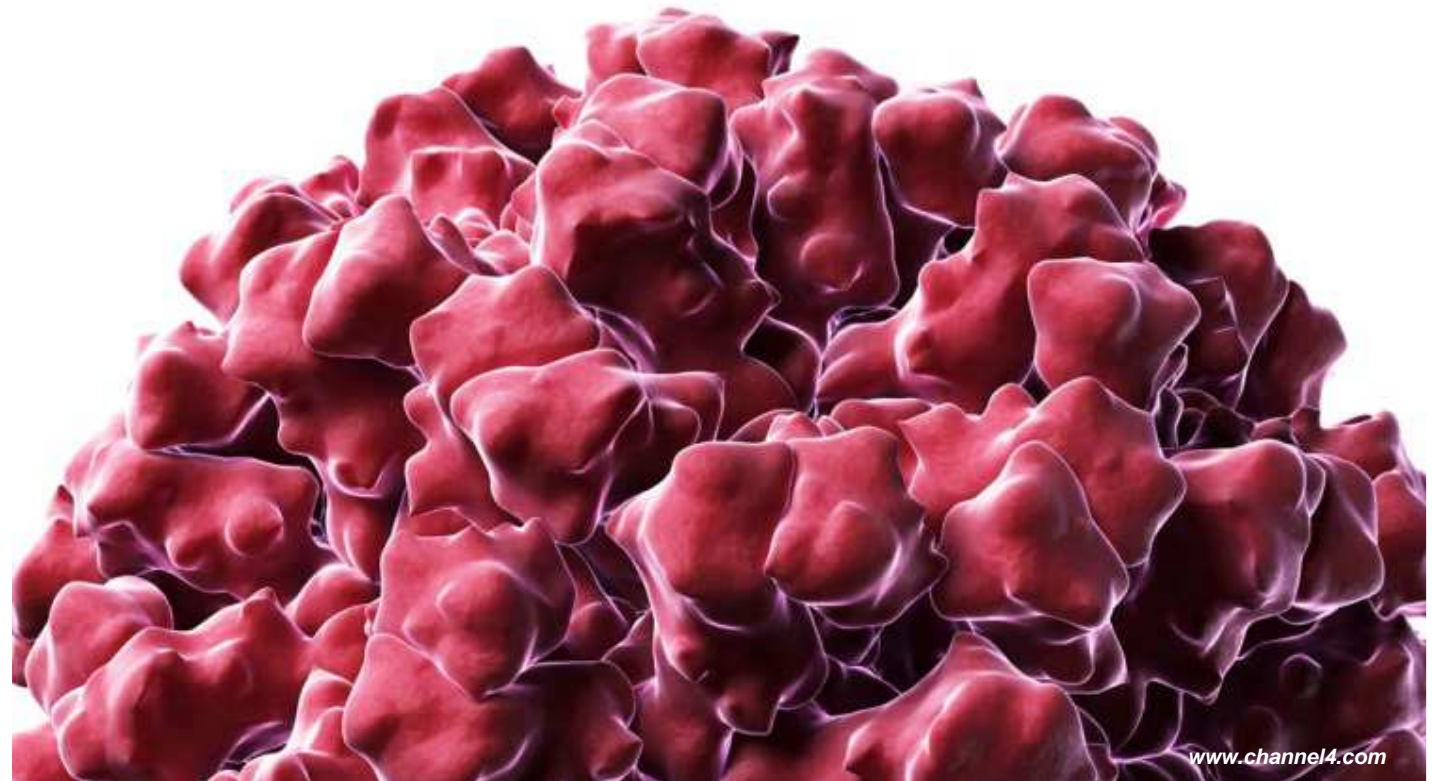




# Multiplex-PCR zur Differenzierung humanpathogener Noroviren in Lebensmitteln

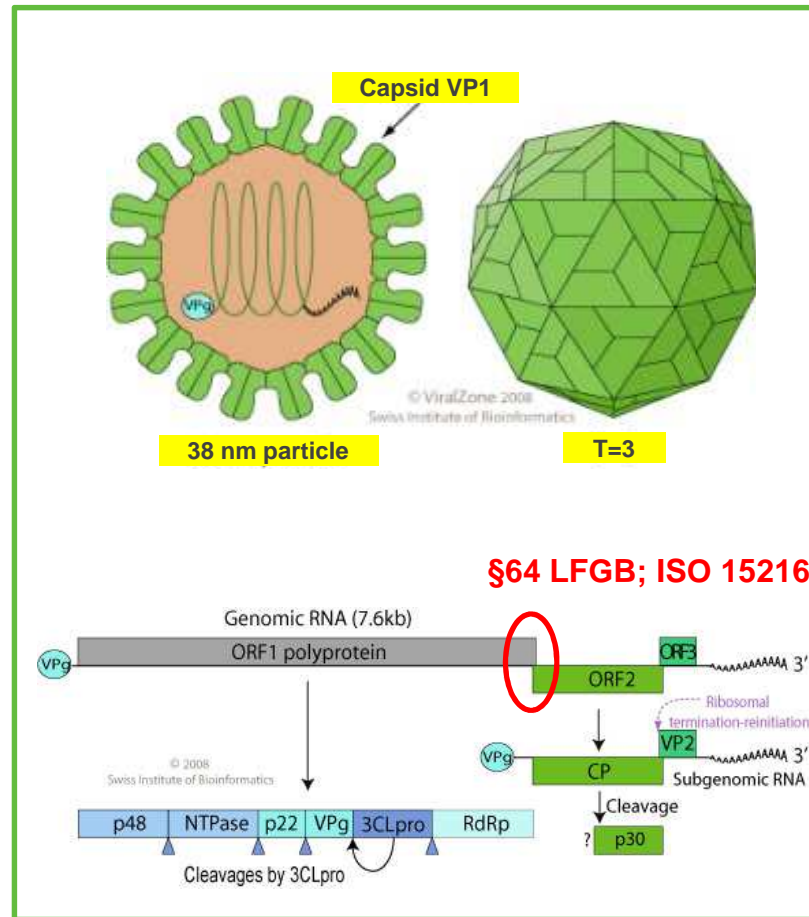
Arnt Ebinger



[www.channel4.com](http://www.channel4.com)

# Noroviren

- Führende Ursache akuter Gastroenteriden
- Infektiösität < 100 Partikel
- Familie: *Caliciviridae* (+ssRNA-Virus)
- Hohe Genomvariabilität:
  - ❖ 7 Genogruppen (GI – GVII)
  - ❖ GI, GII & GIV sind humanpathogen und unterteilt in jeweils mind. 7 – 12 Genotypen
- ORF1-ORF2 Junction konservierter Bereich





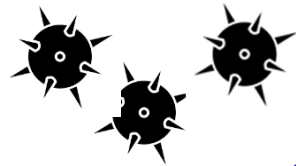
## Noroviren in Lebensmitteln

- 14% aller LM-assoziierten Ausbrüche weltweit (1999 – 2015; Verhoef *et al.* 2015)
- Muster der prädominanten Genotypen
  - GI: Lebensmittel → Mensch
  - GII.4: Mensch → Mensch (60 – 80 %)
- Komplexe Virus-Konzentrationsverfahren:
  - ❖ geringe Wiederfindungsraten
  - ❖ inhibitionsreiche Matrices
  - ❖ virale Prozesskontrollen essentiell



## foodproof Norovirus - Analysenablauf

### Virus-Aufkonzentrierung



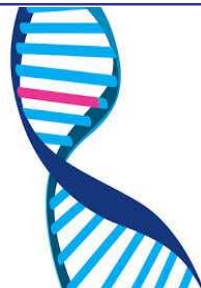
gemäß ISO 15216-Protokollen  
 je nach Matrix:  
 Proteinfällung;  
 Filtration;  
 Proteinase K-Verdau

### RNA-Extraktion



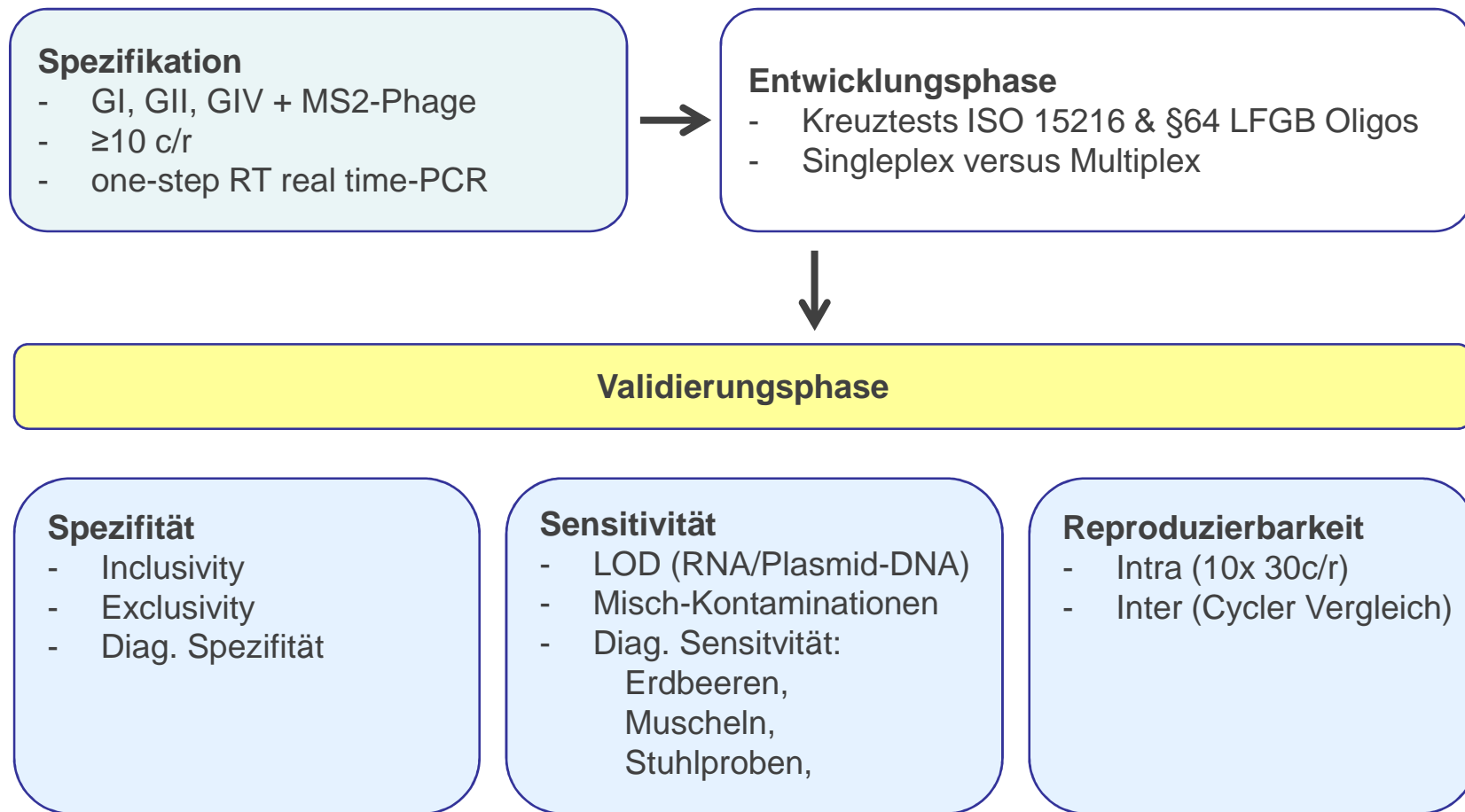
**foodproof Virus Sample Preparation Kit**  
 (Silica basiert)

### Multiplex-PCR



**foodproof Norovirus Detection Kit**  
 RT-PCR  
 3 Ergebnisse in einer Reaktion (GI, GII, MS2)  
 Zeitersparnis bei hoher Probenanzahl  
 weniger Probenmenge nötig

## Design of Experiments





## Spezifität - Inklusivität

- Norovirus Reference Panel RIVM Niederlande (synthetische RNA)
- In-silico (BLAST) Analysen/Alignments



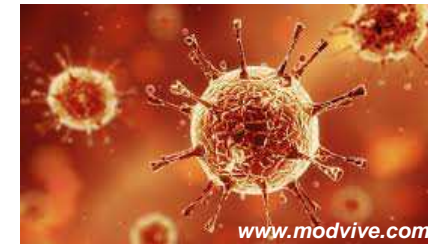
Group	Strain	Genotype	foodproof Norovirus Detection Kit		
			GI [HEX]	GII [FAM]	PC [ROX]
GI	Norwalk	I.1	+	-	-
	Whiterose	I.2	+	-	-
	Southampton	I.2	+	-	-
	Birmingham	I.3	+	-	-
	Malta	I.4	+	-	-
	Musgrove	I.5	+	-	-
	Mikkeli	I.6	+	-	-
	Winchester	I.7	+	-	-
	Boxer	I.8	+	-	-
GII	Hawaii	II.1	-	+	-
	Melksham	II.2	-	+	-
	Toronto	II.3	-	+	-
	Grimsby	II.4	-	+	-
	Seacroft	II.6	-	+	-
	Leeds	II.7	-	+	-
	Erfurt	II.4	-	+	-
	GII b	II.3	-	+	-
	GII c	II.1	-	+	-
GIV	Alphatron	IV	+	+	-





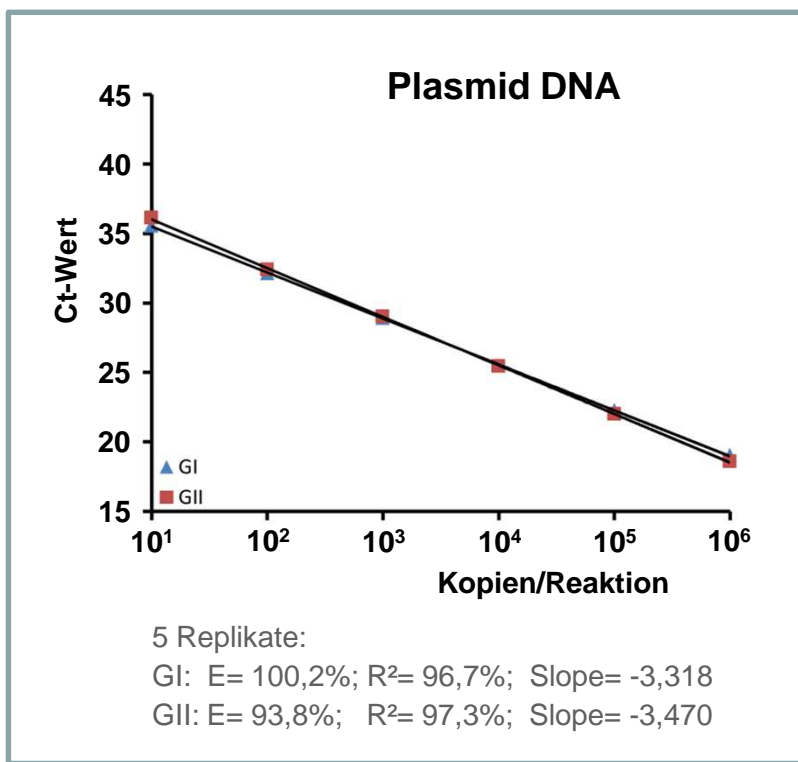
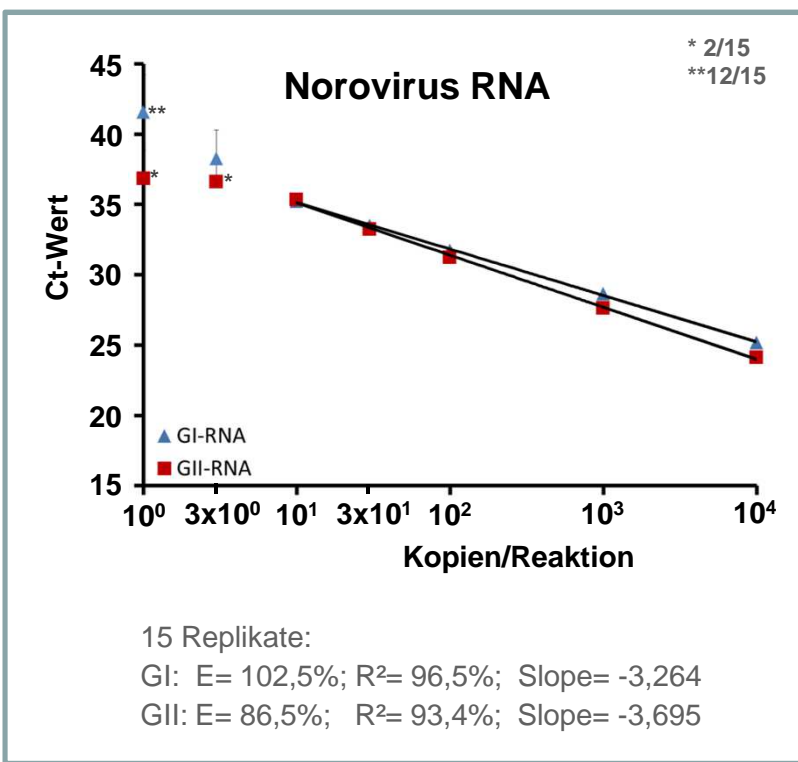
## Spezifität - Exklusivität

- Exklusivität → Virusisolate
- Diagnostische Spezifität → Stuhlproben (gesunde Personen)
- In-silico (BLAST) Analysen/Alignments



Family	Species	foodproof Norovirus Detection Kit		
		GI [HEX]	GII [FAM]	PC [ROX]
<i>Adenoviridae</i>	<i>Adenovirus type 5</i>	-	-	-
<i>Arteriviridae</i>	<i>Porcine respiratory and reproductive syndrome 1</i>	-	-	-
	<i>Porcine respiratory and reproductive syndrome 2</i>	-	-	-
<i>Caliciviridae</i>	<i>Murine norovirus</i>	-	-	-
	<i>Feline calicivirus</i>	-	-	-
<i>Coronaviridae</i>	<i>Transmissible gastroenteritis coronavirus</i>	-	-	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Bovine viral diarrhea virus 1</i>	-	-	-
<i>Leviviridae</i>	<i>Bacteriophage MS2</i>	-	-	+
<i>Picornaviridae</i>	<i>Poliovirus serotype 1</i>	-	-	-
<i>Reoviridae</i>	<i>Mammalian orthoreovirus 1</i>	-	-	-
	<i>Rotavirus A</i>	-	-	-

# Limit of Detection

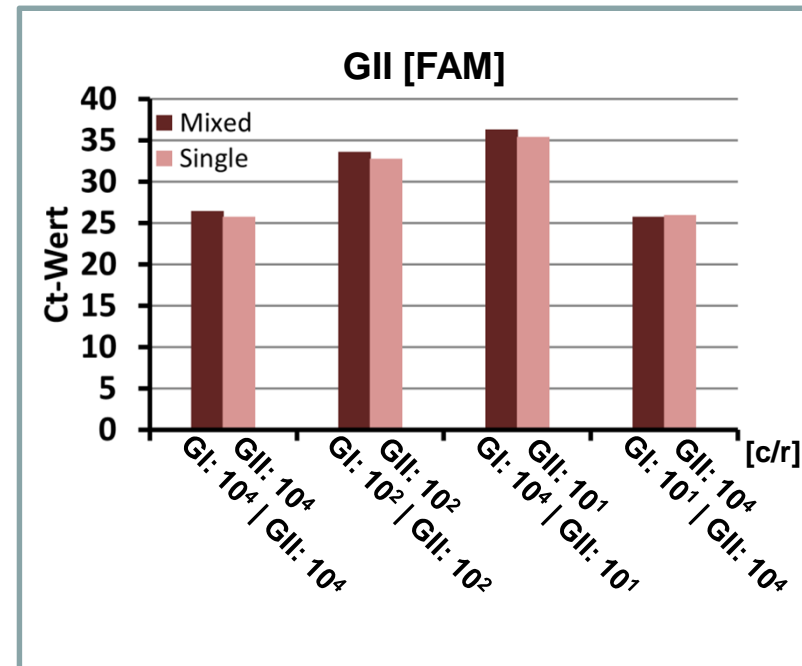
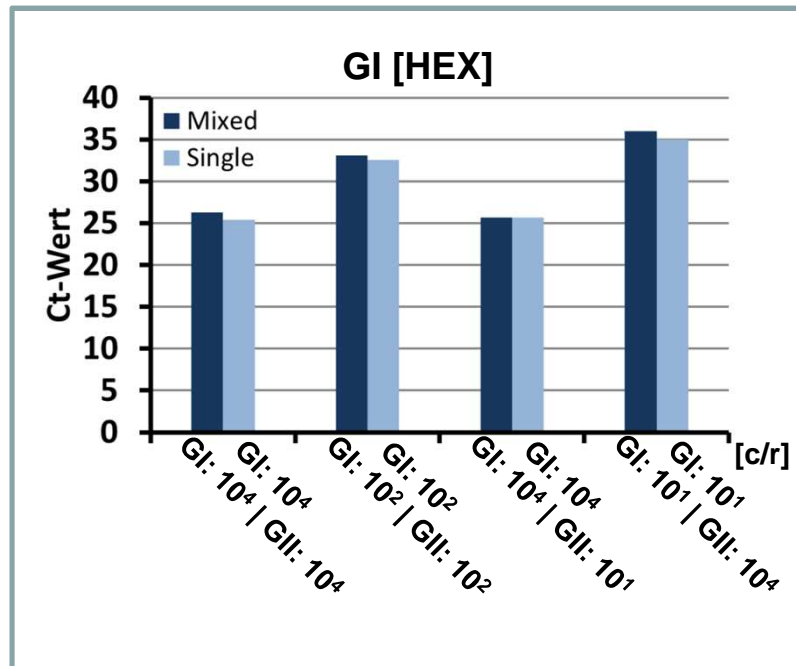


- **LOD für GI und GII → 10 c/r**
- **Inter-/Intra-Assay CV (%; 30c/r RNA): GI= 0,8 GII= 1,0%**

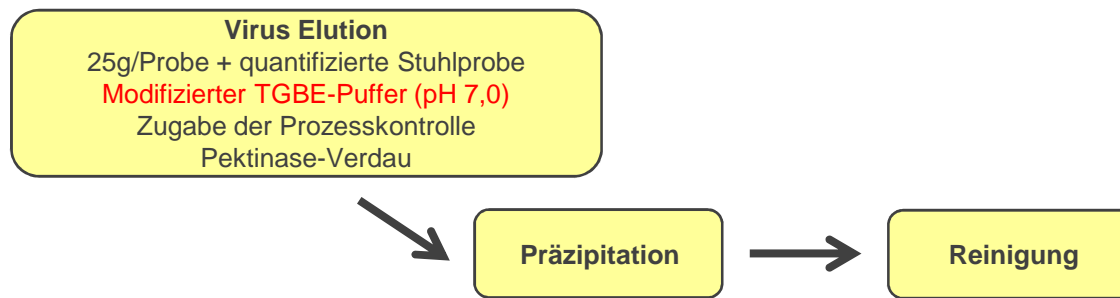


## Einfluss von Misch-Kontaminationen

- 37% aller LM-assoziierte Norovirus Ausbrüche sind Mischinfektionen (Verhoef *et al.* 2015)
- Quenching Effekte in der Multiplex-PCR?
  - ❖ Keine falsch-negativen Ergebnisse im Bereich der LOD
  - ❖ Geringer Effekt erkennbar ( $\Delta Ct = 0,5 - 1$ )



## Diagnostische Sensitivität: TK-Erdbeeren



### PCR Results:

Norovirus	Mean Ct <sub>Samples</sub>	Mean Ct <sub>Recover Control</sub>	Recovery Rates	
			Min	Max
GI [HEX]	32.6 ± 1.5	27.8 (1800 c/r)	0.9 %	14.4 %
GII [FAM]	34.9 ± 0.6	29.3 (1000 c/r)	1.6 %	3.4 %

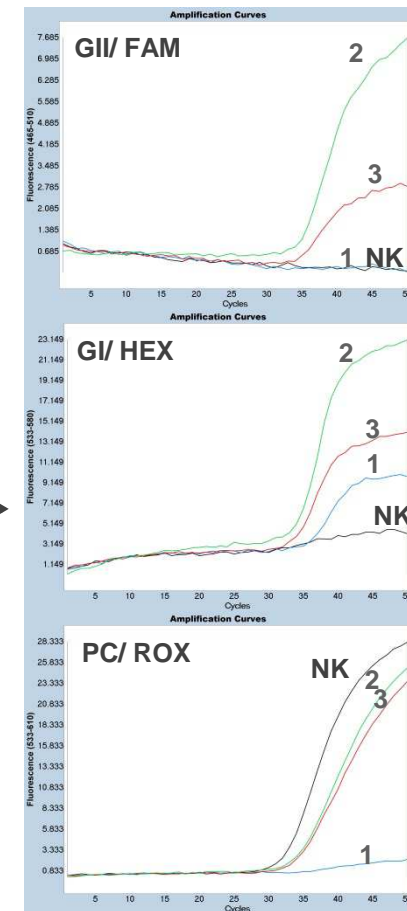
- Inhibition bei unverdünnten Extrakten: GI= 0/6, GII= 3/6
- Inhibition bei 1:10 verdünnten Extrakten: GI= 0/6, GII= 1/6
- Hohe Variation bei der Virus-Aufkonzentrierungs-Methode
- Wiederfindungsraten von ~ 1 – 10%

## TK-Erdbeeren: Ausbruch 2011 Deutschland

- Vergleich TGBE-Puffer pH 9,5 und pH 7,0
- Unverdünnte Proben getestet

TGBE-Puffer	Probe	FAM GII	HEX GI	ROX Process Control
pH 7.0	1	-	38.84	40.86
	2	35.37	37.73	32.10
	3	37.34	35.92	32.87
	4	-	-	-
	5	35.48	-	34.99
	NK	-	-	30.49
pH 9.5	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	-	-	-
	9	-	-	-
	10	-	-	-
	NK	-	-	29.35

pH 7,0



**Sensitivitätsanstieg mit TGBE-Puffer (pH 7,0)**

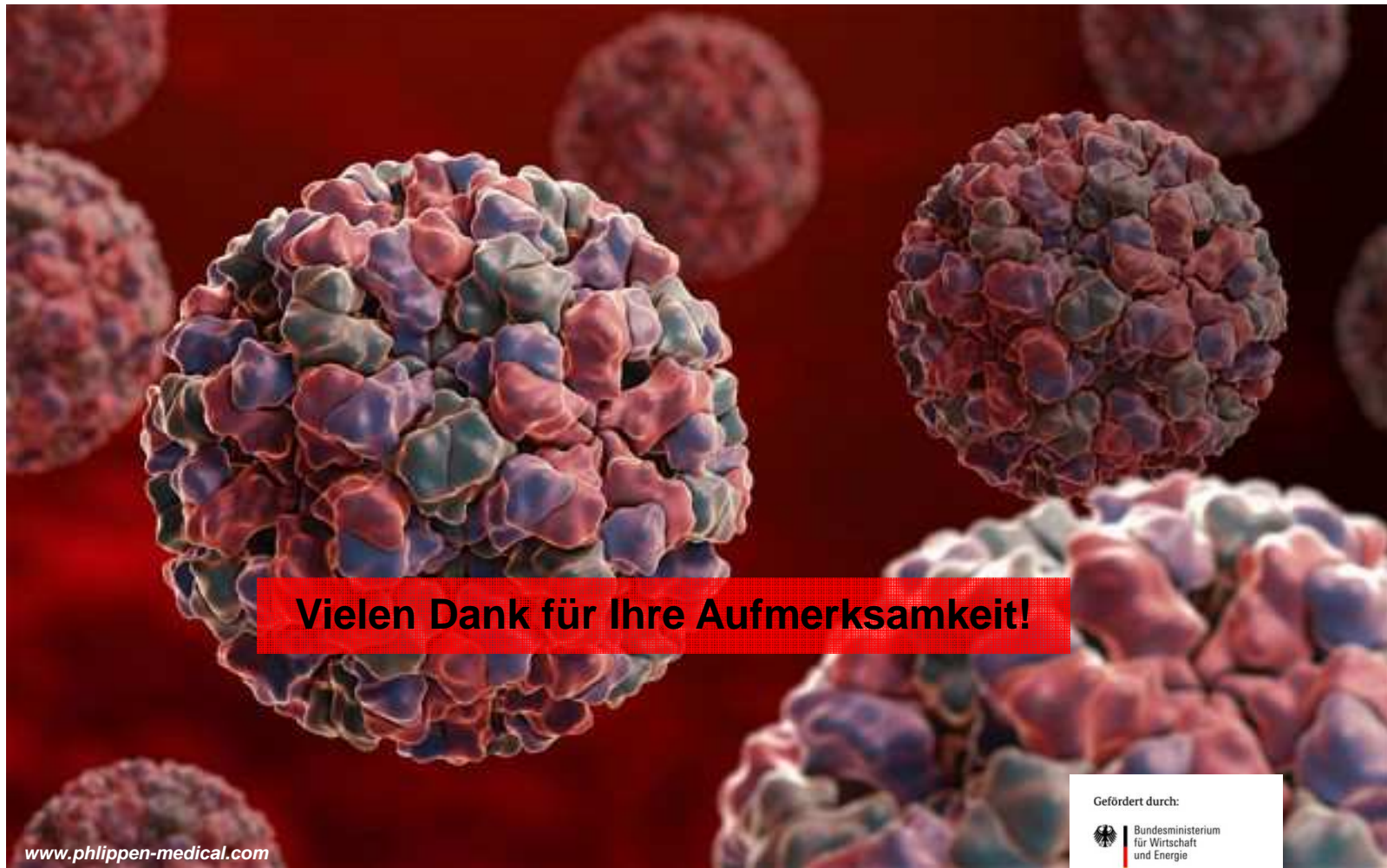


## Zusammenfassung

Das **foodproof Virus Sample Preparation Kit** und das **foodproof Norovirus Detection Kit** sind validiert für die Anwendungen in der Lebensmittelanalytik:

- Multiplex-Kit (GI, GII, MS2) als one-step RT real-time PCR
- vergleichbare Performanz für GI und GII
- Hohe Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit
- verschiedene Matrices validiert  
 → Hohe diagnostische Sensitivität





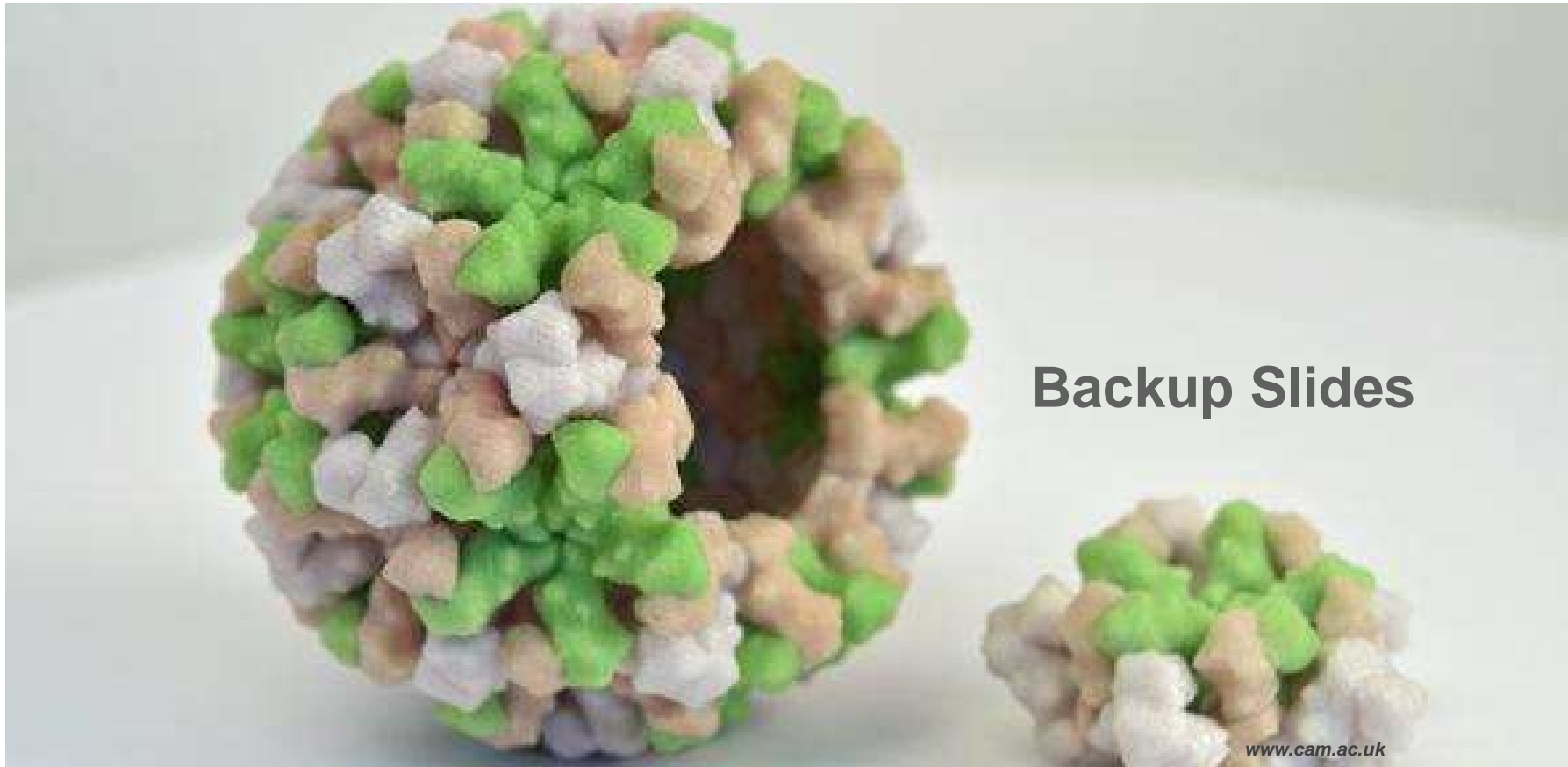
**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**

[www.phlippen-medical.com](http://www.phlippen-medical.com)

Gefördert durch:  
 Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

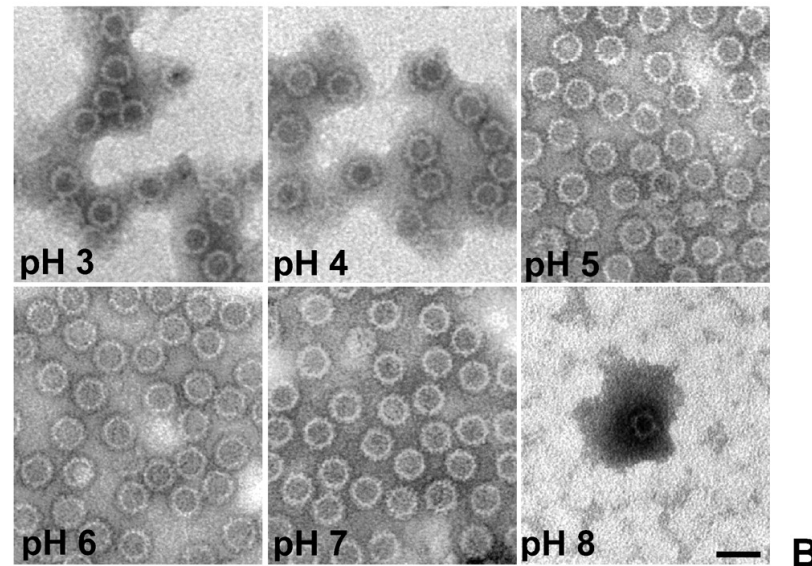
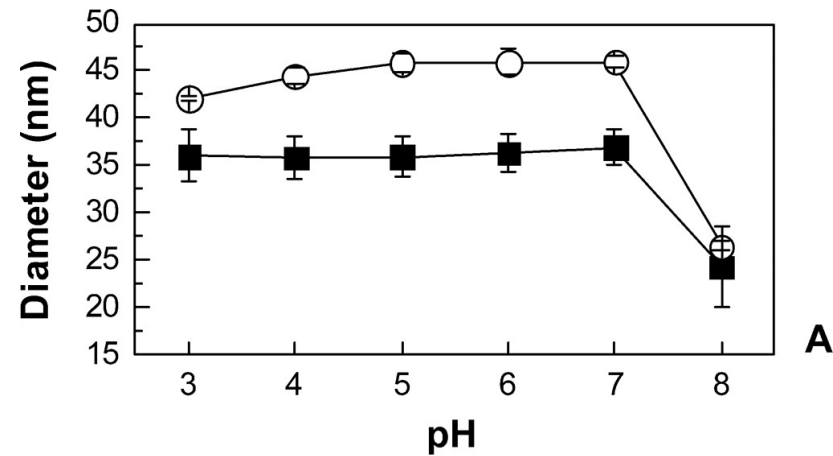




**Backup Slides**

[www.cam.ac.uk](http://www.cam.ac.uk)

**Analysis of the quaternary structure of NV-VLPs as a function of pH by DLS and TEM. A, NV-VLPs were dialyzed overnight against citrate/phosphate buffer at the indicated pH, and the particle size was determined by DLS (open circles) or by TEM (filled squares).**



Salvador F. Ausar et al. J. Biol. Chem. 2006;281:19478-19488