

Inhibitorische Effekte von Fruchtsaft-Konzentraten auf das Screening von Lebensmittelassoziierten Viren mittels Reverse Transkriptase (RT) Real-Time PCR



Janine Beutlich, Jennifer Geister, Patrizia Eckelt, Steffen Mergemeier

CONGEN – Real-time PCR & Dienstleistung



Spezialist für
DNA/RNA Analysen



CONGEN Biotechnologie GmbH | Robert-Rössle-Str. 10 | 13125 Berlin
Telefon: 030 – 9489 3500 | Fax: 030 – 9489 3510 | Email: info@congen.de

- 55 CONGEN GmbH
- 14 Mensa
- 13 Gläsernes Labor
- 10 Bibliothek

Lebensmittelbedingte Ausbrüche in der EU

2013

→ Meldung von 5.193 lebensmittelbedingten Ausbrüchen
(43.183 humane Fälle; 5.946 Hospitalisierungen; 11 Tote)

Vergleich 2012:
Ausbrüche gesamt: 5363
Viren-assoziiert: 752 (14.02%)

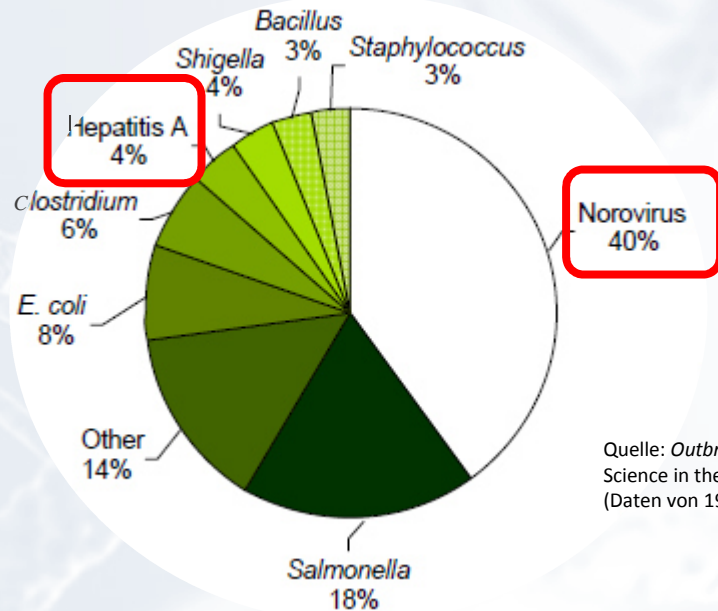
Table 27. Number of outbreaks and human cases per causative agents in food-borne outbreaks in the EU (including strong evidence water-borne outbreaks), 2013

Causative agent	Strong-evidence outbreaks					Weak-evidence outbreaks					Total outbreaks	Total %
	N	%	Cases	Hospitalised	Deaths	N	%	Cases	Hospitalised	Deaths		
Salmonella	315	37.54	4371	1134	3	853	19.58	4338	1033	2	1168	22.48
Viruses	87	10.37	2023	126	0	855	19.62	7568	1841	0	942	18.13
Bacterial toxins	208	24.79	4006	163	1	626	14.37	5197	289	0	834	16.05
Campylobacter	32	3.81	478	15	0	382	8.77	1314	131	0	414	7.97
Other causative agents	76	9.06	520	46	1	56	1.29	445	27	0	132	2.54
Other bacterial agents	14	1.67	213	25	3	66	1.51	688	84	0	80	1.54
Escherichia coli, pathogenic - Verotoxigenic E. coli (VTEC)	12	1.43	154	36	0	62	1.42	353	70	0	74	1.42
Parasites	24	2.86	243	128	0	17	0.39	67	6	0	41	0.79
Yersinia	1	0.12	2	0	0	7	0.16	14	2	0	8	0.15
Escherichia coli, pathogenic (excluding VTEC)	1	0.12	128	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02
Unknown	69	8.22	1386	138	1	1433	32.89	8454	652	0	1502	28.91
Total	839	100	13524	1811	9	4357	100	28438	4135	2	5196	100

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 162 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991

Infektionserreger lebensmittelbedingter Ausbrüche

Landwirtschaftliche Erzeugnisse (pflanzlich)

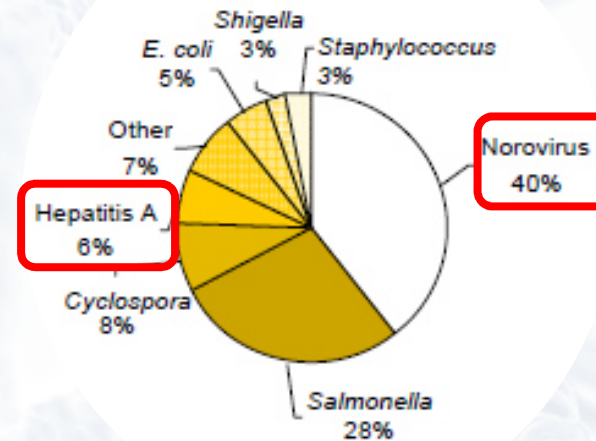


Quelle: *Outbreak Alert!* Center for Science in the Public Interest, 2007 (Daten von 1995-2005)

- WHO/FAO & OIE Expertenmeeting definierte Virus/Produkt-Kombinationen, die erhöhter Aufmerksamkeit bedürfen (Präventions-u. Kontrollmaßnahmen)
- ⇒ **NoV und HAV in Frischwaren**

(Viruses in Food: Scientific Advice to Support Risk Management Activities. Meeting Report Microbiological Risk Assessment Series, No. 13, 2009)

Fruit Outbreaks



- Kontaminationen (Bsp. Himbeeren):

- vor der Ernte (e.g. Berieselung mit fäkal-verunreinigtem Wasser)
- während der Ernte (e.g. infizierte Erntehelfer)
- während der Verarbeitung (e.g. infizierte Beschäftigte, Sprühwasser)

Ausbrüche

2012

- **NoV-Ausbruch** in Berlin, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen
- 11.000 assoziierte Erkrankungsfälle
(Größter bekannter lebensmittel-bedingter Ausbruch in D)
 - Ausbruchsursache: Tiefkühl-Erdbeeren

2013

- Multinationaler **HAV-Ausbruch** in Europa
- 1.444 assoziierte Erkrankungen
 - Ursache: Beeren und Beeren-Produkte



Hintergrund der Studie

- Geringe Viren-Konzentration in Lebensmitteln
- Geringe Infektionsdosis
- ⇒ Erfordert zuverlässige Detektion
- ➔ Methode der Wahl: RT real-time PCR (ISO 15216-2)

Aber: Hohe Konzentrationen bestimmter Lebensmittelbestandteile (z. B. Polysaccharide) wirken inhibitorisch

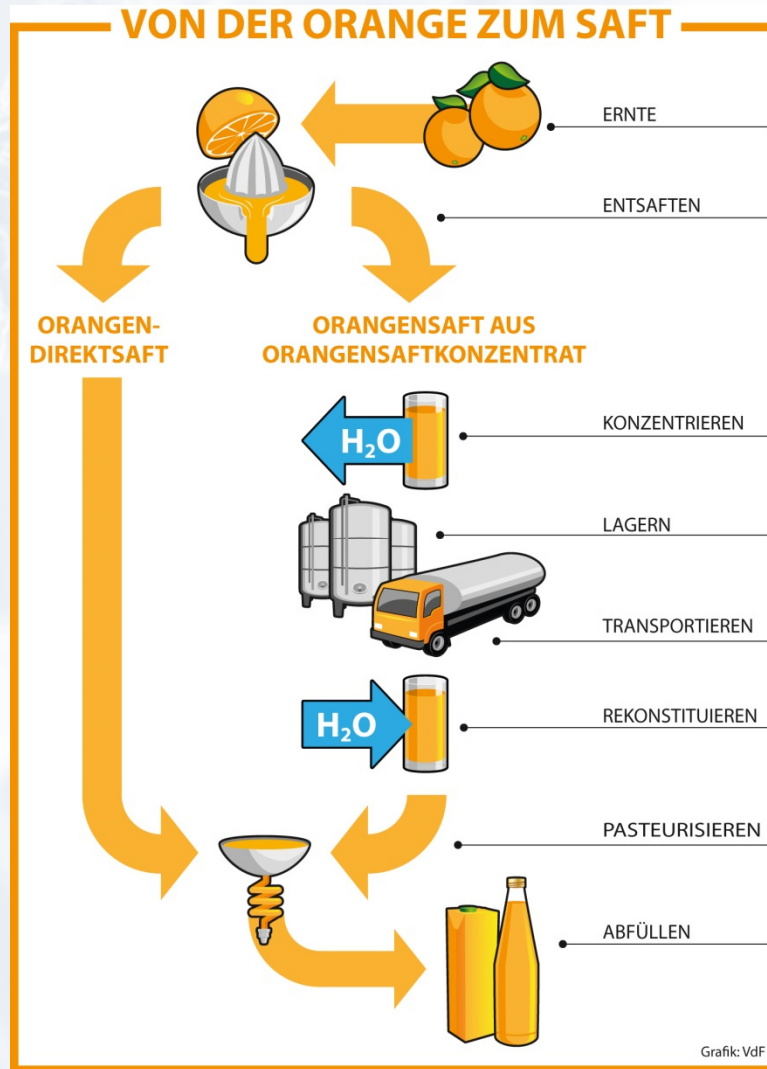
⇒ falsch negative Ergebnisse möglich



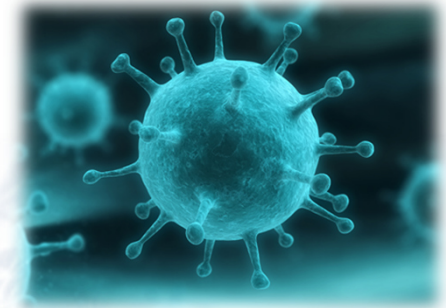
Ziel: Performance-Analyse von 19 Fruchtsaft-Konzentraten in RT real-time PCR Systemen zur Detektion von HAV and NoV

(Acerola, Ananas, Apfel, Erdbeere, Granatapfel, 2 x Heidelbeere, Himbeere, Holunderbeere, Kiwi, Mango, Melone, 2 x Orange, Papaya, Sauerkirsche, Süßkirsche, 2 x Zitrone)

Produktion von Fruchtsäften



Untersuchte Kit-Systeme



SureFast® Norovirus PLUS (2 plex):

- qualitativer Nachweis von Norovirus (Genogruppe I und II)
- Inkl. einer Extraktionskontrolle (Internal Control RNA; ICR), die auch als interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann.
- Verwendung auf allen gängigen real-time PCR Geräten möglich, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig im FAM und VIC Kanal detektieren können (z. B. Rotor-Gene Q, Agilent MxSeries, Roche LightCycler® 480, etc.)

SureFast® Norovirus / Hepatitis A 3 plex

- qualitativer Nachweis von Norovirus (Genogruppe I und II) und Hepatitis A
- Inkl. einer Extraktionskontrolle (Internal Control RNA; ICR), die auch als interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann.
- Verwendung auf allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig im FAM, VIC und Cy5 Kanal detektieren können (Rotor-Gene Q, Agilent MxSeries, Roche LightCycler® 480, etc.)

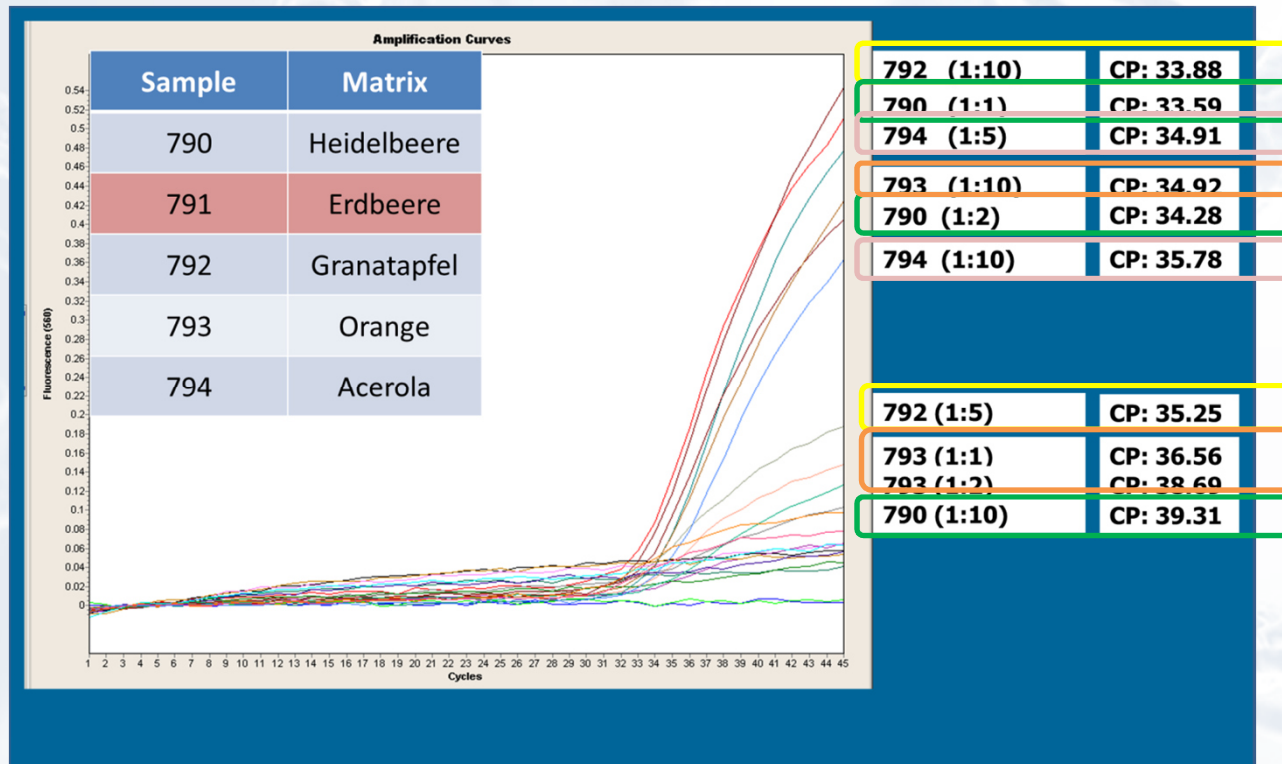
→ Zur Evaluierung möglicher inhibitorischer Effekte Fokus auf dem ICR-Nachweis!

Virusextraktion

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials:
 - Proben homogenisieren
 - 5 g Probe + 5 g Lysis Buffer
 - Zentrifugation 5 min @ 5.000 rpm (4°C)
 - Überstand abnehmen
 - Zugabe von 100 µl ICR
 - Zugabe von X mg Inhibitorenbinder
 2. Lyse (15 min @ 95°C)
 3. Zentrifugation ⇒ 5 ml Lysat + 5 ml Binding Buffer
 4. Überführen auf Spin Filter im 50 ml Falcon Tube ⇒ zentrifugieren
 5. Aufreinigung mittels Wash Buffer
 6. Elution der Nukleinsäure vom Spin Filter: – in 200 µl Elution Buffer
- direkter Einsatz in die RT real-time PCR

Versuch 1: Extraktion ohne Inhibitorenbinder

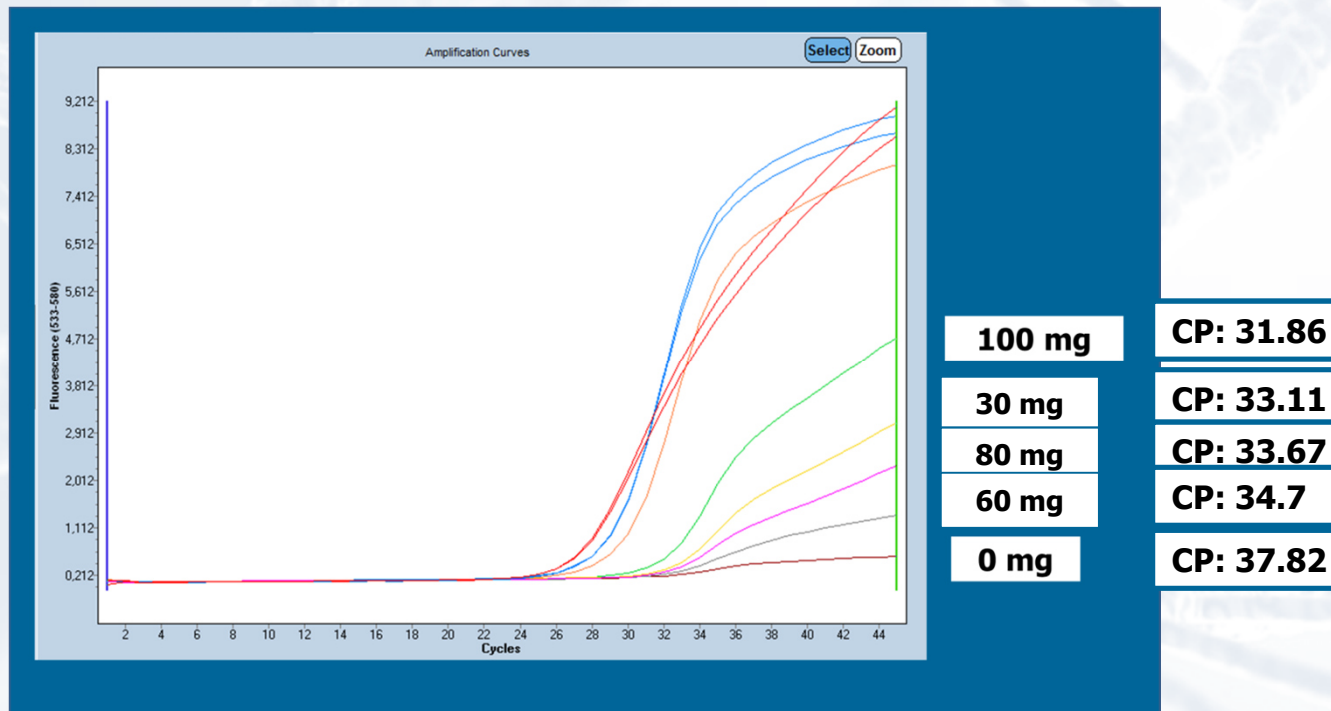
- System: SureFast[®] Norovirus PLUS (2 plex)
- Untersuchung von 5 Proben (Heidelbeere, Erdbeere, Granatapfel, Orange, Acerola)
- Verdünnung: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10



➔ ~ 50 % der Extrakte zeigten Inhibition

Versuch 2: Extraktion mit Inhibitorenbindern

- System: SureFast[®] Norovirus PLUS (2 plex)
- Untersuchung von Probe 794 (Acerola); unverdünnt
- Zugabe eines Inhibitorenbinders vor der Lyse (0, 30, 60, 80, 100 mg)



➔ Weniger bzw. gar keine Inhibition

Vergleich Extraktion mit/ohne Inhibitorenbinder

Ohne Inhibitoren			
Sample	Matrix	Δ CT	MS2 WFR (%)
792 1:10	Granatapfel	6.28	1.29
792 1:5		7.65	0.5
794 1:5	Acerola	7.31	0.63
794 1:10		8.18	0.34
790 1:1	Heidelbeere	5.99	1.57
790 1:5		6.68	0.98
790 1:10		11.71	0.03
793 1:10	Orange	7.32	0.63
793 1:1		8.96	0.2
793 1:5		11.09	0.05

Mit Inhibitoren			
Sample	Matrix	Δ CT	MS2 WFR (%)
794 (100)	Acerola	4.27	5.18
794 (80)		6.08	1.48
794 (60)		7.11	0.72
794 (30)		5.52	2.18
794 (0)		10.23	0.08

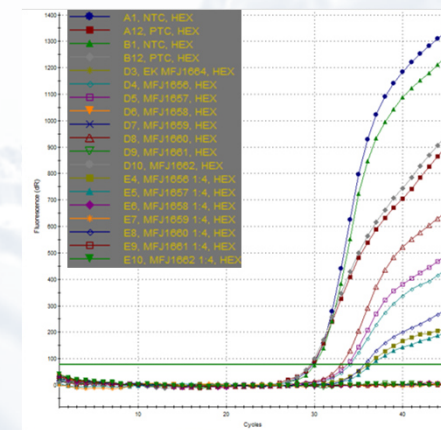
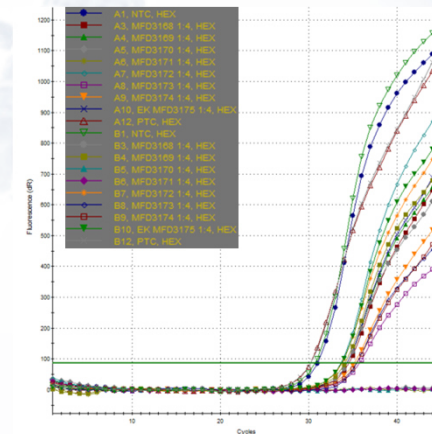
Formel für die Berechnung der WFR:

$$2^{-\Delta CT} \times 100 = \text{WFR in \%}$$

Versuch 3: Extraktion mit 100 mg Inhibitorenbinder

- System: SureFast[®] Norovirus/Hepatitis A 3 plex
- Untersuchung von 14 Proben (Ananas, Apfel, Heidelbeere, Himbeere, Holunderbeere, Kiwi, Mango, Melone, Orange, Papaya, Sauerkirsche, Süßkirsche, 2 x Zitrone)

Sample	Matrix	Cp-value		Cp-value		Cp-value	
		5g sample + 5g buffer	Dilution 1:4	2.5g sample + 7.5g buffer	Dilution 1:4	1g sample + 9g buffer	Dilution 1:4
3168	Orange	31.8	33.9	-	-	-	-
3169	Papaya	35.2	33.6	-	-	-	-
1649/56	Mango	33.6	35.6	-	-	-	-
1650/57	Melon	33.4	36.0	-	-	-	-
3170	Pineapple	34.3	neg.	-	-	-	-
1651/58	Raspberry	neg.	neg.	33.2	33.8	34.7	35.3
1652/59	Lemon	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3171	Lemon	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3172	Apple	33.1	33.1	-	-	-	-
1653/60	Sour cherry	32.8	35.3	-	-	-	-
3173	Sweet cheery	neg.	35.0	-	-	-	-
3174	Blueberry	32.9	34.6	-	-	-	-
1654/61	Elderberry	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
1655/62	Kiwi	neg.	neg.	neg.	neg.	35.4	37.8



Zusammenfassung

- Performance-Analyse von 19 Fruchtsaft-Konzentraten in RT real-time PCR Systemen zur Detektion von HAV and NoV
- 1. Studie dieser Art an dieser Matrix
- Fokus auf dem ICR-Nachweis zur Evaluierung möglicher inhibitorischer Effekte
- Ohne Inhibitorenbinder: 50% der Extrakte zeigen Inhibition
- Mit Inhibitorenbinder: weniger Inhibition
 - ⇒ bessere Analyseergebnisse
 - ⇒ bestes Ergebnis bei Zugabe von 100 mg Inhibitorenbinder

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Dr. Janine Beutlich

CONGEN Biotechnologie GmbH

Robert-Roessle-Str. 10 • 13125 Berlin, GERMANY

Tel. +49 30 – 9489 – 3500 • Fax +49 30 – 9489 – 3510

j.beutlich@congen.de • www.congen.de

