

Lebensmittel-assoziierte Viren

Tagungsband zum BfR-Symposium am 4. Nov. 2009 in Berlin

Impressum

Tagungsband

Lebensmittel-assoziierte Viren
BfR-Symposium am 4. Nov. 2009

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Berlin 2009
37 Seiten

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung
BfR-Hausdruckerei Dahlem

Inhalt

1	Einleitung	5
2	Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren (ALV)	7
3	Programm	9
4	Abstracts	11
4.1	Erkrankungen durch Lebensmittel-übertragbare Viren in Deutschland	11
4.2	Hepatitis E – eine neue Lebensmittel-assoziierte Erkrankung in Deutschland	12
4.3	Hohe HEV Prävalenz in Wildschweinen in vier verschiedenen Regionen Deutschlands	13
4.4	Noroviren, Sapoviren und Hepeviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren	14
4.5	Untersuchung eines Norovirus-Gastroenteritis Ausbruchs in einer Kaserne, Leipzig, 2009	15
4.6	Nachweis humaner Sapoviren bei einem Gastroenteritisausbruch in Deutschland	16
4.7	Nachweisverfahren für Viren in Lebensmitteln und rechtliche Bewertung	17
4.8	Vergleichende <i>Hepatitis E Virus</i> -Seroprävalenz in deutschen Hausschweinen mittels unterschiedlicher Nachweismethoden	18
4.9	Strategien und Methoden zum Nachweis von Viren in Oberflächengewässern und Rohwässern für die Trinkwasseraufbereitung	19
4.10	Realtime RT-PCR zur breiten Detektion von Gruppe A-Rotaviren des Menschen und verschiedener Säugetier-Spezies	20
4.11	Untersuchung von Fischen und Fischereierzeugnissen sowie von glatten Oberflächen in fischverarbeitenden Betrieben auf lebensmittelassoziierte Viren –Möglichkeiten und Grenzen der amtlichen Untersuchung-	21
4.12	Tenazität und Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln	22
4.13	Einfluss verschiedener Prozessfaktoren bei der Lebensmittelherstellung auf die Tenazität von Noroviren in Lebensmitteln	23
4.14	Untersuchungen zum Einfluss technologischer Prozesse auf die Tenazität und Inaktivierungskinetik von ausgewählten viralen Infektionserregern in Rohwurstprodukten	24
4.15	Prädiktive Modelle der druck- und temperaturabhängigen Kurzzeit-Inaktivierung Lebensmittel-übertragener Viren	25
4.16	Hitzestabilität von Hepatitis E-Viren	26
5	Poster	27

1 Einleitung

Willkommen zum Symposium „Lebensmittel-assoziierte Viren“!

Wir freuen uns sehr, Sie zum ersten Symposium „Lebensmittel-assoziierte Viren“ hier in Berlin begrüßen zu dürfen. Das Symposium soll ein Versuch sein, dieses relativ neue Thema mit allen seinen Besonderheiten auf einer separaten Tagung zu behandeln. Gleichzeitig wollen wir ausloten, inwieweit die Forschung zu Viren, die über Lebensmittel übertragen werden können, sich in den letzten Jahren so weit entwickelt hat, dass dadurch eine breitere Behandlung dieses Themas auch in der lebensmittelhygienischen Praxis ermöglicht wird.

Lebensmittel als Übertragungsvehikel von Viren rücken immer mehr in den Focus des wissenschaftlichen und öffentlichen Interesses. Die stetigen Anstiege der Meldungen von Norovirus- und Rotavirus-Erkrankungen in den vergangenen Jahren zeigen, dass Untersuchungen zu Übertragungswegen, Tenazität und Inaktivierung dieser bekannten Viren dringend benötigt werden. Neue Erkenntnisse zu zoonotischen Viren, die über Lebensmittel übertragen werden können (z. B. Hepatitis E-Viren) zeigen, dass auch „neuen“ Viren erhebliche Beachtung geschenkt werden muss.

Mit der Verbesserung der Nachweismethoden für Viren in Lebensmitteln stehen nun erstmals auch grundlegende Werkzeuge für umfangreichere Untersuchungen zu dieser Thematik zur Verfügung. Unser eintägiges wissenschaftliches Symposium soll deshalb dazu beitragen, dass sich Interessierte aus wissenschaftlichen Einrichtungen, Untersuchungsämtern und Überwachungsbehörden aus dem deutschsprachigen Raum über alle Aspekte Lebensmittel-assoziiierter Virusinfektionen austauschen können.

Wir wünschen Ihnen einen schönen Aufenthalt in Berlin, ein interessantes Symposium und angeregte Gespräche mit den Kollegen,
herzliche Grüße

Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren
Reimar Johné (Tagungsleiter)



2 Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren (ALV)

Die „Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren“ (ALV) wurde 2003 gegründet. Die Gründungsidee zu dieser „freien Forschergruppe“ ging seiner Zeit von J. Süss (ehemals BfR, Berlin, jetzt FLI, Jena) und B. Becker (Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Lemgo) aus. Aufgrund der internationalen Aktivitäten wurde die Notwendigkeit erkannt, sich auch auf nationaler Ebene mit Themen rund um den Nachweis, die Überdauerungsfähigkeit und Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln zu beschäftigen. Zu den Gründungsmitgliedern, die sich am 11.12.2003 erstmalig in Lemgo trafen, gehörten J. Dreier (Herz- und Diabetes-Zentrum NRW), M. Hagen (SVUA Detmold), B. Heun-Münch (SVUA Krefeld), U. Loss (SVUA Arnshausen), D. Mäde (Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt), R. Reiting (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor), C. Schrader (BfR) und B. Becker (Hochschule Ostwestfalen-Lippe).

Im Laufe der vergangenen Jahre traf sich die Gruppe regelmäßig zu eintägigen Gesprächen, in denen u. a. Themen wie der Nachweis von Norovirus und Hepatitis A-Virus in verschiedenen Lebensmittelmatizes, die Bedeutung von Astro- und Rotaviren in Lebensmitteln, die Durchführung von Ringversuchen sowie die Ausrichtung von Workshops besprochen wurde. Beginnend mit dem Jahr 2007 wurde eine Norovirus-Probenbank (Standort: BfR) aufgebaut, in der Noroviren aus Ausbruchsgeschehen in Deutschland gesammelt werden. 2005, 2006 und 2008 richtete die ALV an der Hochschule Ostwestfalen-Lippe Workshops zum Nachweis von Norovirus in Lebensmitteln und Umgebungsproben für Interessierte aus Forschungseinrichtungen, Industrie und Dienstleistungslaboratorien aus.

Mitglieder der ALV sind in nationalen Gremien, wie die § 64 LFGB- Arbeitsgruppe „Viren in Lebensmitteln“ (Gründung 2005) oder der DIN Arbeitskreis „Viren“ (Gründung 2009), sowie in den europäischen Gremien „Viruses in foods CEN/WG6/TC275/TAG4“ und „COST (European Cooperation in the field of Scientific and Technological Research) European Network for Environmental and Food Virology“ vertreten.

Die Virusübertragung durch Lebensmittel wurde in zahlreichen Publikationen in den vergangenen Jahrzehnten beschrieben. Dennoch ist die Frage unbeantwortet, wie bedeutend dieser Übertragungsweg ist. Unumstritten ist jedoch, dass wir zuverlässige Verfahren zum Nachweis von Viren in Lebensmitteln entwickeln und umfassende Erkenntnisse zur Überdauerung und Inaktivierung von Viren in der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung gewinnen müssen. Ihren Beitrag dahingehend zu leisten, ist auch weiterhin das Ziel der ALV.

Barbara Becker

Veranstalter:

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

**Wissenschaftliche Organisation:**

Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren



Tagungsleitung: Reimar Johne

Termin und Ort der Veranstaltung:

4. November 2009
10:00–17:30 Uhr

Bundesinstitut für Risikobewertung
Standort Marienfelde
Haus 3, Hörsaal
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin

3 Programm

10:00 Uhr Begrüßung
Andreas Hensel, Präsident des Bundesinstitut für Risikobewertung,
Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung

10:15 Uhr Erkrankungen durch Lebensmittel-übertragbare Viren
in Deutschland
Judith Koch, Robert Koch-Institut

10:45-11:15 Uhr Kaffeepause und Poster

Session I – Epidemiologie und Ausbruchsuntersuchungen **Chairman: Peter Otto, Friedrich-Löffler-Institut**

11:15 Uhr Hepatitis E – eine neue Lebensmittel-assoziierte Erkrankung
in Deutschland
Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung

11:45 Uhr Hohe HEV Prävalenz in Wildschweinen in vier verschiedenen
Regionen Deutschlands
Cornelia Adlhoch, Robert-Koch-Institut

12:00 Uhr Noroviren, Sapoviren und Hepeviren bei landwirtschaftlichen
Nutztieren
Barbara Bank-Wolf, Justus-Liebig-Universität Giessen

12:15 Uhr Untersuchung eines Norovirus-Gastroenteritis Ausbruchs
in einer Kaserne, Leipzig, 2009
Kathrin Scherer, Bundesinstitut für Risikobewertung

12:30 Uhr Nachweis humaner Sapoviren bei einem Gastroenteritis-
ausbruch in Deutschland
Marina Höhne, Robert-Koch-Institut

12:45–13:45 Uhr Mittagspause

Session II – Nachweismethoden und Typisierung **Chairwoman: Marina Höhne, Robert Koch-Institut**

13:45 Uhr Nachweisverfahren für Viren in Lebensmitteln und rechtliche
Bewertung
Dietrich Mäde, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt

14:15 Uhr Vergleichende Hepatitis E Virus-Seroprävalenz in deutschen
Hausschweinen mittels unterschiedlicher Nachweismethoden
Christine Bächlein, Tierärztliche Hochschule Hannover

14:30 Uhr Strategien und Methoden zum Nachweis von Viren in Oberflächen-
gewässern und Rohwässern für die Trinkwasseraufbereitung
Hans-Christoph Selinka, Umweltbundesamt

14:45 Uhr Realtime RT-PCR zur breiten Detektion von Gruppe A-Rotaviren
des Menschen und verschiedener Säugetier-Spezies
Peter Otto, Friedrich-Loeffler-Institut

15:00 Uhr Untersuchung von Fischen und Fischereierzeugnissen sowie von
glatten Oberflächen in fischverarbeitenden Betrieben auf lebensmittel-assoziierte Viren
- Möglichkeiten und Grenzen der amtlichen Untersuchung
Sven Ramdohr, Institut für Fische und Fischereierzeugnisse Cuxhaven

15:15-15:45 Uhr Kaffeepause und Poster

Session III – Tenazität und Inaktivierung**Chairman: Karsten Fehlhaber, Universität Leipzig**

- 15:45 Uhr Tenazität und Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln
Barbara Becker, Hochschule Ostwestfalen-Lippe
- 16:15 Uhr Einfluss verschiedener Prozessfaktoren bei der Lebensmittel-
herstellung auf die Tenazität von Noroviren in Lebensmitteln
Anja Carl, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- 16:30 Uhr Untersuchungen zum Einfluss technologischer Prozesse
auf die Tenazität und Inaktivierungskinetik von ausgewählten
viralen Infektionserregern in Rohwurstprodukten
Thiemo Albert, Universität Leipzig
- 16:45 Uhr Prädiktive Modelle der druck- und temperaturabhängigen
Kurzzeit-Inaktivierung Lebensmittel-übertragener Viren
Anselm Lehmacher, Institut für Hygiene und Umwelt
- 17:00 Uhr Hitzestabilität von Hepatitis E-Viren
Anika Schielke, Bundesinstitut für Risikobewertung
- 17:15 Uhr Schlussworte
Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung

4 Abstracts

4.1 Erkrankungen durch Lebensmittel-übertragbare Viren in Deutschland

Judith Koch, Christina Frank, Klaus Stark

Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie (Gastrointestinale Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen), Berlin

E-Mail: KochJ@rki.de

Lebensmittel-bedingte Infektionen sind in Deutschland weit verbreitet und können von einer Vielzahl bakterieller, parasitärer und viraler Erreger verursacht werden. Zu den viralen Erregern, die durch Lebensmittelverzehr übertragen werden, zählen neben selten identifizierten Viren wie z.B. Corona- oder Flaviviren vor allem Noro-, Rota-, Sapo- Astro- und Adenoviren als Erreger von infektiösen Gastroenteritiden und Hepatitis E und A-Viren als Erreger infektiöser Hepatitiden von Bedeutung.

Nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) sind Noro-, Rota-, Hepatitis A und E-Infektionen meldepflichtig, wenn eine akute Erkrankung labordiagnostisch gesichert ist oder wenn Erkrankungskuster (ggf. auch durch andere o.g. Erreger) auftreten, die mit einer labordiagnostisch bestätigten Erkrankung in einem epidemiologischen Zusammenhang stehen. Jedes Jahr werden zwischen 100.000 bis 300.000 Fälle potentiell lebensmittelbedingten virusbedingter Infektionen nach dem IfSG erfasst. Dabei ist jedoch von einer erheblichen Dunkelziffer auszugehen. In Deutschland sind vor allem Noroviren und Hepatitis A-Viren als Erreger lebensmittelbedingter Infektionen von besonderer Bedeutung und können regionale wie auch überregionale Ausbrüche verursachen.

Nach bisherigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass bei lebensmittelbedingten Ausbrüchen die Kontamination der betroffenen Lebensmittel vorwiegend sekundär durch direkten oder indirekten Kontakt mit Virusausscheidungen Infizierter erfolgt. Eine primäre Kontamination von Schalentieren (Muscheln und Austern) und ihr roher Verzehr sind in unseren Breiten eher selten und von untergeordneter Bedeutung, spielen jedoch vermutlich bei Reisenden eine Rolle.

In den letzten Jahren konnten bei einer Reihe von Ausbrüchen kontaminierte Lebensmittel als ursächliches Infektionsvehikel identifiziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuteten häufig daraufhin, dass unzureichende hygienische Zustände oder mangelhaftes Hygienemanagement ursächlich für die Lebensmittelkontamination verantwortlich waren.

Um die epidemiologische Bedeutung lebensmittelbedingter viraler Infektionen in Deutschland noch besser einschätzen und gezielte Präventions- und Kontrollmaßnahmen ergreifen zu können, sollten in enger Kooperation der humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Einrichtungen verstärkt auch virale Ausbrüche mit Lebensmittelverdacht untersucht und dokumentiert werden. Molekularbiologischen Nachweismethoden kommt bei der Ausbruchs- aufklärung eine besondere Bedeutung zu.

4.2 Hepatitis E – eine neue Lebensmittel-assoziierte Erkrankung in Deutschland

Reimar Johne
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
E-Mail: Reimar.Johne@bfr.bund.de

Infektionen mit dem Hepatitis E-Virus (HEV) führten in der Vergangenheit zu großen Epidemien von akuter Hepatitis in Zentral- und Südostasien, Nord- und Westafrika sowie in Mexiko. Die Erkrankung verläuft in der Regel moderat mit einer Letalitätsrate von 0,5 bis 4 %; bei Schwangeren wird jedoch aufgrund fulminanter Verläufe eine Letalitätsrate von 15 bis zu 25 % beobachtet. In den industrialisierten Ländern wird die Erkrankung relativ selten diagnostiziert, wobei es sich fast ausschließlich um Einzelerkrankungen handelt. In Deutschland steigt die Zahl der gemeldeten Hepatitis E-Fälle in den letzten Jahren kontinuierlich an; 2008 wurden insgesamt 104 Fälle gemeldet. Die in Mitteleuropa auftretenden Hepatitis E-Fälle sind einerseits auf importierte Infektionen aus den Endemiegebieten zurückzuführen, andererseits zeigen jedoch neuere Untersuchungen, dass ein Großteil der Fälle im eigenen Land erworben wird.

HEV ist ein mit Calici- und Togaviren verwandtes Virus, das in ein eigenes Genus *Hepevirus* eingeordnet wurde. Das Virus lässt sich in Zellkulturen nur sehr schwer vermehren, weshalb noch viele Details seines Vermehrungszyklus unklar sind. Aus dem gleichen Grund sind Tenazitätsstudien sowie die Entwicklung von Diagnostika und Impfstoffen schwierig. Die unbekleideten HEV-Partikel enthalten ein einzelsträngiges RNA-Genom. Es lassen sich vier Genotypen mit unterschiedlicher geografischer Verbreitung unterscheiden, wobei Genotyp 3 weltweit verbreitet ist und für Europa die größte Bedeutung hat.

Die Übertragung von HEV erfolgt über den fäkal-oralen Weg, in den Endemiegebieten vor allem mittels fäkal verunreinigten Trinkwassers, aber auch durch kontaminierte Lebensmittel. Mit humanem HEV eng verwandte Erreger (Genotypen 3 und 4) wurden auch in verschiedenen Tierarten wie Schwein, Wildschwein und Sika-Hirsch nachgewiesen, ohne in diesen auffällige Erkrankungen auszulösen. Neuere Untersuchungen zeigen auch HEV-ähnliche Viren in Kaninchen und Ratten. Berichte über Hepatitis E-Erkrankungen nach dem Verzehr ungenügend erhitzten Fleisches von Wildschweinen legen ein zoonotisches Potenzial von HEV nahe. In mehreren Ländern Europas und in Deutschland scheint das Virus in Schweine- und Wildschweinbeständen stark verbreitet zu sein. Eine epidemiologische Studie identifizierte den Verzehr von Wildschweinfleisch als Risikofaktor für eine Erkrankung an Hepatitis E in Deutschland. Die Daten zeigen, dass HEV über den Verzehr von Fleisch infizierter Tiere übertragen werden kann; weitere Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung des Risikos einer Erkrankung erscheinen nötig.

4.3 Hohe HEV Prävalenz in Wildschweinen in vier verschiedenen Regionen Deutschlands

Cornelia Adlhoch¹, Marco Kaiser¹, Helga Meisel², Alexander Wolf¹
Heinz Ellerbrok¹ und Georg Pauli¹

¹Robert Koch-Institut, Zentrum für biologische Sicherheit, Berlin

²Institut für of medizinische Virologie, Berlin

E-Mail: adlhochc@rki.de

Hintergrund

Hepatitis E Virus (HEV) galt bisher als nicht-endemisch in Europa, obwohl vermehrt autochthone humane Fälle gemeldet sowie hohe Durchseuchungsraten der Wild- und Hauschweine in Europa gezeigt wurden. HEV des Schweins ist eine virale Zoonose, die auf den Menschen übergehen und dort eine Hepatitis verursachen kann. Es wird angenommen, dass für die Übertragung von HEV in Deutschland kontaminiertes Wildschweinfleisch ein Risikofaktor darstellen könnte.

Methoden

In vier unterschiedlichen ost- und westdeutschen Gebieten wurden auf Treibjagden Leber-, Galle- und Serumproben von Wildschweinen zwischen Oktober und Dezember 2007 entnommen. Mittels quantitativer real-time PCR wurden diese auf HEV RNA getestet. Die Serumproben wurden mit zwei kommerziell erhältlichen ELISAs sowie einem Line assay auf antiHEV IgG untersucht. Long-range PCR assays generierten zur phylogenetischen Analyse größere Genomfragmente sowie zwei Vollängengenome.

Ergebnis

28,7 % der Proben waren seropositiv und in 68,2 % der Tiere konnte HEV RNA in der qPCR Analyse nachgewiesen werden. Tiere aller Altersklassen waren hierbei HEV RNA positiv. Galleproben zeigten die höchste Rate positiver qPCR Ergebnisse im Vergleich zu Leber- und Serumproben. Alle Isolate clusterten in der phylogenetischen Analyse im Genotype 3, der Subtyp allerdings war regional verschieden. Isolate aus Rheinland-Pfalz und Brandenburg gehörten zum Subtyp 3i, ein Isolat der Grenzregion Brandenburg/Sachsen clusterte innerhalb des Subtyps 3f, alle anderen dieses Sammelgebietes jedoch gehörten zu Subtyp 3e. Ein 969 nt Fragment innerhalb des ORF 2 zeigte, dass die HEV Isolate innerhalb einer Population stabil sind, aber Tiere in unmittelbarer Nähe unterschiedliche Subtypen aufweisen können. Vollängengenome der Subtypen 3i und 3e wurden generiert.

Zusammenfassung

Die hohe Infektionsrate bei hohen Viruslasten der untersuchten Wildschweinpopulationen zeigt ein Risikopotential der zoonotischen Übertragung von HEV durch kontaminiertes Fleisch auf und könnte als Ursache humaner autochthoner Fälle in Deutschland in Frage kommen.

4.4 Noroviren, Sapoviren und Hepeviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Barbara Bank-Wolf, Edmilson Oliveira-Filho, Heinz-Jürgen Thiel, Matthias König
Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität
Giessen, Giessen
E-Mail: Barbara.Bank-Wolf@vetmed.uni-giessen.de

Noroviren (NoV) und Sapoviren (SaV) aus der Virusfamilie *Caliciviridae* sind wichtige Verursacher humaner Gastroenteritiden und kommen auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren wie Rindern, Schweinen und Schafen vor. Die enge Verwandtschaft humaner und animaler Viren, beschriebene Rekombinationen dieser Viren sowie der Nachweis humaner NoV bei Schweinen, Rindern und in rohem Schweinefleisch hat das Interesse an diesen Viren auch im Hinblick auf die Gefahr einer möglichen zoonotischen Übertragung verstärkt.

Hepatitis E Virus (HEV), ein Vertreter aus der Virusfamilie *Hepeviridae*, ist weltweit verbreitet und verursacht beim Menschen akute Hepatitiden. Vertreter der Genotypen 3 und 4 des HEV wurden sowohl beim Menschen als auch bei Wildwiederkäuern sowie Haus- und Wildschweinen gefunden.

Das Vorkommen eng verwandter Virusstämme bei unterschiedlichen Spezies in der gleichen geographischen Region sowie Erkrankungen nach Verzehr von nicht durchgegartem Wildschweinefleisch weisen auf eine zoonotische Übertragung hin. Verschiedene Studien haben das Vorkommen von HEV bei Wildschweinen in Deutschland dokumentiert. Über die Virusprävalenz beim Hausschwein in Deutschland gibt es bislang keine veröffentlichten Daten.

Zur Ermittlung der Prävalenz und Bedeutung von NoV- und SaV-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren wurden Kot- und Organproben von Rindern, Schweinen und kleinen Wiederkäuern (Schafen, Ziegen) mit Hilfe der RT-PCR auf das Vorhandensein von NoV- bzw. SaV-spezifischer RNS untersucht. Ein Fragebogen zu Daten der Einzeltiere sowie zur Bestandssituation begleitete die Probensammlung und wurde statistisch im Hinblick auf Zusammenhänge einer NoV- und SaV-Infektion mit spezifischen Parametern analysiert. Zusätzlich wurden Proben von Schweinen auf HEV-spezifische RNS untersucht.

Bei Rindern konnten in 5,9 % der untersuchten Proben NoV nachgewiesen werden. In Probenmaterial von Schweinen gelang der Nachweis von SaV in 6,1 % der Fälle. Die Proben der kleinen Wiederkäuer waren allesamt negativ. Phylogenetische Analysen der PCR-Produkte zeigten, dass die gefundenen Viren näher mit bekannten animalen NoV bzw. SaV verwandt sind als mit den humanen Vertretern.

HEV-spezifische RNS konnte nur in einer von 105 Proben von Schweinen detektiert werden. Die phylogenetische Analyse erlaubte eine Gruppierung des Virus in Subgruppe 3a des Genotyps 3 der *Hepeviridae* zusammen mit porzinen, aber auch humanen Viren.

4.5 Untersuchung eines Norovirus-Gastroenteritis Ausbruchs in einer Kaserne, Leipzig, 2009

Kathrin Scherer¹, Maria Wadl⁴, Helen Bernard⁴, Sabine Diedrich⁴, Lüppo Ellerbroek², Christina Frank⁴, Marina Hoehne⁴, Reimar Johné², Judith Koch⁴, Stine Nielsen⁴, Jörg Schulenburg³, Klaus Stark⁴ und Günter Klein¹

¹Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit

²Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

³Schule für Diensthundewesen der Bundeswehr

⁴Robert Koch-Institut, Berlin

E-Mail: Kathrin.Scherer@bfr.bund.de

Die zur Familie der Caliciviren gehörenden Noroviren sind weltweit verbreitet und gelten derzeit als häufigste Erregergruppe bei virusbedingten Magen-Darm-Erkrankungen des Menschen. Dem Robert Koch-Institut wurden im Jahr 2008 ca. 212.000 Erkrankungen gemeldet; eine stete Steigerung ist seit 2001 zu beobachten. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral entweder direkt von Mensch zu Mensch oder indirekt über kontaminierte Oberflächen, Lebensmittel und Getränke. Die Infektionsdosis ist sehr gering und es reichen bereits 10-100 Viruspartikel aus, um eine Erkrankung auszulösen. Norovirus-Ausbrüche ereignen sich besonders häufig in Einrichtung mit Gemeinschaftsverpflegung bedingt durch den engen Kontakt der Bewohner.

Anfang Januar 2009 erkrankten mehrere Bewohner einer Kaserne in Leipzig an Durchfall und Erbrechen. Aufgrund der Häufung von Magen-Darm-Erkrankungen und der klinischen Symptomatik wurden Noroviren als Ursache angenommen. Der Verdacht ließ sich über den Nachweis von Noroviren in Stuhlproben von Erkrankten bestätigen. Im Rahmen der Ausbruchsuntersuchung wurden des weiteren Tupferproben von verschiedenen Oberflächen der betroffenen Einrichtung sowie Lebensmittelproben gewonnen und auf Noroviren untersucht. Insgesamt 11% (6/55) der untersuchten Oberflächen waren Norovirus-positiv. Diese stammten u.a vom Tresen der Poststelle, einer Computertastatur und dem Postverteilerkasten. Die genotypische Sequenzanalyse der Tupferproben-Isolate ergab eine Übereinstimmung mit dem in den Stuhlproben nachgewiesenen Norovirus-Stamm (Genoty 02.4). In den untersuchten Lebensmittelproben konnten hingegen keine Noroviren nachgewiesen werden. Als Grund für den negativen Virusnachweis können eine komplexe Lebensmittelmatrix, eine zu geringe Viruskonzentration und inhomogene Verteilung im Lebensmittel, aber auch das Vorhandensein inhibitorischer Substanzen in den Lebensmitteln genannt werden. Ebenso ist es denkbar, dass am Ausbruchgeschehen ursächlich keine Lebensmittel beteiligt waren und die Übertragung der Viren direkt von Mensch zu Mensch und über kontaminierte Oberflächen stattfand. Die Untersuchung zeigt deutlich, dass es im Rahmen von Ausbruchgeschehen zu einer Verbreitung von Noroviren über Oberflächen und Gegenstände kommen kann. Die Wichtigkeit einer gründlichen Reinigung und Desinfektion aller Bereiche zur Unterbrechung der Infektketten wird bestätigt. Darüber hinaus werden verbesserte Untersuchungsmethoden zum Norovirusnachweis, insbesondere in komplexen Lebensmitteln, benötigt.

Die Untersuchung entstand im Rahmen eines Forschungsvorhabens für den Sanitätsdienst der Bundeswehr.

4.6 Nachweis humaner Sapoviren bei einem Gastroenteritisausbruch in Deutschland

Marina Höhne¹ und Florian Burckhardt²

¹Robert Koch-Institut, Konsiliarlabor für Noroviren, Berlin

²Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Institut für Hygiene und Infektionsschutz, Landau

E-Mail: hoehnem@rki.de

Sapoviren (SV), die wie Noroviren (NV) zur Familie der *Caliciviridae* gehören, sind als Gastroenteritiserreger für Menschen und Schweine bekannt. Auf Grund ihrer großen genetischen Variabilität werden sie in 5 Genogruppen mit jeweils mehreren Genotypen unterteilt. Lange Zeit wurden SV hauptsächlich als Erreger sporadischer Gastroenteritiden (GE) vor allem bei Kindern nachgewiesen. Durch verbesserte Methoden werden weltweit SV zunehmend auch als Ursache von GE-Ausbrüchen in allen Altersgruppen diagnostiziert. Da Infektionen mit SV im Gegensatz zu Noroviren nicht meldepflichtig sind, gibt es bisher nur wenige Informationen über ihre Zirkulation in Deutschland.

Im Juli 2008 erkrankten 30 von 50 Gästen einer Grillparty in Rheinland-Pfalz mit Symptomen einer virusbedingten Gastroenteritis. Die Ausbruchsuntersuchungen durch Mitarbeiter der lokalen Gesundheitsbehörde ergaben den Genuss von Büchsenbier, das zuvor in Wasser aus einem nahegelegenen Fluss gekühlt worden war, als die wahrscheinlichste Ursache. In Wasserproben wurden *E. coli* serovar O78 und O58 nachgewiesen. In Stuhlproben von Erkrankten konnten weder bakterielle Erreger noch Noroviren nachgewiesen werden. Erst die Testung durch eine multiplex real-time RT-PCR spezifisch für humane Sapoviren war erfolgreich. Durch Sequenzanalysen konnte eine Intergenogruppen-Rekombinante GII.2/GIV als Ursache des Gastroenteritisausbruchs festgestellt werden. Da das Wasser zum Kühlen der Bierdosen kurz unterhalb eines Klärwerksabflusses entnommen worden war, kann eine Verunreinigung mit Sapoviren angenommen werden, obwohl im Flußwasser kein Nachweis von Sapoviren möglich war.

Wie in ersten retrospektiven Untersuchungen im Konsiliarlabor für Noroviren gezeigt werden konnte, zirkuliert ein breites Spektrum humaner Sapoviren in Deutschland. Da bisher nur sporadische Nachweise von Sapoviren bei Gastroenteritiden durchgeführt wurden, ist die tatsächliche Prävalenz dieser Caliciviren bisher unbekannt. Bei Gastroenteritiden unklarer Ätiologie sollte daher in Zukunft auch an einen Nachweis von Sapoviren gedacht werden.

4.7 Nachweisverfahren für Viren in Lebensmitteln und rechtliche Bewertung

Dietrich Mäde

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich 3 – Lebensmittelsicherheit, Halle (Saale)

E-Mail: dietrich.maede@lav.ms.sachsen-anhalt.de

Noroviren, Rotaviren und Hepatitis-A-Viren gelten als die wichtigsten lebensmittelassoziierten Viren. Nach vorsichtigen Schätzungen werden mindestens 10% der Noroviruserkrankungen durch Lebensmittel oder Trinkwasser hervorgerufen, bei über 200 000 gemeldeten Erkrankungsfällen im Jahr 2008 sind dies mindestens 20 000 lebensmittelbedingte Erkrankungsfälle.

Die Kontamination der Lebensmittel mit humanpathogenen Viren ist in der Regel eine sekundäre Kontamination. Infizierte Personen scheiden den Erreger in hoher Zahl über Vomit und Stuhl aus. Unzureichende hygienische Bedingungen sind die Ursache der Kontamination von Lebensmitteln. Verschärft wird die Gefahr einer Infektion durch die geringe infektiöse Dosis, bereits wenige Virionen, beschrieben ist eine minimale infektiöse Dosis von weniger als zehn Viruspartikeln, können Erkrankungsfälle hervorrufen. Diese geringe Zahl an Erregern stellt sehr hohe Anforderungen an die Sensitivität der Analysen im Lebensmittelbereich. Als erste amtliche Methode wurde im Rahmen einer § 64 - Arbeitsgruppe ein Verfahren zum Nachweis von Noroviren in Tupferproben durch real-time RT-PCR entwickelt. Mit diesem Verfahren ist es sowohl möglich, Viren auf Lebensmitteln mit harten, festen Oberflächen, als auch die Erreger in Umgebungsproben nachzuweisen. Mit dieser Methode können durch Analyse von Tupferproben, die von den Behörden vor Ort entnommen wurden, nunmehr Infektionswege abgeklärt und Eintragsquellen ermittelt werden. Mit erheblich höherem Aufwand ist der Nachweis von Viren direkt in Lebensmitteln verbunden. Derzeit werden im europäischen Rahmen Methoden zum Nachweis von Noroviren in abgefülltem Wasser, in weichen Früchten und in grünem Salat entwickelt. Im Rahmen der genannten Arbeitsgruppe nach § 64 LFGB wurde ein Verfahren zum Nachweis von Viren in Joghurt erfolgreich in einem Ringversuch geprüft.

Die lebensmittelrechtliche Beurteilung der nachgewiesenen Viren erfolgt in Abhängigkeit von der epidemiologischen Situation. Mittels DNA-Sequenzierung ist es möglich, den epidemiologischen Zusammenhang zwischen den im Patientenmaterial nachgewiesenen Erregern zu analysieren. Wird ein epidemiologischer Zusammenhang festgestellt, so ist das Erzeugnis als gesundheitsschädlich zu beurteilen. Ansonsten ist bei Nachweis von Noroviren eine Kontamination durch humane Ausscheidungen auszugehen, die eine Beurteilung als zum Verzehr nicht geeignet nach sich ziehen.

4.8 Vergleichende *Hepatitis E Virus*-Seroprävalenz in deutschen Hausschweinen mittels unterschiedlicher Nachweismethoden

Christine Bächlein¹, Anika Schielke², Reimar Johne², Rainer Ulrich³,
Wolfgang Baumgärtner⁴, Beatrice Grummer¹

¹Institut für Virologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

²Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

³Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald-Insel Riems

⁴Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

E-Mail: christine.baechlein@tiho-hannover.de

Das *Hepatitis E Virus* (HEV) verursacht in Entwicklungsländern endemische Ausbrüche akuter Hepatitis. In Industriestaaten werden klinische Fälle von Hepatitis E vor allem mit der zoonotischen Übertragung von HEV ausgehend von Haus- und Wildschweinen in Verbindung gebracht. HEV-spezifische Antikörper wurden in porcinen Serumproben in mehreren Europäischen Ländern mit allgemein hohen Prävalenzen nachgewiesen.

Mithilfe eines neu entwickelten ELISAs wurde 1072 Schweineseren auf HEV-spezifische Antikörper untersucht. Die Seroprävalenz reichte dabei von 15.6 % bis 70.7 % in den verschiedenen Bundesländern. Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurden 321 Proben mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper-ELISA erneut getestet und 64.2 % davon als positiv beurteilt. Verglichen damit wurde mit dem neu entwickelten ELISA der Anteil positiver Proben auf 43.9 % beziffert. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass nur 56.7 % der Serumproben das gleiche Ergebnis aufwiesen. Eine erneute Untersuchung von ausgewählten Proben mit einem kommerziell erhältlichen, modifizierten Western Blot ergab wiederum abweichende Ergebnisse. Die beobachteten Abweichungen der Testresultate können höchstwahrscheinlich mit dem Einsatz unterschiedlicher Antigene und dem Nachweis unterschiedlicher Antikörperklassen in den verschiedenen Tests erklärt werden.

Grundsätzlich stellte sich durch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Schweineseren mit einem neu entwickelten ELISA heraus, dass HEV in der Hausschweinepopulation in Deutschland weit verbreitet ist. Mögliche Auswirkungen dieser Infektion auf die Tierproduktion sowie die menschliche Gesundheit sind jedoch weiterhin unklar.

4.9 Strategien und Methoden zum Nachweis von Viren in Oberflächengewässern und Rohwässern für die Trinkwasseraufbereitung

H.-C. Selinka, I. Chorus, I. Feuerpfeil, O. Schmoll, R. Szewzyk
Umweltbundesamt, Berlin
E-Mail: hans-christoph.selinka@uba.de

In Zusammenarbeit mit nationalen und internationalen Forschungs-einrichtungen und Behörden beteiligt sich das Umweltbundesamt an der Fortentwicklung und Validierung von Methoden zum Nachweis von Viren in Oberflächengewässern und Trinkwasserressourcen.

Humanpathogene enterale Viren werden hauptsächlich von Menschen mit dem Stuhl ausgeschieden. Da sie in Kläranlagen oft unzureichend zurückgehalten werden, können diese Viren über den Wasserkreislauf in die Umwelt gelangen und in Oberflächengewässern und im ungeschützten Grundwasser auftreten. Bei der Gewinnung von Trinkwasser – unserem wichtigsten Lebensmittel – aus solchen Wässern müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die Konzentration der Viren zu minimieren. Dazu dient das Multibarrierensystem mit Ressourcenschutz, mehrstufiger Aufbereitung und ggf. einer Desinfektion. So werden z. B. bei einer Untergrundpassage Viren effektiv durch Adsorption an Bodenpartikel zurückgehalten. Trinkwasserbedingte Ausbrüche von Viren traten in Europa nur bei Verstößen gegen die allgemein anerkannten Regeln bei der Trinkwasserproduktion oder -verteilung auf. Das angestrebte Schutzniveau für die Trinkwasserversorgung in Deutschland geht aber weit über die Verhinderung von Ausbrüchen hinaus. Die Dokumentation dieses hohen Schutzniveaus ist mit einer Endproduktkontrolle nicht mehr möglich, sondern erfordert eine Risikoabschätzung. Diese basiert auf der Überwachung des zur Trinkwasseraufbereitung benutzten Rohwassers und der Überprüfung der Effektivität der Wasseraufbereitung und liefert wichtige Daten für die Berechnung potenzieller Gesundheitsrisiken. Für den Nachweis von Viren nehmen molekularbiologische Methoden stetig an Bedeutung zu, vor allem für Viren, für die kein kultureller Nachweis möglich ist (z.B. Noroviren). Im Gegensatz zum Nachweis von Bakterien müssen für den Nachweis von Viren je nach Art der Wasserproben Volumina bis zu 10 Liter oder mehr untersucht werden, die vor der molekularbiologischen Analyse in mehreren Arbeitsschritten aufkonzentriert werden müssen.

In Laborversuchen, Beprobungen und Experimenten mit Wasserkreisläufen in halbtechnischen Versuchsanlagen testen wir am Beispiel von Adenoviren, Noroviren und Bakteriophagen Methoden zum Nachweis von Viren in Wasser unterschiedlicher Beschaffenheit und Qualität.

Ferner entwickeln wir in Zusammenarbeit mit der Trinkwasserkommission ein Datenbasiertes Stufenkonzept zur Risikoabschätzung und Bewertung des Vorkommens von Viren in Rohwasserressourcen und ihrer Elimination in der Trinkwasseraufbereitung.

4.10 Realtime RT-PCR zur breiten Detektion von Gruppe A-Rotaviren des Menschen und verschiedener Säugetier-Spezies

Peter Otto¹, Anja Carl² und Reimar Johne³

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen, Arbeitsgruppe Noro-/Rotaviren, Jena

²Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit – Fachlabor Lebensmittel-, Erlangen

³Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

E-Mail: peter.otto@fli.bund.de

Rotaviren (RV) sind die Hauptursache für klinisch relevante Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern und Jungtieren verschiedener Tierarten. Sie werden über den fäkal-oralen Weg, entweder direkt oder indirekt über eine Kontamination von Wasser, Lebensmittel oder Oberflächen übertragen. RV von Säugetieren können im zoonotischen Sinne auf den Menschen übertragen werden. Die Viruspartikel besitzen eine außerordentlich hohe genetische Variabilität. Sie werden auf der Basis ihres gruppenspezifischen Antigens gegenwärtig in die Gruppen A bis G eingeteilt. RV der Gruppe A (RV-A) dominieren jedoch bei den verursachten Erkrankungen deutlich. Innerhalb dieser Gruppe werden viele verschiedene Sero- bzw. Genotypen unterschieden, die als G- und P-Typen bezeichnet werden. Derzeit sind 23 G- und 31 P-Typen bekannt.

Die Diagnostik von RV stützt sich in den letzten Jahren zunehmend auf die Anwendung von sensitiven Schnelltests, vor allem der realtime RT-PCR. Pang et al. veröffentlichten 2004 eine robuste realtime RT-PCR zum Nachweis von RV-A in Stuhlproben von Kindern. Vor dem Hintergrund des zoonotischen Potenzials der RV-A wollten wir die Eignung dieser realtime RT-PCR zum Nachweis von RV-A verschiedener Säugertierarten prüfen.

31 RV-A-Stämme verschiedener Tierspezies mit unterschiedlichen G- und P-Typen wurden in Zellkulturen vermehrt, die virale RNA isoliert und anschließend in der oben genannten real-time RT-PCR getestet. Verschiedene humane RV-A-Isolate dienten als Positivkontrolle und aviäre RV-A, mammäre RV-C und Reoviren als Negativkontrolle. In den Untersuchungen wurden gleichzeitig One-Step RT-PCR Kits von drei verschiedenen Herstellern auf ihre Verwendbarkeit getestet.

Im Ergebnis konnten wir feststellen, dass mit Ausnahme der murinen RV-A-Isolate alle animalen RV-A-Isolate detektiert wurden. Die Sequenzierung der entsprechenden Gensequenzen der murinen Isolate ermöglichte danach eine Modifizierung der realtime RT-PCR (Primer und Sonde), so dass hierdurch alle getesteten animalen und humanen RV-A-Stämme detektiert werden konnten. Mit dieser modifizierten realtime RT-PCR steht nun ein schnelles Verfahren zur Verfügung, das den Nachweis von Gruppe A-Rotaviren sowohl vom Menschen als auch von Säugetieren gewährleistet.

4.11 Untersuchung von Fischen und Fischereierzeugnissen sowie von glatten Oberflächen in fischverarbeitenden Betrieben auf lebensmittelassoziierte Viren – Möglichkeiten und Grenzen der amtlichen Untersuchung-

Sven Ramdohr und Edda Bartelt
LAVES- Institut für Fische und Fischereierzeugnisse (IFF) Cuxhaven
E-Mail: sven.ramdohr@laves.niedersachsen.de

Das IFF Cuxhaven führt in Niedersachsen die amtlichen Untersuchungen auf Noro-, Rota und Hepatitis-A Viren in Fischen und Fischereierzeugnissen einschließlich zweischaliger Weichtiere durch. Zudem werden Hygienetupfer aus fischereiverarbeitenden Betrieben und aus dem Handel auf Norovirus gemäß der amtlichen Methode *L00.00-112 „Qualitativer Nachweis von Noroviren der Genogruppen I und II auf glatten, festen Oberflächen von Lebensmitteln durch real-time RT-PCR“* nach §64 LFGB untersucht.

Die angewendeten molekularbiologischen Nachweisverfahren entsprechen den Referenzmethoden (real time RT-PCR) des zuständigen Nationalen Referenzlabors (BfR, Berlin) und werden durch regelmäßige Ringversuche einschließlich Kontrolle der jeweiligen Nachweisgrenzen überprüft.

Im Untersuchungszeitraum 2008 bis Juni 2009 wurden insgesamt 277 Proben Fische und Fischereierzeugnisse und 141 Hygienetupfer aus fischverarbeitenden Betrieben und aus dem Einzelhandel qualitativ untersucht.

Die Herkunft und Beschaffenheit der Proben werden näher erläutert. Im Untersuchungszeitraum wurden weder in den Probenmaterialien von Fischen und Fischereierzeugnissen noch in Tupfern Viren nachgewiesen.

Diese Untersuchungsergebnisse erscheinen angesichts der Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von Viren in Lebensmitteln im Schrifttum, aber auch der häufig gemeldeten Norovirusinfektionen des Menschen zunächst unplausibel. Diskutiert werden muss daher, inwieweit Fische und Fischereierzeugnisse an viral bedingten Krankheitsausbrüchen beteiligt sind und wie die bestehenden Untersuchungs- Überwachungs- und Meldeabläufe zwischen Betrieben, Ärzten, Gesundheits- und Veterinärämtern zu optimieren sind, um viral bedingte Lebensmittelinfektionen aufzuklären und wirkungsvoller bekämpfen zu können.

4.12 Tenazität und Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln

Barbara Becker, Sascha Mormann
Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Life Science Technologies, Mikrobiologie, Lemgo
E-Mail: barbara.becker@hs-owl.de

Das RKI (Robert Koch Institut, Berlin) registrierte 2008 mehr als 120.000 Erkrankungen durch pathogene bakterielle Erreger wie *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* und *Yersinia* in Deutschland. Im gleichen Zeitraum wurden 290.000 Krankheitsfälle verursacht durch *Norovirus*, *Rotavirus*, *Hepatitis A-Virus* und *Hepatitis E-Virus* gemeldet. Zu den durch Lebensmittel übertragbaren Viren zählen *Norovirus*, *Sapovirus*, *Hepatitis A-Virus*, *Hepatitis E-Virus*, *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Enterovirus*, *Adenovirus* und *Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus* (FSMEV). "Foodborne viruses" haben morphologische Gemeinsamkeiten - den meisten fehlt eine Virushülle. Unbehüllte Viren sind gegenüber Umwelteinflüssen stabiler als behüllte.

In der Lebensmittelindustrie sind Inaktivierungsmaßnahmen für bakterielle Erreger überwiegend gut untersucht. Für Viren liegen diesbezüglich relativ wenige Daten vor. Erkenntnisse, ob und in welchem Maße humanpathogene Viren durch technologische Prozesse, welche zur Haltbarmachung von Lebensmitteln oder im Rahmen der Zubereitung angewendet werden, inaktiviert werden können, sind für die Lebensmittelindustrie von Interesse. Zu diesen Verfahren gehören z. B. Erhitzung, Kryokonservierung, Säuerung etc. Daten zur Tenazität und Inaktivierung durch physikochemische Prozessierung liegen zwar für eine Reihe lebensmittelassoziierter humanpathogener Viren vor (Baert et al., 2009), für humanes Norovirus ist die Datenlage jedoch sehr begrenzt. Anhand der Ergebnisse aus Studien mit *Felines Calicivirus* (FCV), das häufig als Modellvirus für NV verwendet wird wurde deutlich, dass, abgesehen von Erhitzungsprozessen >70 °C, andere lebensmittelkonservierende Verfahren möglicherweise nicht ausreichend viruzid sind, um bei einer Kontamination mit NV ausreichenden Verbraucherschutz zu gewährleisten, zumal NV als prozessresistenter im Vergleich zu FCV eingeschätzt wird (Koopmans und Duizer, 2004).

Ziel eines von der AiF über den FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie) im Zeitraum von 2007 – 2009 geförderten Forschungsprojektes war es, Daten zur Tenazität und Inaktivierung von humanem Norovirus in ausgewählten Lebensmitteln unter dem Einfluss produkt-spezifischer Prozessparameter und Herstellungstechnologien zu ermitteln. Die Untersuchungen wurden mittels quantitativer real-time RT-PCR durchgeführt und ermöglichen aufgrund des Einsatzes von RNasen den Nachweis intakter Viruspartikel. Eine signifikante Reduktion humanpathogener Noroviren in verschiedenen Lebensmitteln konnte durch Hitzeeinwirkung beobachtet werden.

Baert, L., Debevere, J. & Uyttendaele, M. (2009) The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 83-94.

Koopmans, M. & Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 23-41.

4.13 Einfluss verschiedener Prozessfaktoren bei der Lebensmittelherstellung auf die Tenazität von Noroviren in Lebensmitteln

Anja Carl, Erika Jung-Körner, Claudia Kürzdörfer und Gesine Schulze
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Lebensmittelhygiene LM3/2, Erlangen
E-Mail: anja.carl@lgl.bayern.de

Neben der direkten Übertragung von Mensch zu Mensch spielt bei Noroviren die indirekte Übertragung via Lebensmittel eine große Rolle. So wird geschätzt, dass bis zu 16 % der Ausbrüche auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen sind (*De Witt et al., 2003*). Durch die epidemische Ausbreitung der Viren und die dadurch bedingte hohe Anzahl an Infektionen und Ausbrüchen in den letzten Jahren hat die Notwendigkeit des Virusnachweises in Lebensmitteln dabei zusätzlich an Bedeutung gewonnen.

Mittlerweile stehen routinetaugliche Methoden zum Nachweis von Noroviren in Lebensmitteln zur Verfügung. Mit den vorhandenen molekularbiologischen Verfahren wird hierbei die virale Nukleinsäure detektiert. Ein Zusammenhang zwischen positivem Nukleinsäurenachweis und Infektiosität der Viren kann jedoch bislang nicht eindeutig hergestellt werden. Dementsprechend ist es von großem Interesse, inwiefern sich prozesstechnische Verfahren bei der Lebensmittelherstellung auf die Infektiosität des nachgewiesenen Agens auswirken.

Im Rahmen eines Projektes wurde daher der Einfluss verschiedener, für die Lebensmittelherstellung relevanter Prozessfaktoren (Temperatur, pH-Wert, Trocknung, Kochsalz- und Pökelsalzkonzentration) auf die Tenazität von Noroviren untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, durch welche Prozesse die Viren sicher abgetötet werden können und inwieweit vom positiven Nukleinsäurenachweis auf ein infektionstüchtiges Viruspartikel geschlossen werden kann. Da humane Noroviren bislang *in vitro* nicht anzüchtbar sind, wurde für die Infektionsversuche ein kultivierbares Virus-Modellsystem mit murinen Noroviren etabliert. Das murine Norovirus hat sich hierbei als geeignetes, ähnlich umweltstabiles und in der Zellkultur anzüchtbares Norovirusurrogat erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit werden erste Ergebnisse vorgestellt und mögliche Auswirkungen auf die weitere Handhabung viruspositiver Proben diskutiert.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert.

4.14 Untersuchungen zum Einfluss technologischer Prozesse auf die Tenazität und Inaktivierungskinetik von ausgewählten viralen Infektionserregern in Rohwurstprodukten

Thiemo Albert¹, Jill Manteufel², Juliane Straube², Janin Heinze¹, Uwe Truyen² und Karsten Fehlhaber¹

Zentrum für Veterinary Public Health, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

¹Institut für Lebensmittelhygiene

²Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

E-Mail: albert@vetmed.uni-leipzig.de

Verschiedene Viruserkrankungen des Menschen sind über kontaminierte Lebensmittel übertragbar. Vor allem roh zu verzehrende Lebensmittel können hierbei Risikoprodukte darstellen. Aufgrund dieser Problematik ergeben sich sowohl Fragen zur Tenazität relevanter Viren in Lebensmitteln als auch zur Beeinflussbarkeit der Inaktivierungskinetik viraler Erreger durch lebensmitteltechnologische Prozesse.

In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen eines Forschungsvorhabens^{**} Daten für Rohwurstprodukte erarbeitet. Die Untersuchungen erfolgten mit Felinen Caliciviren (FCV) als Modell für Noroviren, ECHO (Enteric cytopathogenic human orphan)-Viren sowie niedrigpathogenen Geflügelinflenzaviren (H5N6, H3N8). Anhand von *in vitro*-Modellen wurde dabei vorab der Einfluss von NaCl, NaNO₂ und D/L-Milchsäure in Abhängigkeit zur Temperatur überprüft. Aufbauend auf diesen Ergebnissen, wurden in dem hier vorgestellten Teilprojekt experimentell kontaminierte kurz- und langgereifte Rohwürste hergestellt und der Titerverlauf in Abhängigkeit verschiedener Reife- und Lagerungs-temperaturen überprüft.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass FCV und ECHO-Viren in kurz- und lang-gereiften Rohwürsten auch nach 28 bzw. 56 Tagen nachgewiesen werden konnten. Während Reifung und Lagerung war jedoch eine signifikante Titerabnahme festzustellen. Eine deutlich geringere Tenazität konnte für Geflügelinflenzaviren H3N8 und H5N6 festgestellt werden.

In allen Versuchsreihen hatte die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Inaktivierungskinetik aller geprüften Viren. Im Vergleich zu Produkten, die nur unter Kühlbedingungen (7 °C) gereift und gelagert wurden, erfolgte in Rohwürsten nach Reifung und Lagerung bei höheren Temperaturen (22–18 °C) eine signifikant stärkere Virustiterreduktion.

Mit den Ergebnissen des Forschungsvorhabens stehen herstellenden Betrieben erstmals detaillierte Daten zur Tenazität relevanter lebensmittelassoziierter Viren in Rohwurstprodukten zur Verfügung. Demnach kann das gesundheitliche Risiko vor allem durch eine gezielte Temperaturführung während Reifung und Lagerung der Produkte deutlich minimiert werden.

^{**}Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) via AiF über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. AiF-Projekt Nr. AiF-FV 15189 BR

4.15 Prädiktive Modelle der druck- und temperaturabhängigen Kurzzeit-Inaktivierung Lebensmittel-übertragener Viren

Sonja Isbarn¹, Roman Buckow², Hartmut Quader³, Alexander Mathys⁴, Volker Heinz⁵, Dietrich Knorr⁴ und Anselm Lehmacher¹

¹Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg

²Innovative Foods Centre, Food Science Australia, Werribee, Australia

³Universität Hamburg, Department Biologie, Abteilung Zellbiologie der Pflanzen und Phykologie, Hamburg

⁴Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmittelbiotechnologie und -prozessechnik, Berlin

⁵Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik, Quakenbrück

E-Mail: anselm.lehmacher@hu.hamburg.de

Die Kurzzeit-Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln bietet nicht nur wirtschaftliche Vorteile sowie eine längere Haltbarkeit und Frische, sondern gewährleistet auch, dass Inhaltsstoffe und Aroma nicht verändert werden, was ein entscheidender Vorteil gegenüber thermischen Entkeimungsmethoden darstellt. Besonders roh verzehrbare Lebensmittel dienen als Vehikel zur Übertragung von Viren und ergeben so ein gesundheitliches Risiko. Zur Inaktivierung der Viren bietet sich hier eine Hochdruckbehandlung an.

Feline Caliciviren, als Surrogat für Noroviren, humane Rotaviren und aviäre Influenza A Viren wurden um mehr als 5 Zehnerpotenzen, gemessen in plaque forming units, reduziert, nachdem die Viren maximal 1 Minute bei 15°C mit 500 MPa in Zellkulturmedien und relevanten Lebensmitteln behandelt wurden. Für den Coxsackievirus B5 war bei gleicher Inaktivierungszeit ein Druck von 800 MPa und eine Temperatur von 40°C erforderlich. Feline Caliciviren, humane Rotaviren und aviäre Influenza A Viren zeigten im Vergleich zum Coxsackievirus B5 ein Tailing in den Druck- und Hitzeinaktivierungskurven. Die Modellierungen der Daten in Druck-Temperatur-Diagrammen bieten bei gegebenen Druckhaltezeiten Vorhersagen für möglichst effektive und wirtschaftliche Kurzzeitbehandlungen.

Elektronenmikroskopische Bilder der behandelten Rotaviren zeigen mit zunehmenden Druck die Zerstörung des umhüllenden Nukleokapsids und das Heraustreten des inneren Cores der Viren. Diese Untersuchungen belegen die inaktivierende mechanische Wirkung des Hochdrucks auf Viren bildhaft.

4.16 Hitzestabilität von Hepatitis E-Viren

Anika Schielke, Bernd Appel und Reimar Johne
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
E-Mail: Anika.Schielke@bfr.bund.de

Das Hepatitis E-Virus (HEV) ist der Auslöser einer akuten Hepatitis mit einer Letalitätsrate zwischen 0,5 % und 4 %; bei schwangeren Frauen kann der fulminante Verlauf der Erkrankung zu einer höheren Letalitätsrate von bis zu 20 % führen. HEV ist in vielen Entwicklungsländern endemisch und auch in Deutschland steigt die Anzahl der Hepatitis E-Fälle in den letzten Jahren stetig an. Berichte über Hepatitis E-Erkrankungen nach dem Verzehr nicht ausreichend erhitzter Leber von Wildtieren legen ein zoonotisches Potenzial des HEV Genotyps 3 nahe und der Verzehr von Wildschweinfleisch gilt als Risikofaktor für den Erwerb einer Hepatitis E.

Die Untersuchungen zur Hitzestabilität von HEV sind wegen der Schwierigkeiten einer effizienten Virusvermehrung in der Zellkultur bisher sehr lückenhaft. Die eine der Untersuchungen ermittelte Inaktivierungstemperaturen zwischen 56 °C und 60 °C; Genotyp 2 scheint dabei etwas stabiler zu sein als Genotyp 1. Die andere Studie ermittelte für Genotyp 3, dass die Viren nach einer Inkubation bei 70 °C für 10 min nicht mehr mit Hilfe der verwendeten Zellkultur nachgewiesen werden konnten.

In dieser Studie wurde nun für die Untersuchung der Hitzestabilität von HEV ein molekularbiologischer Ansatz verwendet, bei dem zwischen intakten und geschädigten Viren unterschieden werden kann. Dafür wurden Leberhomogenate eines Wildschweins, das zuvor positiv auf HEV getestet wurde, bei verschiedenen Temperaturen für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von RNase A die freie RNA abgebaut, so dass nur intakte und deshalb wahrscheinlich infektiöse Viren mittels anschließender Real-time RT-PCR detektiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass HEV bei 4 °C länger als 3 Wochen, bei Raumtemperatur und 37 °C länger als sieben Tage infektiös bleibt. Auch nach einer Inkubation bei 60 °C für 30 min beziehungsweise 60 Minuten waren noch intakte Viren detektierbar. Die Erhitzung der Leberproben auf 70 °C für zwei Minuten führte zu einer Inaktivierungsrate von circa 66 %. Nach 90 Minuten bei 70 °C konnten keine Viren mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die generell übliche Empfehlung, Fleisch vor dem Verzehr für mindestens 2 Minuten auf 70 °C zu erhitzen, keinen absolut sicheren Schutz vor einer Hepatitis E-Infektion bietet und dass weitere Untersuchungen hierzu notwendig sind.

5 Poster

P1: Infektion von Hausschweinen mit einem humanen *Hepatitis E Virus*-Stamm: pathohistologische Befunde und Nachweis viraler RNA in verschiedenen Organen und Geweben

Christine Bächlein¹, Frauke Seehusen², Sven Pischke³, Heiner Wedemeyer³,
Wolfgang Baumgärtner², Beatrice Grummer¹

¹Institut für Virologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

²Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

³Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover

E-Mail: christine.baechlein@tiho-hannover.de

Das *Hepatitis E Virus* (HEV) verursacht eine fäkal-oral übertragene Hepatitis. In Entwicklungsländern kommt HEV endemisch beim Menschen vor, spezifische Antikörper werden jedoch weltweit nachgewiesen. Als ein Grund für die wachsende Anzahl klinischer Hepatitis E-Fälle, die in keinem Zusammenhang mit einer Reisehistorie stehen wird ein Tierreservoir für HEV diskutiert. Aus mehreren Studien geht hervor, dass Haus- und Wildschweine als ein solches Reservoir fungieren können und dass HEV auch über ungenügend erhitztes Fleisch auf den Menschen übertragen werden kann.

Um einen besseren Einblick in das Replikationsverhalten von HEV in Hausschweinen zu erhalten, wurden fünf Läuferschweine mit einem humanen Isolat infiziert, welches von einem chronisch mit HEV infizierten Patienten stammte. Jedes Tier erhielt zwei Milliliter des humanen Serums intravenös. In Abständen von einer Woche nach der Infektion (p.i.) wurde jeweils ein Schwein getötet und die Organe sowohl makroskopisch als auch histologisch beurteilt.

Keines der Tiere zeigte klinische Symptome während des Versuches. Bei keiner der Lebern konnten makroskopische Auffälligkeiten festgestellt werden. In der histopathologischen Untersuchung sechs Tage p.i. wurde eine mittelgradige lymphohistiozytäre Hepatitis und Pericholangitis diagnostiziert. Alle anderen Tiere wiesen lediglich eine milde lymphohistiozytäre Hepatitis auf. Andere pathohistologische Befunde deuteten auf eine Infektion mit dem *Porcinen Cirovirus 2* hin. Dies konnte in allen Tieren mittels Immunhistologie und *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden. Aus Organproben wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR virale RNA in diversen Organen und Geweben nachgewiesen, darunter Leber, Galle, Lymphknoten, Niere und Filetmuskulatur. Mittels Sequenzierung wurde der in Europa am häufigsten auftretende HEV-Genotyp 3 identifiziert.

P2: Molekularbiologischer Nachweis von Viren in Lebensmitteln im Erkrankungszusammenhang – und dann?

Matthias Contzen

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Lebensmittelmikrobiologie, Fellbach

E-Mail: Matthias.Contzen@cvuas.bwl.de

An Methoden für den molekularbiologischen Nachweis von Viren aus den verschiedensten Lebensmittelmatrices wird mittlerweile seit über zehn Jahren intensiv gearbeitet. Dennoch ist die Virusdetektion nach wie vor kein in der Routinediagnostik der meisten lebensmitteluntersuchenden Labors etabliertes Verfahren. Selbst in den Labors, die sich intensiver mit der Problematik auseinandersetzen und entsprechend mehr Erfahrung sammeln konnten, ist der erfolgreiche Nachweis von beispielsweise Noro- oder Rotaviren aus Lebensmitteln eher als seltenes Highlight anzusehen.

Allerdings ist auch der tatsächlich erfolgte Nachweis lebensmittelassoziierter Viren als allein-stehender Befund aus epidemiologischer, wie auch lebensmittelrechtlicher Sicht zunächst nur von begrenztem Wert. Um den kausalen Zusammenhang von viral kontaminierten Speisen mit aufgetretenen Erkrankungsfällen herstellen zu können, müssen zahlreiche weitere Faktoren abgeklärt werden.

Anhand eines Beispiels aus der Praxis der Lebensmittelüberwachung – dem Nachweis von Rotaviren in Kartoffeleintopf im Zusammenhang mit einer Gruppenerkrankung in einer Mutter-Kind-Klinik – soll diskutiert werden, welche Fragestellungen der Virus-Befund aufwirft. Welche Fragen müssen gegebenenfalls von anderer Seite beantwortet werden oder bleiben offen? Welche Anforderungen müssen erfüllt sein, um einen epidemiologisch schlüssigen und letztendlich auch für die lebensmittelrechtliche Bewertung verwendbaren Gesamtbefund zu erstellen?

P3: Aufgaben und Tätigkeiten des Nationalen Referenzlabors für die Überwachung von Viren und Bakterien in zweischaligen Weichtieren (virologischer Teil)

Reimar Johne, Ralf Pund, Lüppo Ellerbroek, Christina Schrader
Budesinstitut für Risikobewertung, Berlin
E-Mail: Reimar.Johne@bfr.bund.de

Virus-bedingte Krankheitsausbrüche beim Menschen nach dem Verzehr roher Muscheln wurden in der Vergangenheit häufig beobachtet. Zu den größten Ausbrüchen, die auf eine Virusübertragung über Muscheln zurückgeführt werden, zählt eine Epidemie in Shanghai, die im Jahr 1988 zu 300.000 Hepatitis A-Fällen führte. Neuere mit Muscheln assoziierte Ausbrüche in Europa betreffen vor allem durch Noroviren ausgelöste Gastroenteritiden. Die Viren gelangen gewöhnlich über fäkal kontaminiertes Abwasser in die Muschelerntegebiete und werden durch Filtration in den Muscheln angereichert. Zur Verhinderung von Erkrankungen durch den Verzehr von Muscheln wurden in Deutschland auf der Basis von EU-Beschlüssen verschiedene Kontrollmaßnahmen, vor allem in den Erzeugungsgebieten, umgesetzt, zu denen seit dem Jahr 2000 auch die Einrichtung eines Nationalen Referenzlabors (NRL) gehört.

Die NRLs sind für den gesundheitlichen Verbraucherschutz von zentraler Bedeutung. Auf der Basis der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 werden gemeinsam mit den Behörden der Länder in Deutschland die Standards erarbeitet, nach denen die in der Lebensmittelüberwachung tätigen Untersuchungslaboratorien arbeiten. Konkrete Aufgaben sind (i) die Koordinierung der Tätigkeiten der nationalen Laboratorien, die mit den virologischen Muschelanalysen beauftragt sind, (ii) die Unterstützung der zuständigen Behörden bei der Gestaltung des Kontrollsystems auf dem Gebiet der viralen Muschelkontaminationen, (iii) die Sicherstellung der Durchführung regelmäßiger Vergleichstests zwischen den verschiedenen nationalen Laboratorien, die mit den genannten Analysen beauftragt sind und (iv) die Weitergabe von Informationen des Community Reference Laboratory for Monitoring Bacteriological and Viral Contamination of Bivalve Molluscs.

Darüber hinaus werden am NRL Nachweisverfahren für Viren in Muscheln etabliert und weiterentwickelt. Die Methode der Wahl zur Detektion von Viren in Muscheln stellt derzeit der molekularbiologische Nachweis des Virusgenoms mittels RT-PCR dar, obwohl geringe Viruskonzentrationen und das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren im Untersuchungsmaterial den Nachweis erschweren. Weiterhin werden Tenazitäts-Untersuchungen an artifiziell mit Viren kontaminierten Muscheln durchgeführt, die einerseits Aufschluss über die Dauer einer Gesundheitsgefährdung nach einer Kontamination von Muscheln geben sollen, andererseits auch die Effektivität von Reinigungsmaßnahmen nach Kontaminationsereignissen ermitteln sollen.

P4: Nachweis von Viren in Lebensmitteln – Bestimmung der Effizienz der RNA-Extraktion anhand der Prozesskontrolle mit dem Phagen MS2

Dietrich Mäde, Katja Trübner, Marion Grosser
Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich 3 – Lebensmittelsicherheit,
Halle (Saale)
E-Mail: dietrich.maede@lav.ms.sachsen-anhalt.de

Zum Nachweis von Viren auf Bedarfsgegenständen und Lebensmitteln mit festen glatten Oberflächen wurde eine auf real-time PCR basierende Untersuchungsmethode entwickelt, die in die amtliche Sammlung nach § 64 LFGB eingegangen ist. Wie in jedem molekularbiologischen Verfahren der Lebensmittelanalytik ist es auch bei dem Nachweis von Noroviren erforderlich, die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA zu überprüfen, um falsch negative Ergebnisse infolge Inhibition der enzymatischen Reaktionen auszuschließen. Die Amplifikationskontrolle wird bei dem Nachweis von Noroviren als Prozesskontrolle, beginnend mit der Virusextraktion, durchgeführt. Diese wird entsprechend der amtlichen Methode als Prozesskontrolle mit dem einzelsträngigen RNA-Phagen MS2 durchgeführt. Da die real-time PCR eine quantitative Auswertung der Ergebnisse gestattet, sollte es möglich sein, durch Vergleich der eingesetzten Menge des Phagen MS2 mit der in der Probe nachgewiesenen Menge die Effizienz der Virusextraktion zu bestimmen.

Der Phage MS2 wurde auf LBMM-Agar in LBMM-Weichagar in *E. coli* TOP 10F vermehrt. Aus dem Weichagar wurden die Phagen isoliert und quantifiziert. Für die Standardreihe des Phagen MS2 wurden 28.000 pfu verwendet. Die RNA wurde in sechs Fünffach-Verdünnungsstufen, beginnend mit einer 1:5-Verdünnung eingesetzt. Dies entsprach einer Reihe von 465; 93; 18,6; 3,72; 0,744 und 0,148 pfU/rxn. Anhand von 37 Tupferproben der Routinediagnostik, eingesandt in den Monaten August und September 2008 mit Verdacht auf Noroviruskontamination, wurden das quantitative Verfahren geprüft.

Die Standardreihe umfasste den Bereich von ct 25 bis ct 36. Proben und mitgeführte Kontrollen ergaben sowohl in unverdünnter als auch 1:5 verdünnter Konzentration die gleichen ct-Werte. Ausgehend von den ct-Werten der 1:5 verdünnten Proben konnte bei über 70 % der Proben eine Wiederfindung der MS2-Phagen von mehr als 50 % ermittelt werden.

Aus lebensmittelvirologischen Untersuchungen der vergangenen Jahre ergab sich die Notwendigkeit, die Effizienz von Methoden zur Elution der Viren und zur RNA-Extraktion zu vergleichen. Die Verwendung des apathogenen Phagen MS2 gestattet eine einfache quantitative Bestimmung der Wiederfindung. In der durchgeführten Untersuchungsreihe wurde die Wiederfindung exemplarisch anhand von Tupferproben bestimmt. Es war bekannt, dass bei einem Großteil der unverdünnten RNA-Extrakte Inhibitionen der real-time RT-PCR auftreten, so wurden zur Auswertung die 1:5 verdünnten Extrakte herangezogen. Wiederfindungsraten von mehr als 50 % werden als ausreichend angesehen. Dies ist bei der Mehrzahl der Proben der Fall. Mit diesem Verfahren wurde die Eignung der Methode Untersuchung von Lebensmitteln und Umgebungsproben auf humanpathogene Viren durch Tupferproben bewiesen.

P5: Untersuchungen zur Inaktivierung von FSME-Viren in Milch und zum Vorkommen von FSME bei Ziegen

Regine Saier und Jörg Hinrichs

Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,

Fg. Lebensmittel tierischer Herkunft, Stuttgart Hohenheim

E-Mail: saierreg@uni-hohenheim.de

Die Frühsommermeningoencephalitis (FSME) ist die bedeutendste durch Zecken übertragene Viruserkrankung Europas und eine klassische Zoonose. Der Auslöser der FSME gehört zum Genus *Flavivirus* in der Familie der *Flaviviridae* und wird im Allgemeinen direkt durch den Stich einer infizierten Zecke (*Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*) übertragen. Dies gilt für den Menschen gleichermaßen wie für milchliefernde Nutztiere. Bei diesen können während der Infektion über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen FSME-Viren mit der Milch ausgeschieden werden. Im Sommer 2008 infizierten sich in Österreich mehrere Personen beim Verzehr von Rohmilch-Ziegenfrischkäse mit FSME-Viren. Die Ausscheidung der Viren mit der Milch während des Infektionsgeschehens stellt somit eine potentielle Gefahr beim Konsum von Milch und der daraus hergestellten, insbesondere der nicht pasteurisierten Produkte dar.

Die Tenazität des in Süddeutschland auftretenden FSME-Virusstamms Hypr wurde in roher Magermilch untersucht. Die Milch wurde hierfür mit Viren in einer Konzentration von 4×10^8 KID₅₀ ml⁻¹ (kulturinfektiöse Dosis) versetzt. Im Zellkulturtest auf *porcine stable kidney* (PS) Zellen kann die Infektiosität durch Auftreten eines cytopathischen Effekts (CPE) festgestellt und die Konzentration durch Berechnung der KID₅₀ ml⁻¹ bestimmt werden. Bei Lagerung von 8 °C verringerte sich die Konzentration über die Dauer von 15 Tagen nur geringfügig. Zur Ermittlung der Thermostabilität wurde die mit Viren versetzte rohe Magermilch in bei der Milcherhitzung relevanten Bereichen (65 – 80 °C) im Thermocycler erhitzt. Nach Erreichen einer Temperatur von 75 °C bzw. 80 °C wurde nach einer Heißhaltezeit von 15 Sekunden noch 2×10^3 KID₅₀ ml⁻¹ bzw. 7×10^2 KID₅₀ ml⁻¹ festgestellt.

Bei der Untersuchung von Ziegenblut auf das Vorkommen von Antikörpern gegen FSME-Viren bei Ziegenherden aus verschiedenen Landkreisen in Baden-Württemberg wurden mit einem kommerziellen ELISA-Kit (Immunozytm FSME IgG All Species, PROGEN BIOTECHNIK) Seroprävalenzen von 0 bis 5,3 % festgestellt.

Ziel der Untersuchungen ist es, durch die kombinierte Beschreibung des Inaktivierungsverhaltens von FSME-Viren bei thermischer Behandlung von Milch und von FSME-Antikörperseroprävalenzen eine Empfehlung zur Verarbeitung von Milch in der jeweiligen Region abzuleiten.

P6: Nachweis von Rotaviren und Noroviren in Umgebungsproben und Lebensmitteln zur Aufklärung von Übertragungswegen

Kathrin Scherer¹, Reimar Johné¹, Lüppo Ellerbroek¹, Jörg Schulenburg² und Günther Klein³

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

²Zentralinstitut Sanitätswesen der Bundeswehr, Kiel

³Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelhygiene und -sicherheit, Hannover

E-Mail: Kathrin.Scherer@bfr.bund.de

Noroviren und Rotaviren gelten als die häufigste Ursache nicht bakteriell bedingter Gastroenteritiden des Menschen weltweit. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral entweder direkt von Mensch zu Mensch oder indirekt über kontaminierte Oberflächen, Lebensmittel und Getränke. Bei vielen lebensmittelbedingten Ausbrüchen lässt sich jedoch das verursachende Agens mangels sensitiven und verlässlichen Methoden nicht mehr nachweisen. Geeignete Methoden für den Nachweis von Viren in Lebensmitteln und Umgebungsproben werden jedoch zur Aufklärung von Ausbruchsursachen benötigt, sowie zum vorbeugenden Screening häufig kontaminierter Lebensmittel.

In der vorgestellten Untersuchung wurden verschiedene Systeme zum Nachweis von Viren in Lebensmitteln und Umgebungsproben etabliert und miteinander verglichen. Der molekularbiologische Nachweis erfolgte mittels real-time RT-PCR. Folgende Ergebnisse wurden erzielt: Die Tupfermethode für Lebensmittel mit glatter Oberfläche und Umgebungsproben besitzt bei einer Beprobungsfläche von 100 cm² eine niedrige untere Nachweisgrenze (2 RT-PCR Units (RT-PCRU) für Noroviren bzw. 2 KID für Rotaviren). Für den Nachweis von Viren in bestimmten Lebensmittelgruppen (Schinken, Salat, Himbeeren) konnte das Elution-Präzipitationsverfahren erfolgreich etabliert werden. Mittels dieses Verfahrens ließen sich, je nach getesteter Lebensmittelmatrix, 20 bis 200 RT-PCRU Noroviren bzw. KID Rotaviren pro 10 g Probe nachweisen. Die Wiederfindungsraten für Noroviren betragen im Mittelwert für Salat 23 %, für Schinken 24 % und für Himbeeren 1 %. Für Rotaviren ließen sich Wiederfindungsraten von 12 % für Salat, 15 % für Schinken und 2 % für Himbeeren ermitteln.

Die beschriebenen Methoden sind für den Nachweis von Viren in den getesteten Umgebungsproben und Lebensmitteln geeignet und können im Rahmen einer Ausbruchsuntersuchung eingesetzt werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch zur Verbesserung der geringen Wiederfindungsraten von Viren in Beeren erforderlich, die möglicherweise auf das Vorhandensein von Inhibitoren zurückzuführen sind.

P7: Sephacryl® Säulen zur Entfernung von PCR-Inhibitoren in Himbeeren

Kathrin Scherer¹, Reimar Johne²

¹ Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit

² Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

E-Mail: Kathrin.Scherer@bfr.bund.de

Die zur Familie der Caliciviren gehörenden Noroviren sind weltweit verbreitet und gelten derzeit als häufigste Ursache nicht-bakteriell bedingter Gastroenteritiden des Menschen. Dem Robert Koch-Institut wurden im Jahr 2008 ca. 212.000 Erkrankungen gemeldet; eine stete Steigerung ist seit 2001 zu beobachten. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral entweder direkt von Mensch zu Mensch oder indirekt über kontaminierte Oberflächen, Lebensmittel und Getränke. Die Infektiosität von Noroviren ist sehr hoch, wobei 10-100 Viruspartikel zur Auslösung einer Erkrankung ausreichen. Ein Grossteil der Norovirus-Ausbrüche ist lebensmittelbedingt, insbesondere mit Norovirus kontaminierte Himbeeren sind in mehreren europäischen Ländern als Ausbruchsursache identifiziert worden. Der Nachweis von Viren in Lebensmitteln gestaltet sich allgemein schwierig aufgrund der geringen Konzentration und der heterogenen Verteilung der Viren im Lebensmittel. Darüber hinaus verhindern oft inhibitorische Substanzen, insbesondere in Beeren, den molekularbiologischen Nachweis der Viren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein chromatographisches Verfahren unter Verwendung von Sephacryl® Säulen zur Entfernung von PCR-Inhibitoren in Himbeeren getestet. Die verwendeten Säulen entfernen niedermolekulare Substanzen in nur einem einzigen kurzen Zentrifugationsschritt aus der RNA-Präparation. Für die Untersuchungen wurden verschiedene Beeren-Aufbereitungen mit Norovirus inokuliert und anschließend die RNA mittels eines kommerziellen Kits extrahiert. Die Real-time PCR Ergebnisse der über eine Sephacryl® Säule gereinigten RNA-Proben wurden mit denen ohne Aufreinigung verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich PCR-inhibitorische Substanzen in Beeren effizient mittels Sephacryl® Säulen entfernen lassen, ohne dabei den RNA-Gehalt zu beeinflussen. Im Vergleich zu RNA-Präparationen, die direkt aus dem Beeren-Lysat nur über Silica-basierte Kits aufgearbeitet worden waren, konnten bei zusätzlicher Verwendung der Sephacryl® Säulen bis zu 100mal bessere Wiederfindungsraten erreicht werden. Beim Vergleich mit komplexeren Aufreinigungs-Methoden mittels vorgeschalteter Elution/Präzipitation und Chloroform/Butanol-Behandlung führte der Einsatz der Sephacryl® Säulen allerdings kaum zu Verbesserungen, was darauf hinweist, dass bei diesen Protokollen bereits eine effektive Entfernung der Inhibitoren erfolgt war. Die ermittelten Wiederfindungsraten waren in beiden Fällen mit Werten zwischen 0,1 % und 1 % sehr gering. Es wird geschlussfolgert, dass neben einer effizienten Entfernung von inhibitorischen Substanzen eine Optimierung sowohl der Ablösung der Viruspartikel von Beeren als auch der anschließenden Viruskonzentration erforderlich ist.

P8: Wildschweine als Reservoir für Hepatitis E-Viren in Deutschland

Anika Schielke¹, Andreas Jansen², Michael Lierz³, Katja Sachs⁴, Bernd Appel¹,
Reimar Johne¹

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

²Robert Koch Institut, Berlin

³Freie Universität Berlin, Fakultät für Veterinärmedizin

⁴Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Bad Langensalza
E-Mail: Anika.Schielke@bfr.bund.de

Infektionen mit dem Hepatitis E-Virus (HEV) verursachen eine akute Hepatitis, die meist durch Fieber, Glieder- und Oberbauchschmerzen sowie Gelbsucht gekennzeichnet ist. Die Letalitätsrate liegt zwischen 0,5 % und 4 %; bei schwangeren Frauen kann allerdings der fulminante Verlauf der Erkrankung zu einer höheren Letalitätsrate bis zu 20 % führen. Die Anzahl der in Deutschland gemeldeten Hepatitis E-Fälle ist in den letzten Jahren stetig gestiegen; für 2008 wurden 104 Infektionen an das Robert Koch Institut übermittelt. Der größte Teil dieser Infektionen wurde in Deutschland erworben. Die Ursache dieser autochthonen Fälle ist noch nicht abschließend geklärt. Berichte über Hepatitis E-Erkrankungen nach dem Verzehr nicht erhitzter Leber von Wildtieren legen jedoch ein zoonotisches Potenzial nahe und der Verzehr von Wildschweinfleisch gilt als einer der Risikofaktoren für eine Hepatitis E-Infektion.

Um die Verbreitung von HEV in der Wildschwein-Population in Deutschland besser beurteilen zu können, wurden nun 148 Leberproben von Wildschweinen aus verschiedenen Bundesländern mittels Real-time RT-PCR auf HEV-RNA untersucht. Während in dem städtischen Gebiet um Berlin/Potsdam nur etwa 4,1 % der untersuchten Leberproben positiv auf HEV-RNA waren, wurden für die Bundesländer Brandenburg und Thüringen Prävalenzen von 25,9 % beziehungsweise 23,8 % ermittelt. Dies zeigt, dass in den Wildschwein-Populationen aus ländlichen Gebieten eine relativ hohe HEV-Prävalenz vorliegt, wohingegen bei den Wildschweinen aus den städtischen Gebieten HEV-Infektionen seltener sind. Die genaue Charakterisierung der gefundenen HEV-Stämme zeigte eine Zugehörigkeit aller Viren zu Genotyp 3, wobei viele unterschiedliche Subtypen in Abhängigkeit ihrer geografischen Herkunft auftraten. Für ein Wildschwein-Isolat aus Brandenburg wurde eine sehr hohe Sequenz-Homologie von 97,9 % zu einem humanen Isolat aus Berlin vorgefunden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zumindest einige autochthone HEV-Fälle in Deutschland auf den Verzehr von Wildschweinfleisch zurückzuführen sind und dass das Wildschwein als Reservoir für HEV anzusehen ist.

P9: Viren im Trinkwasser

Wilfried Soddemann

Epidemiologe und freier Wissenschaftsjournalist, Everswinkel

E-Mail: soddemann-aachen@t-online.de

Norovirus- und Rotavirus-Infektionen werden durch Fäkalien entweder in Lebensmitteln oder im Trinkwasser ausgelöst, bevor sie sekundär übertragen werden können, besonders augenfällig in Krankenhäusern, Altenheimen, Schulen und/oder Kindergärten.

In unseren Gewässern, auch im Grundwasser, werden Viren nachgewiesen. Unsere konventionellen Wasserwerke können Viren regelmäßig nicht filtern. Kaltes Wasser konserviert ansteckende Viren. Offensichtlich folgen die Norovirus- und Rotavirus-Infektionen jedes Jahr streng dem Verlauf der Kälte im Wasser und in den Wasserleitungen. Unsere Lebensmittel haben das ganze Jahr über in etwa die gleiche Temperatur. Das Trinkwasser nicht. Es hat sein Temperaturminimum zum Ausgang des Winters im Februar/März (beim Maximum der Kältesumme). Also muss das Trinkwasser das abiotische Vehikel sein, das die Norovirus- und Rotavirus-Infektionen überwiegend auslöst.

Ultrafiltration kann Viren aus dem Trinkwasser filtern, ohne Zusatz von Chemikalien. Es entstehen zusätzliche Kosten von lediglich 5 Euro pro Person und Jahr, für eine vierköpfige Familie also nicht einmal 2 Euro im Monat.

Vorsorgende Gesundheitspolitik muss Infektionsketten erkennen und durchbrechen. Wirkungsvolle Trinkwasseraufbereitung wird die Kosten im Gesundheitswesen senken, auch bei anderen durch Trinkwasser übertragenen Infektionen z.B. durch Legionellen, Adenovirus, Kryptosporidiose, Giardiasis, Campylobacter, E.-coli-Enteritis, EHEC/STEC, Salmonellose, Yersiniose. Auch die H5N1-Vogelgrippe und die neue entdeckte H1N1 Schweinegrippe, die häufig zu Erbrechen und Durchfall und damit zur Belastung von Ab- und Gewässern führt, kann mit dem Trinkwasser übertragen werden.

Eine epidemiologische Analyse kommt zu dem Ergebnis, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit sogar die saisonale Influenza durch das Trinkwasser primär ausgelöst wird. Das Infragestellen von Lehrmeinungen ist Wissenschaft!

Links

<http://sites.google.com/site/trinkwasservirenalarm/Trinkwasser-Viren?pageUrlChanged=Trinkwasser-Viren>

<http://www.springerlink.com/content/x6138263qn388085/>

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz

Volume 50, Number 3 / März 2007

http://www.umg-verlag.de/umwelt-medizin-gesellschaft/206_m_ua.html

P10: Ermittlung der kompletten Genomsequenz eines Hühner-Rotavirus zur Abschätzung des zoonotischen Potenzials aviärer Rotaviren

Eva Trojnar^{1*}, Peter Otto², Reimar Johne¹

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

²Friedrich-Löffler-Institut, Jena

E-Mail: Eva.Trojnar@bfr.bund.de

Rotaviren der Gruppe A stellen eine Hauptursache für Gastroenteritiden beim Menschen dar. Kleinkinder sind hierbei besonders häufig betroffen und zeigen oft schwere Verläufe. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 77.501 Rotavirusinfektionen gemeldet. Rotaviren werden fäkal-oral übertragen, wobei indirekte Übertragungen über Trinkwasser und Lebensmittel möglich sind. Gruppe A-Rotaviren zählen auch bei verschiedenen Tierarten zu wichtigen Erregern von Jungtiererkrankungen, wobei wechselseitige Übertragungen zwischen Säugetieren und Menschen häufig beschrieben wurden. Dadurch existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Rotavirus-Typen, die sich durch Mutationen und den Austausch von Genomsegmenten ständig weiter entwickeln. Die Rotaviren der Vögel sind im Gegensatz dazu bisher nur wenig untersucht und zur Übertragbarkeit zwischen Geflügel und Menschen liegen nur wenige Daten vor.

Um humane und aviäre Rotaviren vergleichen zu können und Nachweismethoden für beide zu entwickeln, war zunächst die Ermittlung von aviären Rotavirus-Genomsequenzen nötig. In dieser Studie wurde die erste vollständige Genomsequenz (19.064 bp Länge) eines Hühner-Rotavirus, Stamm Ch-02V000G3, ermittelt. Für alle 11 Segmente des Genoms wurde nur ein geringer Verwandtschaftsgrad zu den Rotaviren der Säuger ermittelt, wohingegen eine engere Verwandtschaft zu anderen aviären Rotaviren festgestellt werden konnte. Andererseits sind die Genomenden, die wichtig für die Genexpression, Genomreplikation und Verpackung in infektiöse Viren sind, zwischen Säuger- und Hühner-Rotaviren fast identisch. Weitere Untersuchungen zeigen, dass aviäre Rotaviren zwischen verschiedenen Vogelarten übertragen werden können und Genomsegmente miteinander ausgetauscht werden können.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Säuger- und Geflügel-Rotaviren der Gruppe A eine unabhängige Evolution durchlaufen haben und sich an ihre Wirte angepasst haben. Übertragungen zwischen verschiedenen Vogelarten sind aber möglich. Ob ein Austausch genetischen Materials und die Übertragung von Geflügel-Rotaviren auf den Menschen auch möglich ist, muss in weiteren Studien ermittelt werden. Danach wird auch ein möglicher Übertragungsweg über kontaminiertes Geflügel-Fleisch zu untersuchen sein.

P11: Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“: Nagetiere als Reservoir für Lebensmittel-übertragene Erreger von humanen Durchfallerkrankungen?

Rainer G. Ulrich¹, Sandra S. Essbauer², Anika Schielke³, Paul Dremsek¹, Sebastian Günther⁴, Katrin Heidemans⁴, Martin H. Groschup¹, Thomas Vahlenkamp⁵, Marina Höhne⁶, Kati Keil⁷, Diana Riebold⁷, Lothar H. Wieler⁴, Reimar Johne³

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald - Insel Riems

²Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

³Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

⁴Freie Universität Berlin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Berlin

⁵Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, Greifswald - Insel Riems

⁶Robert Koch-Institut, Berlin

⁷Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten Parasitologisches Labor, Rostock

E-Mail: paul.dremsek@fli.bund.de

Mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes und der damit verbundenen Meldepflicht für ausgewählte humane Infektionskrankheiten ist die Kenntnis der Häufigkeit und geografischen Verbreitung von Lebensmittel-übertragenen Zoonoseerregern deutlich verbessert worden. Zu diesen Erregern gehören auch solche, bei denen Nagetiere eine Rolle als Reservoir spielen und somit epidemiologisch relevant für die Übertragung sein könnten. Außerdem gibt es bei Nagetieren Hinweise auf den humanpathogenen Erregern verwandte Pathogene, die möglicherweise zur Entwicklung von Tiermodellen dienen könnten.

Für Untersuchungen u.a. zu den genannten Fragestellungen wurde in Deutschland das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ etabliert, das eine intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit von Zoologen, Ökologen, Virologen, Mikrobiologen, Parasitologen, Genetikern, Epidemiologen, Forstwissenschaftlern und Klimaforschern mit Klinikern der Human- und Veterinärmedizin ermöglicht. Bisher wurden in Zusammenarbeit mit einer Vielzahl von Kooperationspartnern ca. 7.500 Nagetiere und andere Kleinsäuger in 14 Bundesländern gesammelt. Ein Standardprotokoll für die zentrale Sektion der Tiere und die nachfolgende Dokumentation von biometrischen Daten und Ergebnissen der serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen ermöglicht dabei zukünftig eine umfassende Beurteilung der Durchseuchung von Reserviertieren mit den verschiedenen Zoonoseerregern.

Erste Untersuchungen an 1.400 Darmproben von unterschiedlichen Nagetieren lieferten erstmals Hinweise auf das Vorhandensein darmpathogener *E. coli* (atypische enteropathogene *E. coli*; aEPEC) sowie unterschiedlicher Parasiten, wie den humanpathogenen Cestoden *Hymenolepis diminuta*. Bisher wurden bei diesen initialen Untersuchungen noch keine viralen Erreger gefunden.