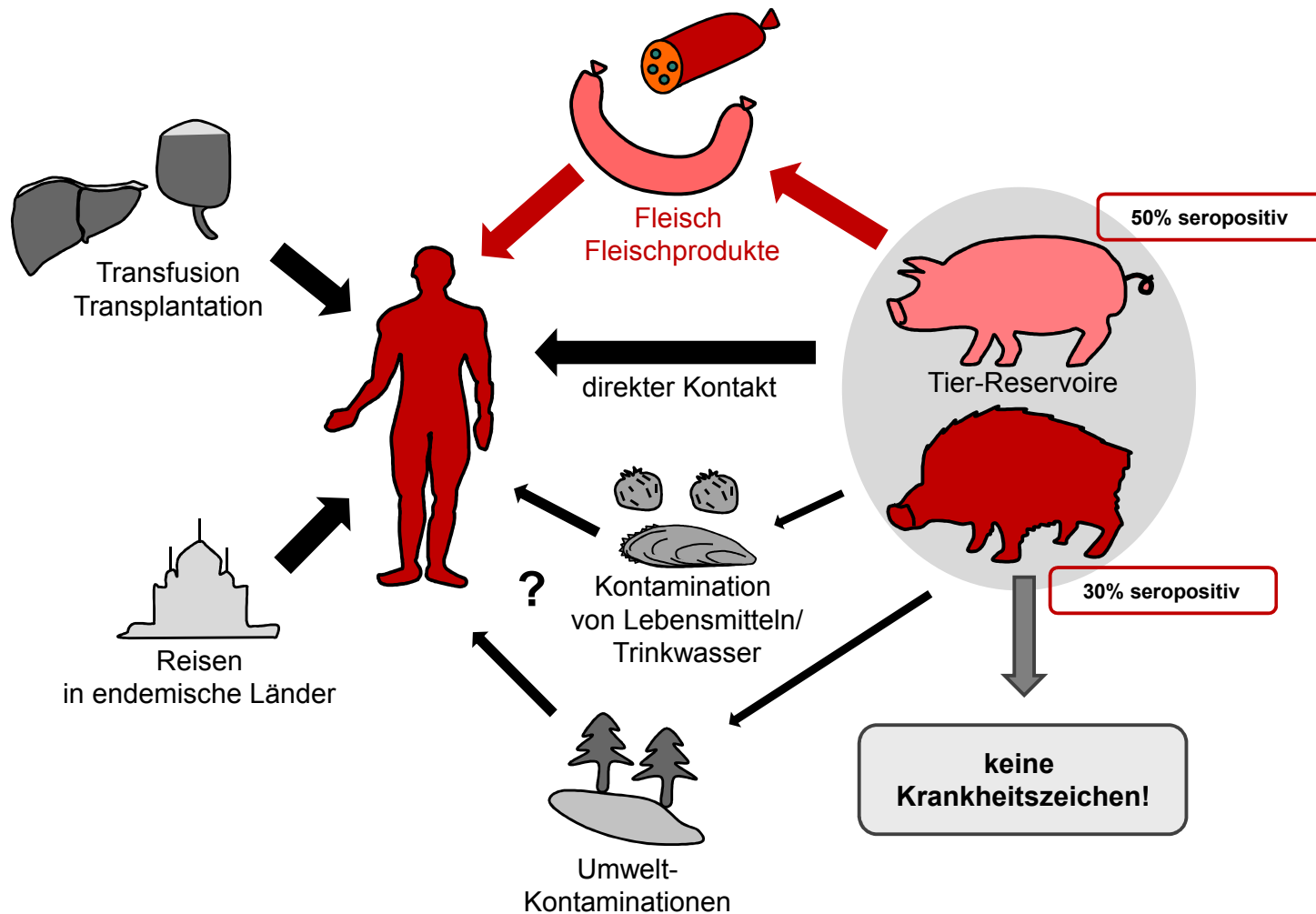


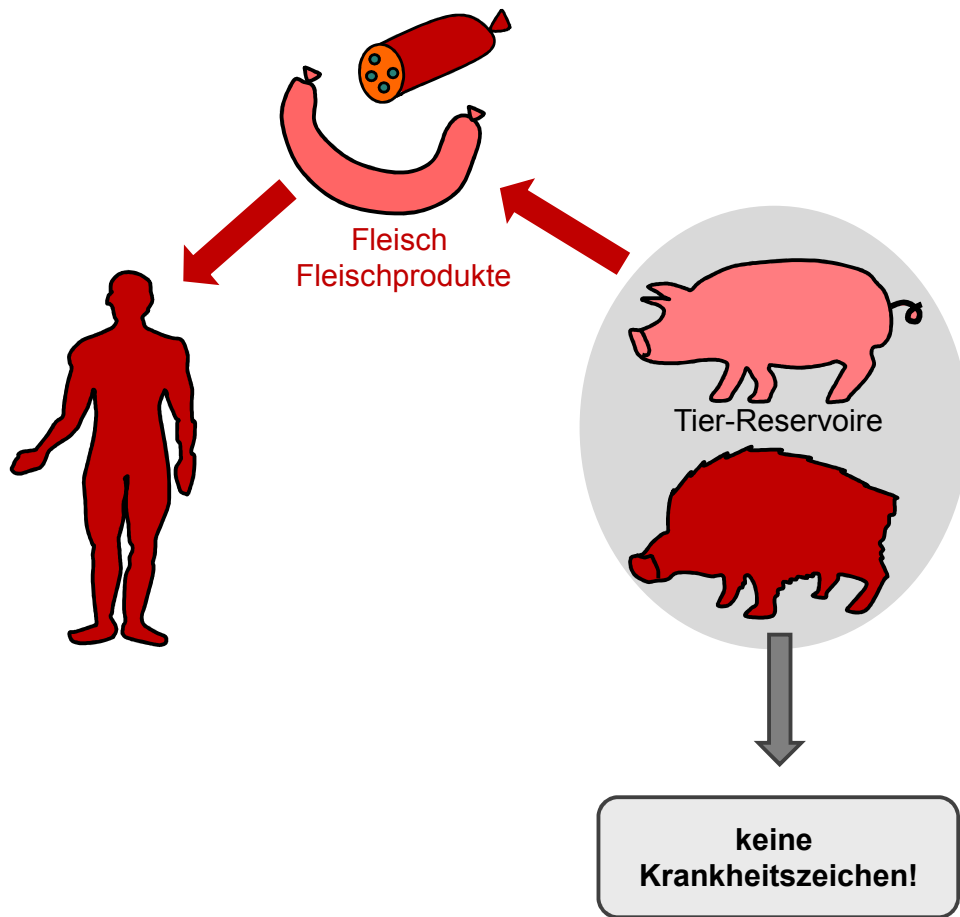
Ringversuch zur Validierung einer Methode für den Nachweis von Hepatitis E-Virus in Fleisch und Fleischprodukten

Dr. Nadine Althof
4. Symposium "Lebensmittel-assoziierte Viren"
07. November 2018

Übertragung von Hepatitis E-Virus in industrialisierten Ländern



Übertragung von Hepatitis E-Virus in industrialisierten Ländern



Japan

- rohe **Leber** von **Wildschwein** → 2 Personen (2003) *Matsuda et al. (2003)*
- gegrilltes Fleisch **Wildschwein** → 1 Person (2004) *Masuda et al. (2005)*
- gegrilltes Fleisch **Wildschwein** → 2 Personen seropositiv *Masuda et al. (2005)*
- gegrilltes Fleisch **Wildschwein** → 1 Person (2005) *Li et al. (2005)*

Frankreich

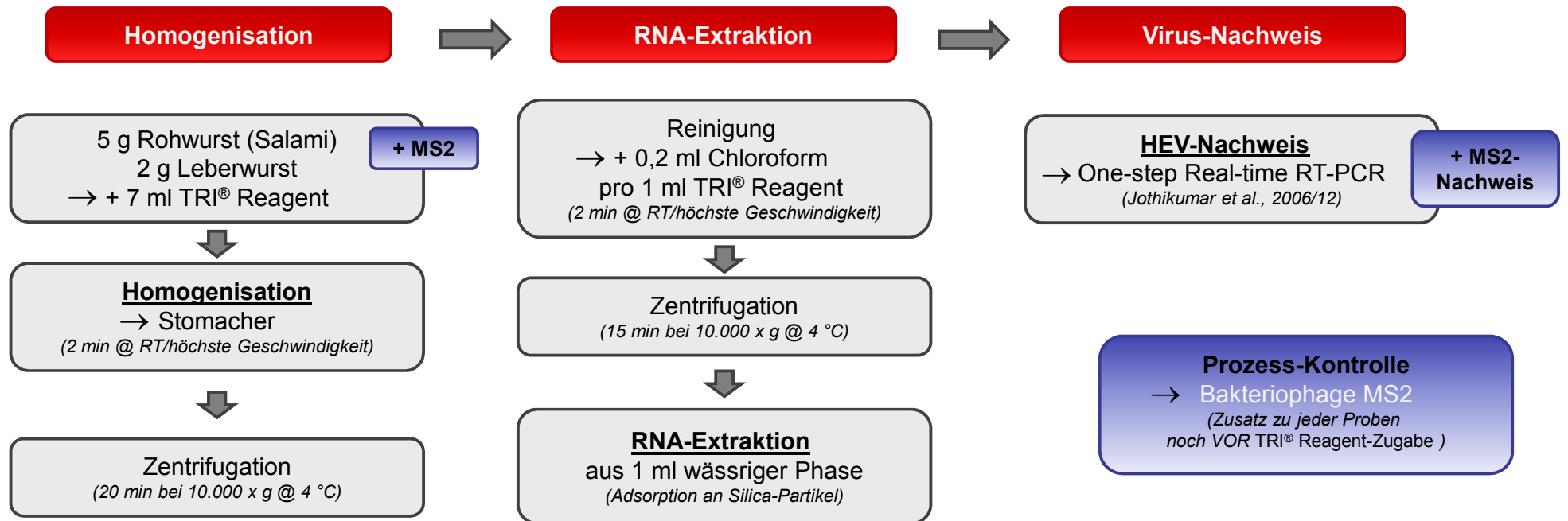
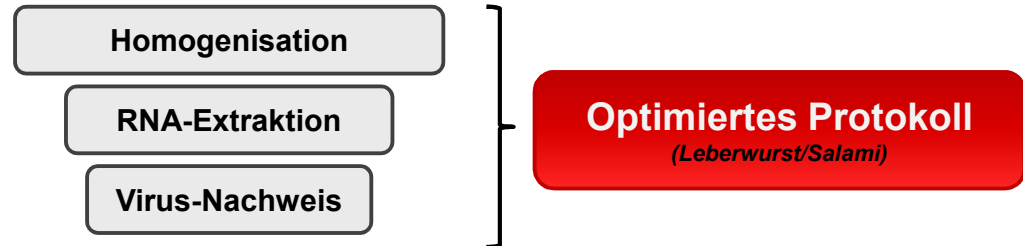
- Figatellu (Wurst mit roher **Schweineleber**) → 7 Personen (2009) *Colson et al. (2010)*
- Figatellu (Wurst mit roher **Schweineleber**) → 1 Person (2013) *Renou et al. (2014)*

Schweiz

- Mortadella di fegato crudo (Wurst mit roher **Schweineleber**) → 1 Person (2016) *Kubacki et al. (2017)*

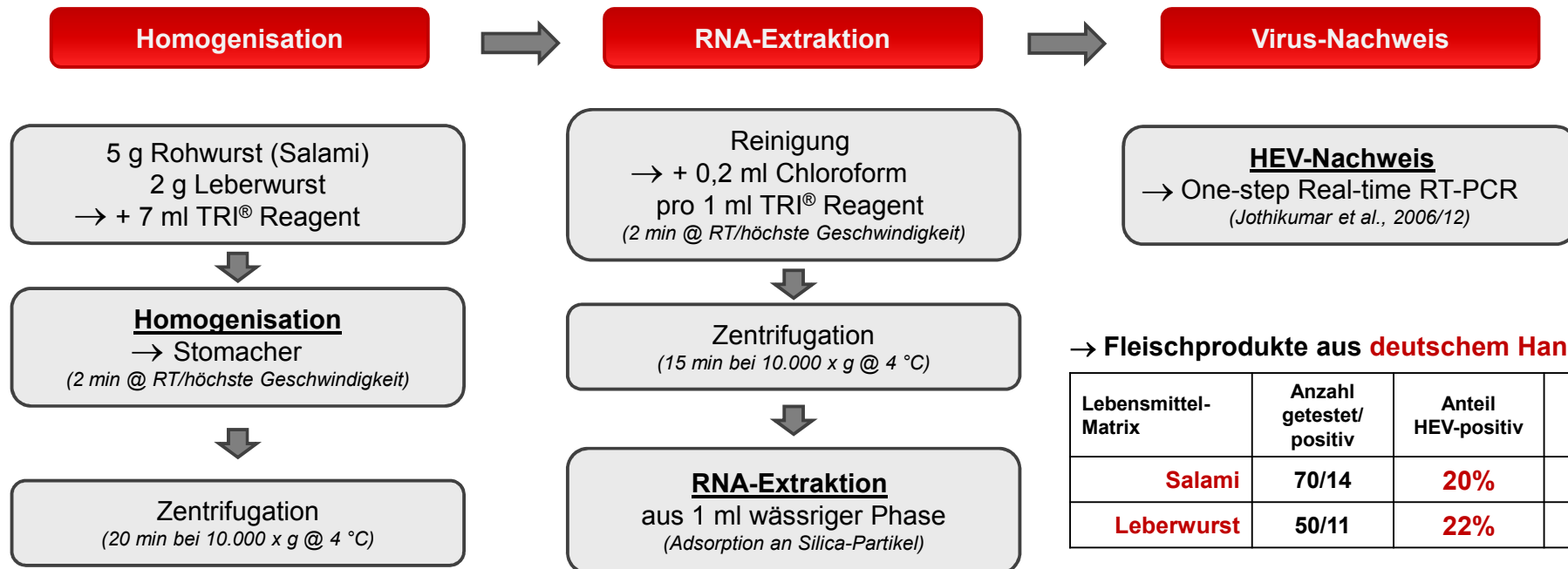
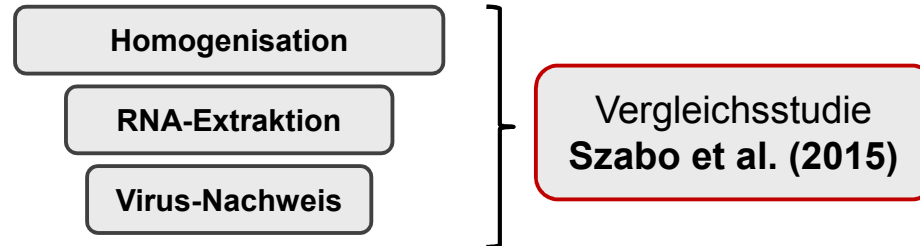
Virusisolation aus Fleisch & Fleischprodukten → Nachweis von Hepatitis E-Virus

→ nur wenige Protokolle/Methoden publiziert:



Virusisolation aus Fleisch & Fleischprodukten → Nachweis von Hepatitis E-Virus

→ nur wenige Protokolle/Methoden publiziert:



→ Fleischprodukte aus **deutschem Handel**:

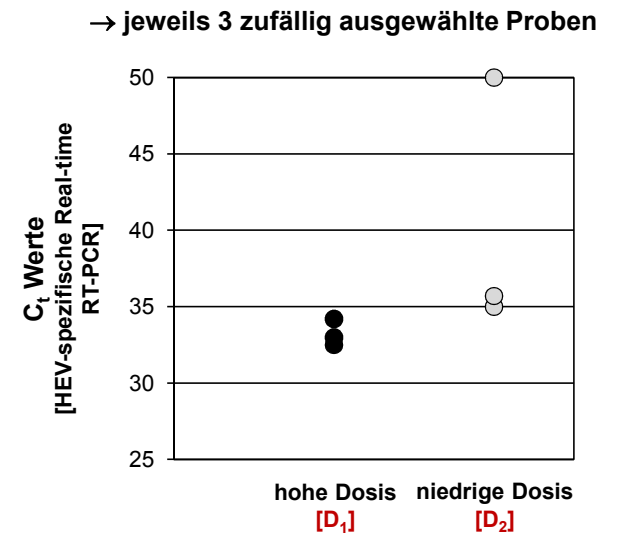
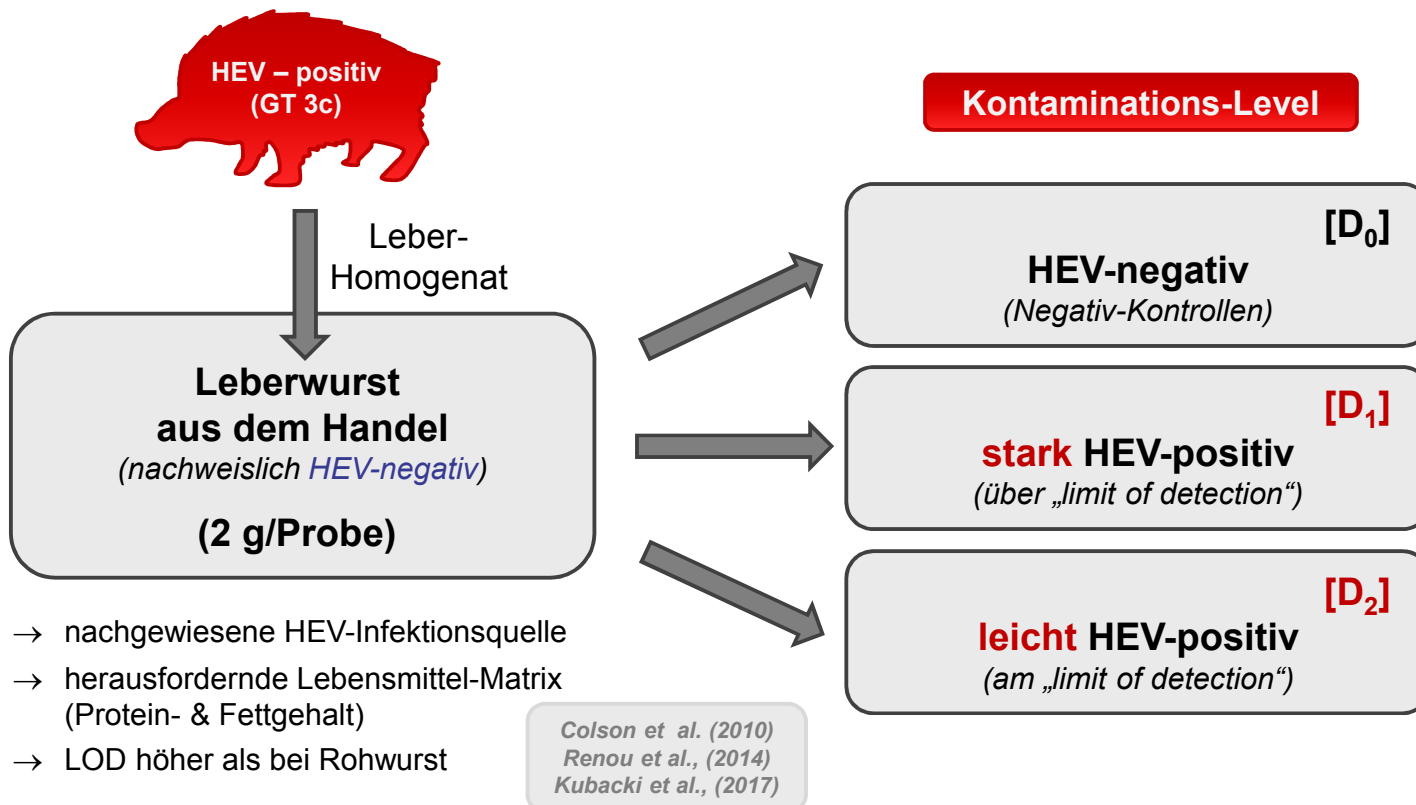
Lebensmittel-Matrix	Anzahl getestet/ positiv	Anteil HEV-positiv	LOD [GE/g]
Salami	70/14	20%	7,03 x 10 ³
Leberwurst	50/11	22%	3,20 x 10 ⁴

Infektiosität & Infektionsrisiko ?

Validierung der optimierten Methode nach Szabo et al., 2015

- Validierungs-Studie zur Erstellung einer **neuen amtlichen Methode**
- organisiert durch die **§64 LFGB-Arbeitsgruppe „Viren in Lebensmitteln“**
- Ringversuchsleitung: **Dr. Eva Trojnar** (BfR Berlin; Fachgruppe 42/Virologie)

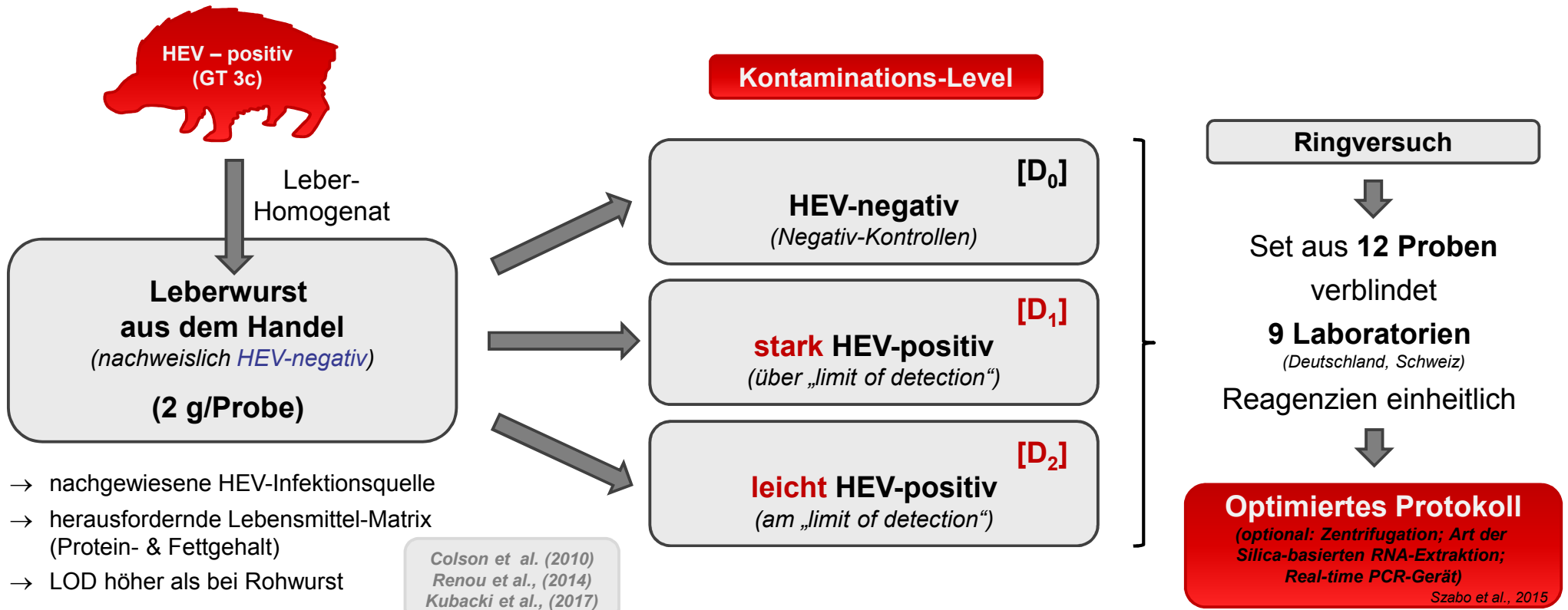
2015



Validierung der optimierten Methode nach Szabo et al., 2015

- Validierungs-Studie zur Erstellung einer **neuen amtlichen Methode**
- organisiert durch die **§64 LFGB-Arbeitsgruppe „Viren in Lebensmitteln“**
- Ringversuchsleitung: **Dr. Eva Trojnar** (BfR Berlin; Fachgruppe 42/Virologie)

2015



Auswertung der Ringversuchsdaten – HEV-spezifische Real-time RT-PCR

→ Silica-basierte RNA-Extraktion

Methoden	System	Anzahl der Anwender
voll-automatisch	NucliSENS® easyMag	6
semi-automatisch	NucliSENS® MiniMag	2
manuell	Magnet	1

→ verwendete Real-time PCR-Geräte

Model	Hersteller	Anzahl der Anwender
ABI 7500	Applied Biosystems	2
Rotor Gene 6000	Corbett Research	1
LightCycler 480	Roche Diagnostics	2
MX3005P	Stratagene	1
RotorGene Q	Qiagen	1
RotorGene Q (5-plex)	Qiagen	1
BioRad CFX 96	Bio Rad Laboratories	1

Ergebnisse Ringversuch – Prozesskontrolle/Wiederfindungsrate

- MS2-Wiederfindungsrate [%] = $2^{-\Delta C_t} \times 100$

MS2-spezifischer
C_t-Wert
Lebensmittel-Matrix-Probe



MS2-spezifischer
C_t-Wert (jeder)
Lebensmittel-Matrix-**freie** Probe

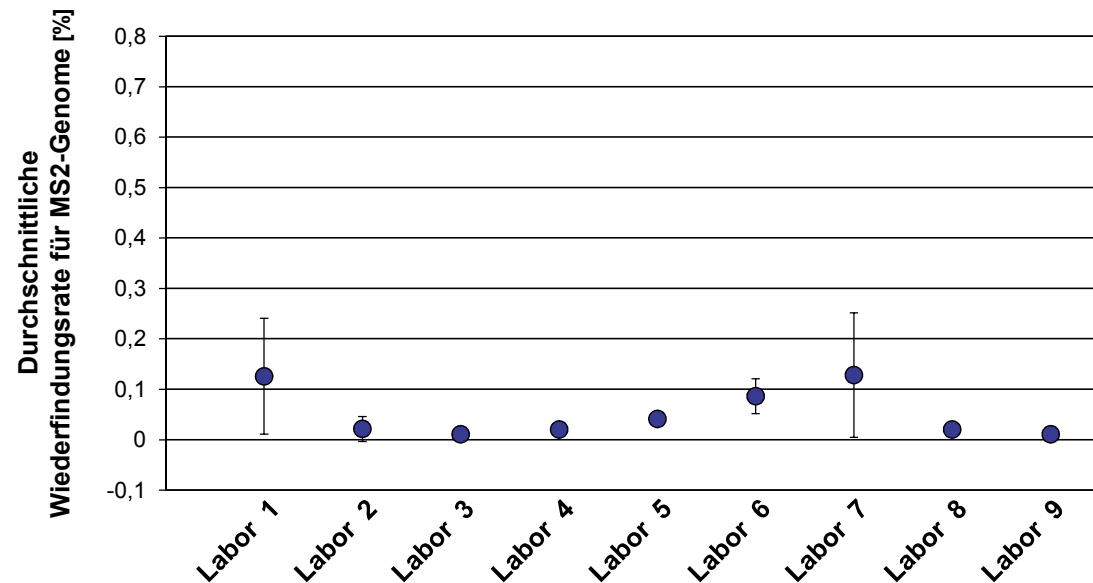
- Proben mit einer **MS2-Wiederfindungsrate** von $\geq 0,01\%$ → valides HEV-spezifisches Ergebnis!

Wiederfindungsraten
Bakteriophage MS2

bei allen Proben
valide Ergebnisse

Wiederfindungsraten zwischen
0,01%-0,16%

Unterschiede v. a. zwischen
den Laboratorien

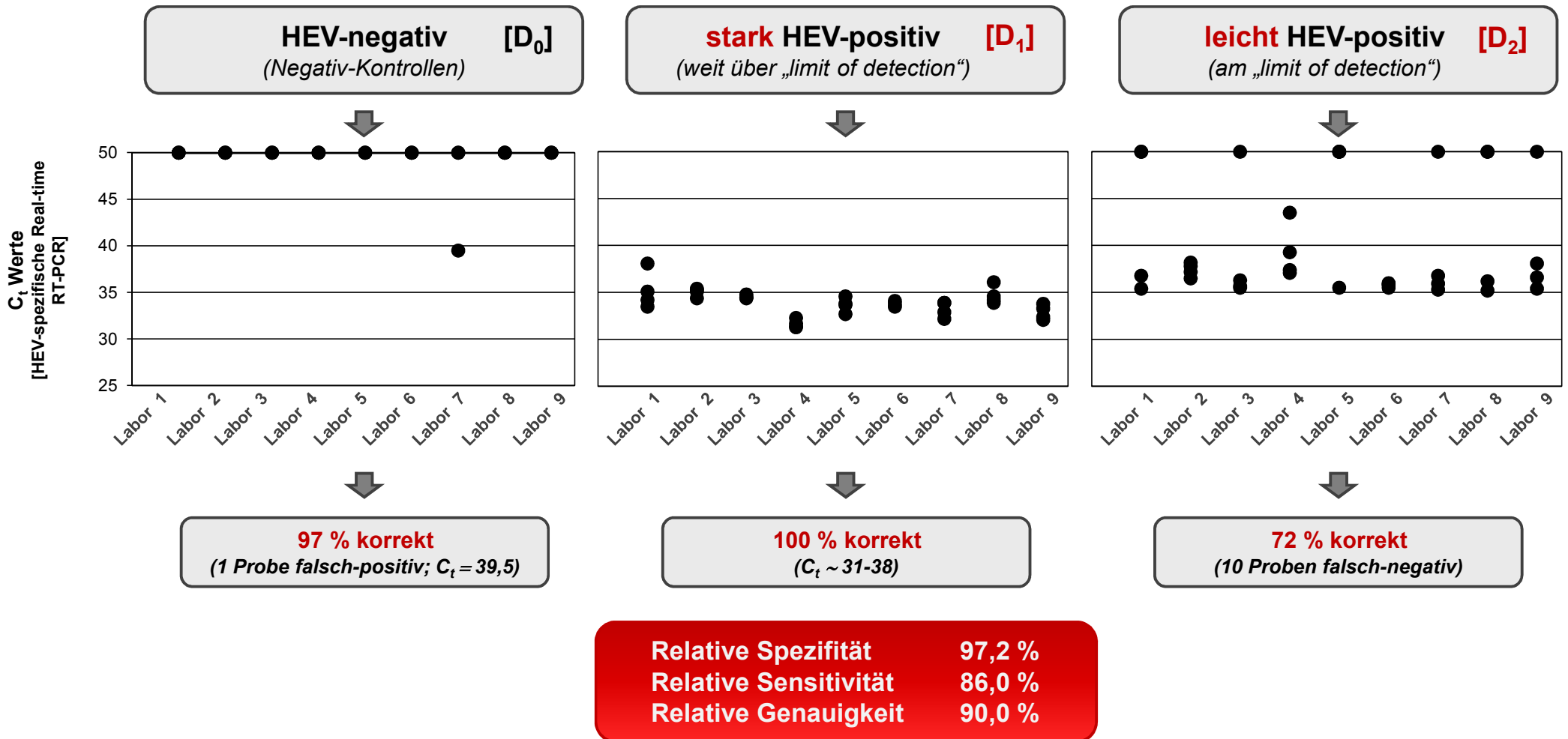


Ergebnisse Ringversuch – HEV-spezifische Real-time RT-PCR

	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8	Labor 9
Probe #1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Probe #2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	39,5	ND	ND
Probe #3	ND	38,2	36,3	43,5	ND	36	35,3	36,2	36,6
Probe #4	33,5	35,1	34,4	32,3	32,7	33,9	33,9	34,6	32,4
Probe #5	38,1	35,3	34,8	31,7	34,6	33,5	32,2	34,2	32,1
Probe #6	ND	36,5	35,5	37,4	ND	35,9	ND	ND	38,1
Probe #7	35,4	37,2	35,7	37,1	ND	35,5	35,94	ND	35,4
Probe #8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Probe #9	35,1	34,4	34,5	31,4	33,7	34,1	32,9	36,1	33,8
Probe #10	34,2	35,4	34,5	31,3	33,8	33,6	33,9	33,9	33,3
Probe #11	36,8	37,8	ND	39,3	35,5	35,8	36,8	35,2	ND
Probe #12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RT-PCR-Kontrolle (positiv)	29,5	29,9	27,2	24,5	27,2	29,5	27,9	31,1	25,5
RT-PCR-Kontrolle (negativ)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Negative Prozess-Kontrolle	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[ND = nicht detektiert]

Ergebnisse Ringversuch – HEV-spezifische Real-time RT-PCR



Zusammenfassung und Bewertung

Relative Spezifität	97,2 %
Relative Sensitivität	86,0 %
Relative Genauigkeit	90,0 %

- effizienter Matrixaufschluss → effiziente Virusfreisetzung
- relativ hohe HEV-Ausbeute/-Detektion im Vergleich zu anderen Methoden
- sehr geringe MS2-Wiederfindungsraten → Eignung für diese Methode?
- ✓ **erfolgreiche Validierung** der TRI®Reagent-basierten Methode zum Nachweis von HEV in Fleischprodukten
- ✓ Aufnahme der Methode in die „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach §64 LFGB
→ **L08.00-63 (Oktober 2016)**
- ✓ Anwendung: → Überwachungsstudien
→ Lebensmittelkontrolluntersuchungen (Routine & Ausbruchsgeschehen)
- ✓ Publikation → **Althof & Trojnar et al.:** „Interlaboratory validation of a method for hepatitis E virus detection in meat and meat products“
(@ *Food and Environmental Virology*)
- ✓ Erstellung einer ISO geplant, jedoch noch nicht realisiert

Danke an

- Arbeitsgruppe „Viren in Lebensmitteln“ (§64 LFGB)
- **Dr. Eva Trojnar** (Ringversuchsleitung, -Durchführung und -Auswertung)
- Ringversuchsteilnehmer:



**Landesbetrieb Hessisches
Landeslabor**
(*Dr. Thomas Böhm*)



**Landesamt für Verbraucherschutz
Sachsen-Anhalt**
(*Prof. Dr. Dietrich Mäde*)



**Landeslabor
Berlin-Brandenburg**
(*Dr. Sabine Burkhardt*)



**CONGEN
Biotechnologie GmbH**
(*Dr. Steffen Mergemeier*)



**Bundesinstitut für
Risikobewertung**
(*Prof. Dr. Reimar Johné*)



**Chemisches und
Veterinäruntersuchungsamt
Stuttgart**
(*Dr. Matthias Contzen*)



**Chemisches und
Veterinäruntersuchungsamt
Westfalen**
(*Dr. Jochen Kilwinski*)



**Bayrisches Landesamt
für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit**
(*Dr. Anja Carl*)



**Bundesamt für
Lebensmittelsicherheit
und Veterinärwesen Bern**
(*Dr. Dominik Moor*)

Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Dr. Nadine Althof

Bundesinstitut für Risikobewertung

Max-Dohrn-Str. 8-10 • 10589 Berlin

Tel. 030 - 184 12 - 0 • Fax 030 - 184 12 - 47 41

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de