

Virusanalytik

Nachweis und Differenzierung von Noroviren aus Lebensmitteln

ARNT EBINGER, OLAF DEGEN
BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH, POTSDAM

Noroviruses (NoV) are the leading cause of non-bacterial gastroenteritis worldwide. Beside person-to-person transmission, food is considered as an important source of this viral infection. A novel Norovirus (GI, GII) plus Hepatitis A Virus Detection Kit (rRT-PCR) allows the simultaneous amplification and differentiation of NoV GI and II, hepatitis A virus and a process control virus in one reaction.

© Springer-Verlag 2017

■ Noroviren (NoV, Caliciviridae) sind die weltweit führende Ursache akuter Gastroenteritiden beim Menschen. Es existieren drei humanpathogene Genogruppen: GI, GII und GIV. Diese unterteilen sich wiederum in verschiedene Genotypen (neun für GI und 22 für GII) [1]. Der prädominante GII.4 ist

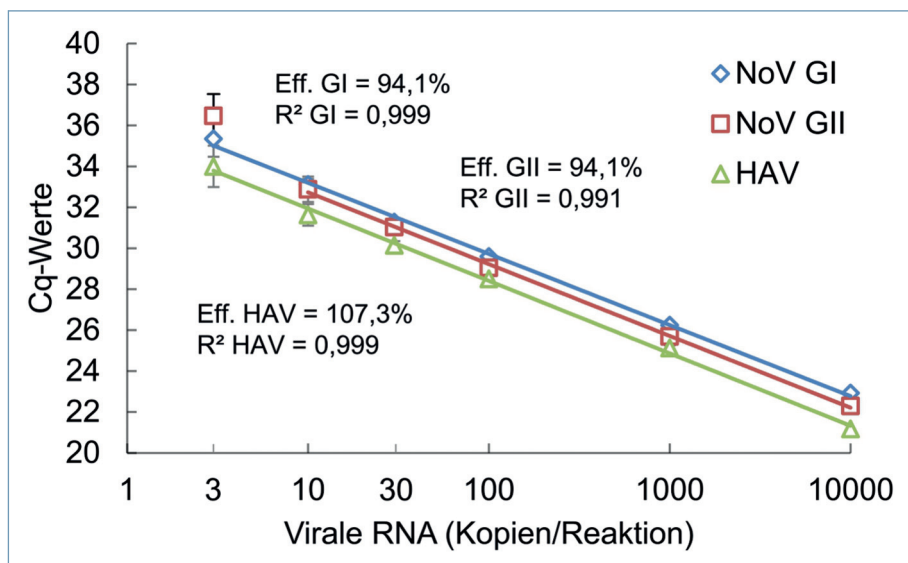
dabei für 70 bis 80 Prozent aller NoV-Infektionen verantwortlich [2]. Jährlich infizieren sich ca. 700 Millionen Menschen mit dem hochinfektösen Virus [3]. Vor allem für Ältere und Kleinkinder kann der akute Brech-Durchfall zu klinischen Komplikationen führen. NoV-Ausbrüche treten verstärkt in Kin-

dertagesstätten und Pflegeeinrichtungen auf. Neben der Transmission von Mensch zu Mensch rücken die Lebensmittel-assoziierten Infektionen immer stärker in den Fokus. Ein sehr prominenter Fall ereignete sich dabei 2012 in Deutschland mit bis zu 11.000 Erkrankten, zurückzuführen auf einen Import von kontaminierten Tiefkühl-Erdbeeren [4]. Laut einer Studie sollen sogar 14 Prozent aller NoV-Ausbrüche lebensmittelbedingt sein [5].

Neuer Multiplexansatz für die Norovirusanalytik

BIOTECON Diagnostics hat mit dem foodproof® Norovirus (GI, GII) plus Hepatitis A Virus Detection Kit einen neuartigen *one-step*-Assay auf Basis der Real-Time-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (rRT-PCR) entwickelt. Das Kit ermöglicht die simultane Amplifikation und Differenzierung von NoV GI und GII sowie dem Hepatitis-A-Virus (HAV) und einer integrierten Prozesskontrolle (MS2-Phage, PK) in vier unterschiedlichen Detektionskanälen (FAM, HEX, ROX, Cy5). Die PK erfasst dabei die Verluste der Zielviren, die an verschiedenen Stufen der Virusgewinnung und der RNA-Extraktion auftreten können. Die Verwendung einer PK ist gemäß ISO/TS 15216:2017 [6] obligatorisch. Die Primer- und Sondensequenzen im PCR-Kit sind ISO-konform.

Das Kit enthält insgesamt sechs Komponenten für 64 Reaktionen: Master-Mix, Enzymlösung, Prozesskontrolle, Kontroll-Template, Negativkontrolle und H₂O-PCR-Grade zur Verdünnung der RNA-Eluate. Für die Durchführung werden 14 Mikroliter Master-Mix und ein Mikroliter Enzymlösung pro Reaktion vermengt. Danach werden zehn Mikroliter der extrahierten RNA (foodproof® Sample Preparation Kit IV) zum PCR-Mix dazupipettiert und die Reaktion gestartet. Die Gesamtdauer der rRT-PCR beläuft sich auf gut zwei Stunden. Die Eigenschaften des Kits wurden in einer umfangreichen Validierungsphase evaluiert und in einem *Validation Data Report* [7] zusammengefasst. Die Nach-

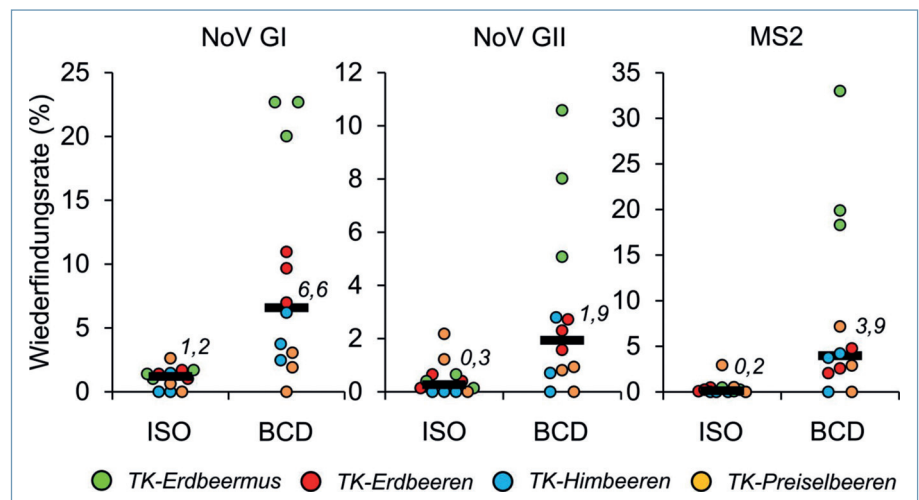


▲ **Abb. 1:** rRT-PCR-Standardreihe von Norovirus(NoV)-GI-, NoV-GII- und Hepatitis-A-Virus(HAV)-RNA. RNA wurde aus Stuhlproben und Zellkulturmaterial isoliert und mit einer DNA-Standardreihe quantifiziert. Die RNA-Konzentrationen wurden ausgehend von 10.000 Kopien auf die jeweiligen Stufen verdünnt und mit der Multiplex-rRT-PCR amplifiziert. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus zehn Replikaten plus Standardabweichung. R² (Bestimmtheitsmaß): Anteil der Variation in den Daten, die durch das vorliegende Regressionsmodell erklärt werden kann; Eff. (PCR-Effizienz): 100 % entspricht einer Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus.

weisgrenzen wurden mittels dekadischer Verdünnungsreihe mit quantifizierter viraler RNA ermittelt und liegen zwischen drei und zehn Kopien für NoV GI, GII und HAV [7] (**Abb. 1**). Somit ist ein Nachweis bis zur minimalen Infektionsdosis für NoV (≥ 18 Partikel) [8] und HAV (10–100 Partikel) [9] möglich. Die PK wird bis 1,6 PFU (*plaque-forming units*) pro Reaktion detektiert [7] und kann in Form einer Vier-Log-Stufen-Standardreihe für die Ermittlung der Wiederfindungsrate gemäß ISO/TS 15216:2017 (WFR, Viruslast vor und nach der Virusgewinnung und RNA-Extraktion) genutzt werden. Konstante Werte werden auch im Fall von Mischkontaminationen generiert. Der Anteil an Mischkontaminationen bei Lebensmittel-assoziierten NoV-Ausbrüchen wird auf 37 Prozent geschätzt [5]. Bei gleichzeitiger Amplifikation von NoV GI, GII, HAV und einer dotierten PK werden im Mittel die Mischkontaminationen mit dem Kit um nur ca. $-0,4$ Cq-Werte (*quantification cycle*) später detektiert als bei einer Einzelkontamination [7]. Die diagnostische Sensitivität wurde anhand verschiedener dotierter Matrices wie Tiefkühl-Weichobst, Hackfleisch, Muscheln und Trinkwasser ermittelt. Die Intra- und Interreproduzierbarkeit der PCR wurde mit 30 RNA-Kopien jeweils für NoV GI, GII und HAV auf sechs verschiedenen Real-Time-PCR-Geräten bestimmt, mit einer Gesamtvariation für GI von 0,8 Prozent, für GII von 1,1 Prozent und für HAV von 1,0 Prozent [7]. Das Kit eignet sich aufgrund der hohen Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Robustheit gegenüber inhibitionsreichen Matrices besonders gut für die Herausforderungen der NoV-Lebensmittelanalytik und liefert die Prozesskontrolle (MS2-Phage) gleich mit.

Virusgewinnung nach ISO/TS 15216

Für den Nachweis der NoV (und HAV) aus Tiefkühl-Weichobst existiert seit 2013 ein Protokoll, die ISO/TS 15216 [6]. Diese reglementiert die Methodik, bestehend aus Virusgewinnung, RNA-Extraktion und rRT-PCR. Die Virusgewinnung ist dabei eine labor- und zeitintensive Methode mit Wiederfindungsraten im Bereich von einem Prozent [4] und einem sehr hohen Inhibitionsgrad [10] für die rRT-PCR. Zunächst werden die Viren von der Matrixoberfläche mittels eines stark alkalischen Tris-Fleischextrakt-puffers (TGBE) eluiert, bei gleichzeitigem Pektinaseverdau. Die eluierten Viren werden dann mittels Proteinfällung (mit Polyethylenglykol, PEG) konzentriert, in PBS resuspendiert und mit Chloroform-Butanol gereinigt. Besonders zeit-



▲ **Abb. 2:** Virusgewinnung ISO/TS 15216 (ISO) versus Optimierung (BCD) mit unverdünnten Proben. Protokoll (ISO/BCD): Viruselution: 1 %/3 % TGBE-Puffer (pH 9,5/8,0); Pektinaseverdau: 25 °C bei pH 9,5/50 °C bei pH 6,0; Pelletresuspension: PBS/PBS und 9 % PVPP. Je drei Replikate pro Matrix und Methode. Der Zentralwert entspricht dem Median. Die Dotierung (NoV GI = 2.000 Kopien/25 g; NoV GII = 20.000 Kopien/25 g; MS2 = 10^6 PFU/25 g) erfolgte 24 Stunden vor der Analyse mit anschließender Lagerung bei -20 °C. Die Wiederfindungsraten (%) wurden berechnet nach [11]: $2^{-(Cq \text{ Probe} - Cq \text{ Inokulum/Prozesskontrolle})} \times 100$ (Cq, *quantification cycle*).

intensiv sind die pH-Wert-Anpassungen sowie die Inkubations- und Zentrifugationszeiten.

Das firmeneigene ISO-Protokoll zur Virusgewinnung beim neuen Kit optimiert nun die folgenden Punkte: pH-Wert-Reduktion des TGBE-Puffers auf pH 8, höhere Fleischextraktkonzentration (3 %) im TGBE-Puffer, separater Pektinaseverdau bei 50 °C und pH 6 sowie Pelletresuspension und Inkubation mit einem PBS/PVPP-Mix. Hierdurch konnten deutlich höhere Wiederfindungsraten erzielt werden, einhergehend mit einer Reduktion der Pelletgröße nach der PEG-Fällung und der Entfernung von PCR-Inhibitoren (Polyphenole) durch das PVPP. So konnten mit dem optimierten Protokoll 11/12 NoV GI und je 10/12 NoV GII und MS2 der dotierten, unverdünnten Tiefkühl-Beerenproben detektiert werden, mit WFR von 6,6 Prozent für NoV GI, 1,9 Prozent für NoV GII und 3,9 Prozent für MS2 (Median in Prozent; **Abb. 2**). Die Ergebnisse der ISO-Methode lagen bei 10/12 NoV GI und je 8/12 NoV GII und MS2, mit WFR von 1,2 Prozent für NoV GI, 0,3 Prozent für NoV GII und 0,2 Prozent für MS2. Die erhöhte Sensitivität und optimierte Methodik des neuen Protokolls führen daher zu einer verbesserten NoV-Analytik. ■

Literatur

[1] Kroneman A, Vega E, Vennema H et al. (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158:2059–2068

- [2] de Graaf M, van Beek J, Vennema H et al. (2015) Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 area? *Euro Surveill* 20 (<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>)
- [3] Centers for Disease Control and Prevention, Norovirus Worldwide – Global Trends, <https://www.cdc.gov/norovirus/worldwide.html>
- [4] Mäde D, Trübner K, Neubert E et al. (2013) Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. *Food Environ Virol*, doi: 10.1007/s12560-013-9118-0
- [5] Verhoef L, Hewitt J, Barclay L et al. (2015) Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. *Emerg Infect Dis* 21:592–599
- [6] International Organization for Standardization (2017) ISO/TS 15216-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR, <https://www.iso.org/standard/65681.html>
- [7] Ebinger A (2017) foodproof Norovirus (GI, GII) plus Hepatitis A Virus Detection Kit, R 302 50. Validation Data Report, <http://www.bc-diagnostics.com>
- [8] Teunis PF, Moe CL, Liu P et al. (2008) Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80:1468–1476
- [9] Venter JM, van Heerden J, Vivier JC et al. (2007) Hepatitis A virus in surface water in South Africa: what are the risks? *J Water Health* 5:229–240
- [10] Bartsch C, Szabo K, Dinh-Thanh M et al. (2016) Comparison and optimization of detection methods for noroviruses in frozen strawberries containing different amounts of RT-PCR inhibitors. *Food Microbiol* 60:124–130
- [11] Scherer K, Mäde D, Ellerbroek L et al. (2009) Application of a Swab Sampling Method for the Detection of Norovirus and Rotavirus on Artificially Contaminated Food and Environmental Surfaces. *Food Environ Virol* 1:42

Korrespondenzadresse:

Arnt Ebinger
BIOTECON Diagnostics GmbH
Hermannswerder 17
D-14473 Potsdam
Tel.: 0331-2300-235
Fax: 0331-2300-299
aebinger@bc-diagnostics.com
www.bc-diagnostics.com