberwürste HEV-positiv

Untersuchung von Lebensmitteln aus dem Handel

erfasste Sequenzen aus den untersuchten Würsten



- erfasste HEV-Sequenzen zeigen eine hohe Vielfalt
- verschiedene Subtypen von HEV-Genotyp 3

Ringversuch zum Nachweis von HEV in Leberwurst

Ringversuchsprotokoll

Qualitativer Nachweis von Hepatitis E-Viren in Leberwurst

Im Rahmen der § 64 LFGB-Arbeitsgruppe
„Viren in Lebensmitteln“



- Validierung der Methode im Rahmen des § 64 LFGB (Ringversuch mit 9 Laboren)
- Qualitativer Nachweis
- Anwendung der „optimierten“ Methode
- 12 Leberwurst-Proben (je 2 g) werden untersucht
- 4 x HEV-negativ, 4 x „stark“ HEV-positiv und 4 x „schwach“ HEV-positiv
- Isolierung und Konzentrierung der viralen RNA
- Extraktion der viralen RNA
- Nachweis der viralen RNA und der Prozesskontrolle (MS2) mittels real time RT-PCR

Zusammenfassung

- Übersicht über alle publizierten Methoden zum Nachweis von Hepatitis E-Virus in Fleischerzugnissen (Rohwurst-Produkte)
- effiziente Homogenisierung des Lebensmittels, Analyse der freigesetzten Schweine-DNA
- Etablierung eines sensitiven Verfahrens zum Nachweis von Hepatitis E-Viren in Fleischerzugnissen wie Rohwurst und Leberwurst
- Ermittlung der Nachweisgrenze und der Wiederfindungsrate für die beiden Matrices Salami und Leberwurst
- Untersuchung von 120 Lebensmitteln aus dem Handel
- 14 von 70 (20%) Rohwürste & 11 von 50 (22%) Leberwürste HEV-positiv
- Sequenzierung der positiven Proben
- hohe Vielfalt an HEV-Sequenzen, verschiedene Subtypen von HEV-Genotyp 3
- Validierung der Methode (Ringversuch mit 9 Laboren)



Danksagung

Diese Studie wurde zum Teil durch einen Zuschuss des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts ZooGloW (FKZ 13N12697) und von einem Vertragsforschungsprojekt für das Sanitätsamt der Bundeswehr in Zusammenarbeit mit der TiHo Hannover und dem BfR ausgeführt.

Prof. G. Klein



**Dr. Binder
Dr. U. Schotte
Dr. H. Anheyer-
Behmenburg**



**Prof. R. Johne
Prof. L. Ellerbroek**



DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT

Eva Trojnar

Bundesinstitut für Risikobewertung

Diedersdorfer Weg 1 • 12277 Berlin

Tel. 0 30 - 184 12 - 2129

Eva.Trojnar@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de