

# Reverse-Transkription-Real-Time-PCR

## Eine biochemische Methode zum Schnellnachweis von Hepatitis-E-Viren

Erika Lorenzen, Janine Beutlich, Jennifer Geister und Steffen Mergemeier

Das Robert Koch-Institut (RKI) verzeichnet seit einigen Jahren einen starken Anstieg an Hepatitis-E-Virus(HEV)-Erkrankungen in Deutschland. In 2015 wurden 1264 Fälle gemeldet und für 2016 wurden bereits 1991 HEV Fälle registriert [1]. Weltweit werden jährlich 20 Millionen HEV-Infektionen und 57 000 HEV-bezogene Todesfälle verzeichnet [2].



Erika Lorenzen

### Zur Person

Dipl.-Oecotrophologin, seit 2010 im Bereich Marketing & Vertrieb bei der CONGEN Biotechnologie GmbH tätig 

Besonders in Entwicklungsländern ist HEV eine der Hauptursachen für endemische Hepatitis-Infektionen – häufig durch kontaminiertes Trinkwasser. HEV galt bisher in Deutschland als reiseassoziierte Krankheit. In den letzten Jahren ist jedoch in Deutschland eine stetige Zunahme der gemeldeten HEV-Fälle zu beobachten, die überwiegend auf Infektionen ohne Reisehintergrund zurückzuführen sind. Verschiedene Übertragungswege über Reserviertiere (Schweine, Wildschweine) sind bekannt (siehe Abb. 1).

Der Verzehr von rohen oder nicht genügend erhitzten Schweinefleischprodukten wurde als erhöhtes Risiko für eine HEV-Infektion identifiziert [3–5].

Derzeit gibt es keinen Impfstoff gegen HEV. Nach einer Inkubationszeit von 2–7 Wochen treten Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Gelbsucht und Hepatitis auf. Meist ist der Krankheitsverlauf moderat. Es gibt aber auch schwere Verläufe bei Schwangeren und Personen mit Vorerkrankungen der Leber. Bei Transplantationspatienten sind chronische Verläufe bis hin zur Leberzirrhose möglich.

### Hepatitis-E-Virus

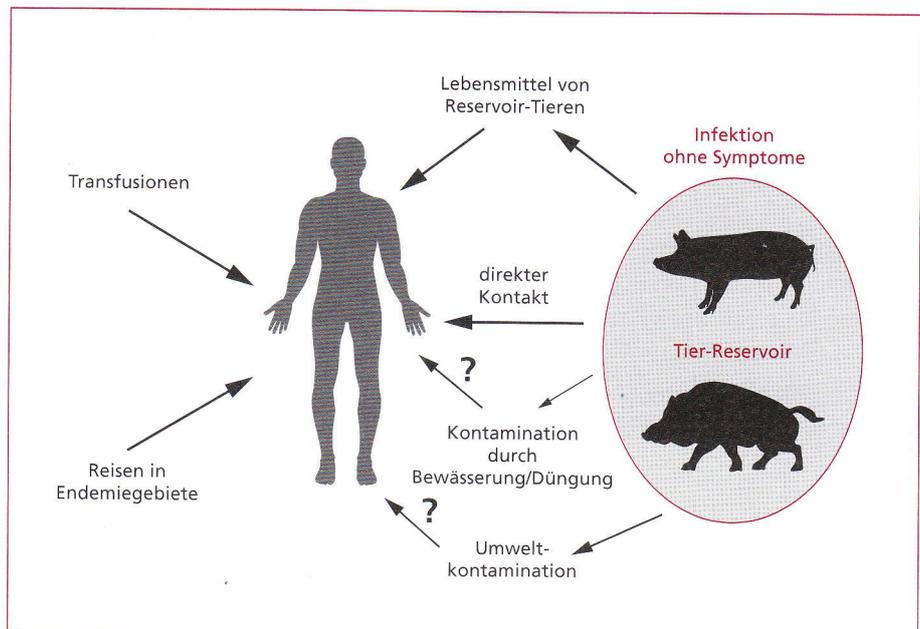
HEV ist ein kleines, nicht-umhülltes Plusstrang-RNA-Virus. Es wird klassifiziert als Mitglied der Familie *Hepeviridae*, Unterspezies *Orthohepevirus A*. Innerhalb der Gattung *Orthohepevirus A* gibt es die Genotypen (gt) 1–4 und den Genotyp 7, welche nachweislich Menschen infizieren. Gt-1-Viren wurden hauptsächlich von Ausbrüchen in Asien und Afrika isoliert, wohingegen gt-2-Stämme in Mexiko und Afrika gefunden wurden. Diese Genotypen wurden ausschließlich beim Menschen diagnostiziert.

Im Gegensatz dazu wurden gt 3 und 4 als Zoonoseerreger in verschiedenen Tierarten und vereinzelt in humanen Fällen gefunden. Gt 7 wurde in Kamelen identifiziert sowie in Menschen, die regelmäßig Kamelfleisch verzehren und Kamelmilch trinken [6].

HEV konnte in Schweinefleischprodukten (Leber, Würste) in verschiedenen Ländern nachgewiesen werden [7,8]. Besonders Leberwurst enthält hohe HEV-Konzentrationen. Eine Routineanalytik

der Risiko-Lebensmittel wie Leberwurst und Rohwurst ist erforderlich, um die Verbraucher vor Erkrankungen zu schützen.

Die Reverse-Transkription(RT)-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eignet sich zur Diagnostik von HEV, da direkt die RNA detektiert wird. Im Rahmen der § 64-LFGB-Arbeitsgruppe „Viren in Lebensmitteln“ wurde kürzlich eine offizielle RT-Real-Time-PCR-Methode veröffentlicht: L08.00-63 – Qualitativer Nachweis von Hepatitis-E-Viren in Fleischerzeugnissen mittels Real-Time-PCR. Diese Methode wurde zusätzlich in einem Ringversuch mit neun Laboren getestet. Neben der offiziellen § 64-LFGB-Methode hat CONGEN eine spezifische und sensitive qualitative RT-Real-Time-PCR-Methode entwickelt, die einen schnellen und sicheren Nachweis von HEV in Le-



**Abb. 1** Übertragungswege von HEV (Quelle: [www.bfr.bund.de/cm/343/hepatitis-e-in-deutschland-aktuelle-situation-neue-erkenntnisse-und-empfehlungen-aus-arki-und-bfr-teil-2.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/hepatitis-e-in-deutschland-aktuelle-situation-neue-erkenntnisse-und-empfehlungen-aus-arki-und-bfr-teil-2.pdf))

## Preisausschreibung

### Eppendorf Award 2018

Vom **1. Oktober 2017 bis zum 15. Januar 2018** können sich in Europa tätige promovierte junge Forscherinnen und Forscher bis zu 35 Jahren für den Eppendorf Award for Young European Investigators bewerben. Dieser international hoch angesehene, mit 20000 € dotierte Preis honoriert auf molekularbiologischen Methoden beruhende herausragende Leistungen auf dem Gebiet der biomedizinischen Forschung.

Eine unabhängige Jury unter Vorsitz von Reinhard Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) entscheidet über die Vergabe des Eppendorf Awards 2018.

Der/die Preisträger/in erhält:

- ein Preisgeld in Höhe von 20000 EUR
- eine Einladung zur feierlichen Preisverleihung am EMBL Advanced Training Centre in Heidelberg am 21. Juni 2018
- eine Einladung zur Eppendorf AG nach Hamburg
- eine Veröffentlichung in Nature sowie in einem Nature-Podcast

Ausführliche Informationen zum Eppendorf Award for Young European Investigators, zu den Auswahlkriterien sowie zu den seit 1995 ausgezeichneten Preisträgern sind unter:

[www.eppendorf.com/award](http://www.eppendorf.com/award)  
zu finden.

Es werden ausschließlich Online-Bewerbungen akzeptiert. Das Online-Bewerbungsportal [www.eppendorf.com/award/application](http://www.eppendorf.com/award/application) steht ab dem 1. Oktober 2017 zur Verfügung.

Der Eppendorf Award for Young European Investigators wird in Zusammenarbeit mit Nature verliehen.



## Labor und mehr

### ■ Für die tägliche Laborarbeit

Anton Paar hat die Rheometer-Serie durch die Geräte MCR 72 und MCR 92 erweitert. Mit diesen Geräten können Fließverhalten, Deformationsverhalten und Struktur einer Probe schnell und einfach ermittelt werden. Beide Systeme sind für die täglichen Labortätigkeiten optimiert. MCR 72 ist mit einem kugelgelagerten Motor ausgestattet und dadurch sehr robust in der Handhabung. Außerdem ist keine komprimierte Luft erforderlich. MCR 92 besitzt einen luftgelagerten Motor und eignet sich für sehr sensible Proben.

www.anton-paar.com

bensmitteln ermöglicht. Der Test ist mit einer Extraktionskontrolle (Internal Control RNA, ICR) ausgestattet, die gleichzeitig auch als interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann.

### RNA-Extraktion aus Leberwurst und Leberpastete

Zur Extraktion der Nukleinsäuren werden 3 g der Probe in ein 15-mL-Tube überführt und 2,4 mL Abspülpuffer hinzugegeben. Nach kräftigem Vortexen (ca.

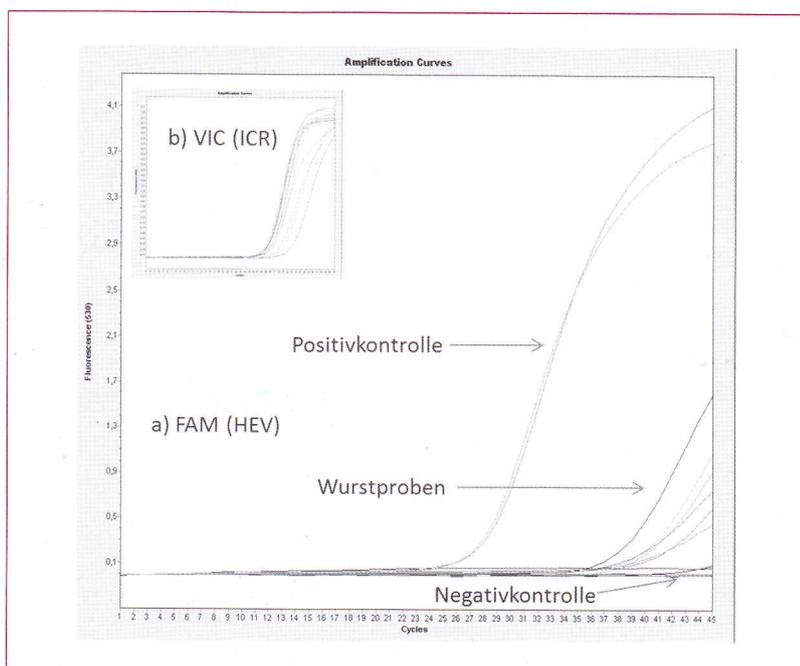
1 min) wird die Probe bei 5000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Durch diesen Vorgang sollte sich eine erkennbare Phasentrennung ergeben. Vom flüssigen Überstand werden 400 µL entnommen und bei 65 °C für 15 min in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wird die Probe 10 min bei 95 °C im Thermomixer unter kontinuierlichem Schütteln lytiert. Nach Zugabe des Binding Buffers erfolgt die Bindung der Nukleinsäuren an einen Spinfilter. Zur Aufreinigung der Nukleinsäuren folgen dann mehrere Waschschritte und in einem letzten Schritt werden die Nukleinsäuren dann vom Spinfilter eluiert. Die gewonnene RNA kann direkt in die RT-Real-Time-PCR eingesetzt werden.

### Ergebnisse der RT-Real-Time-PCR

Der Nachweis von HEV erfolgt im One-Step-RT-Real-Time-PCR-Format, d. h. die reverse Transkription und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte HEV-RNA wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für HEV spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels Real-Time-PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen.

Die extrahierte RNA von insgesamt fünf Proben wurde im Original und in 1:10-Verdünnung in der RT-Real-Time-PCR gemessen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (NTC) und eine Positivkontrolle (PTC) zur Überprüfung der PCR-Reaktion untersucht. Das entwickelte RT-Real-Time-PCR-System kann auf allen gängigen Real-Time-PCR-Cyclern eingesetzt werden. Im FAM-Kanal wird HEV-RNA und im VIC-Kanal wird die ICR detektiert (siehe Abb. 2).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der auf HEV untersuchten Lebensmittel im CONGEN-Servicelabor.



**Abb. 2** Amplifikationskurven für den Nachweis von HEV auf dem Roche Light-Cycler® 2.0; a) FAM-Kanal: Nachweis von HEV, b) VIC-Kanal: Nachweis der ICR

**Tab. 1 RT-Real-Time-PCR-Ergebnisse der untersuchten Lebensmittelproben**

Extraktion	Proben	Verdünnung	Cp FAM – Hepatitis E	Cp VIC – ICR	
		NTC	negativ	28,7	
SureFast® PREP DNA/RNA Virus	–	Extraktionskontrolle	negativ	28,8	
	Leberpastete Probe 1	Probe 1; 1:10	40,6	30,2	
		Probe 1; Original	negativ	34,3	
	Leberwurst Probe 2	Probe 2; 1:10	37,4	29,7	
		Probe 2; Original	neg	32,3	
	Leberwurst Probe 3	Probe 3; 1:10	39,1	29,7	
		Probe 3; Original	39,6	34,0	
	Leberwurst Probe 4	Probe 4; 1:10	40,2	29,5	
		Probe 4; Original	negativ	31,2	
	Leberwurst Probe 5	Probe 5; 1:10	negativ	29,0	
		Probe 5; Original	39,0	29,7	
			PTC	26,6	28,3

NTC: Negativkontrolle; EK: Extraktionskontrolle; PTC: Positivkontrolle

### Fazit

Die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener HEV kontaminierter Leberwurstproben und einer Leberpastete zeigen, dass HEV mit dem neu entwickelten Verfahren zuverlässig und sicher nachweisbar ist. Einige Proben waren im Original negativ, zeigten aber im VIC eine deutliche Cp-Verschiebung im Vergleich zur Negativkontrolle, was auf eine Inhibition hindeutet. Diese konnte aber durch Messung einer 1:10-Verdünnung eliminiert werden. Die Inhibition ist auf die stark fetthaltige Lebensmittelmatrix zurückzuführen. Bei solchen Proben ist es grundsätzlich empfehlenswert eine Verdünnung (1:5, 1:10) in der PCR einzusetzen, um einen zuverlässigen Nachweis zu gewährleisten.

### Literatur

[1] RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016; Robert-Koch-Institut (2016); online unter: [www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2016.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2016.pdf?__blob=publicationFile); letzter Zugriff 25.10.2017.

[2] WHO: Hepatitis E fact sheet; online unter: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/); letzter Zugriff 25.11.2017.

[3] Colson P et al.: Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* **202**, 825–834 (2010).

[4] Hewitt PE et al.: Hepatitis E virus in blood components: A prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet* **384** (9956), 1766–1773 (2014).

[5] Said B et al.: Hepatitis E virus in England and Wales: Indigenous infection is associated with the consumption of processed pork products. *Epidemiol Infect* **142**, 1467–1475 (2014).

[6] Lee G-H et al.: Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver-transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology* **150**, 355–357 (2016).

[7] Berto A et al.: Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* **19**, 264–266 (2013a).

[8] Di Bartolo I et al.: Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* **18**, 1282–1289 (2012). ■

Die Reverse-Transkription(RT)-Real-Time-PCR ist für den sicheren Nachweis von Hepatitis-E-Viren in Leberwurst und Leberpastete sehr gut geeignet.

### Kontakt

**Erika Lorenzen**  
 CONGEN Biotechnologie GmbH  
 Robert-Roessle-Str. 10  
 13125 Berlin  
 e.lorenzen@congen.de  
 www.congen.de