

# **Lebensmittel-assoziierte Viren**

3. BfR-Symposium zu Lebensmittel-assoziierten Viren, 4. November 2015, Berlin

## **Impressum**

BfR Abstracts

Lebensmittel-assoziierte Viren  
3. BfR-Symposium am 4. November 2015

Für den Inhalt der Abstracts sind deren Autoren verantwortlich.

Bundesinstitut für Risikobewertung  
Max-Dohrn-Straße 8–10  
10589 Berlin

Berlin 2015  
37 Seiten

Druck: BfR-Hausdruckerei Marienfelde

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>	
<b>2</b>	<b>Programm</b>	<b>7</b>	
<b>3</b>	<b>Abstracts</b>	<b>9</b>	
3.1	Hepatitis E-Virus – Überblick und aktuelle Situation in Deutschland		<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Session I Epidemiologie und Ausbruchsuntersuchungen</b>		<b>11</b>
4.1	Rückverfolgungsanalysen zu einem europaweiten Hepatitis A-Ausbruch durch Tiefkühlbeeren		<b>11</b>
4.2	Ein Cateringbetrieb als Quelle eines Noroviren-Ausbruchs		<b>13</b>
4.3	Lebensmittelassoziierte Noroviren – Ausbrüche in Österreich		<b>15</b>
4.4	Hepatitis E-Virus bei Wildtieren von Truppenübungsplätzen		<b>17</b>
4.5	Querschnittsstudie zur HEV-Seroprävalenz bei Jägern im Wetteraukreis in Hessen, 2013		<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Session II Nachweismethoden und Typisierung</b>		<b>21</b>
5.1	Noro- und Rotavirusinfektionen – die aktuelle Situation in Deutschland		<b>21</b>
5.2	Inhibitorische Effekte von Fruchtsaft-Konzentraten auf das Screening von Lebensmittelassoziierten Viren mittels Reverse Transkriptase (RT) Real-Time PCR – ein Verbesserungsansatz		<b>23</b>
5.3	Foodproof Norovirus Detection Kit (GI, GII, GIV): Multiplex-PCR zur Differenzierung der human-pathogenen Noroviren in Lebensmitteln		<b>25</b>
5.4	Entwicklung eines sensitiven Verfahrens für den Nachweis von Hepatitis E-Viren in Roh- und Leberwurst		<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Session III Hygiene, Inaktivierung und Desinfektion</b>		<b>29</b>
6.1	Risiko viraler Kontamination in der landwirtschaftlichen Primärproduktion – Erfahrungen aus FVO-Audits		<b>29</b>
6.2	Studien zur viruziden Wirksamkeit von Räucherrauch		<b>31</b>
6.3	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur Stabilität und Morphologie von Noroviren		<b>33</b>
6.4	Optimierung eines Zellkultursystems für die Stabilitätstestung des Hepatitis E-Virus		<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Autorenverzeichnis</b>		<b>37</b>



## 1 Einleitung

Willkommen zum Symposium „Lebensmittel-assoziierte Viren“!

Wir freuen uns sehr, Sie zum dritten Symposium „Lebensmittel-assoziierte Viren“ hier in Berlin begrüßen zu dürfen. Nachdem bereits in den Jahren 2009 und 2012 Symposien zu diesem Thema durchgeführt worden waren, hat sich diese Tagung nun verstetigt und stellt eine wichtige Plattform im deutschsprachigen Raum für den Wissensaustausch auf dem Gebiet der über Lebensmittel übertragbaren Viren dar. Sie soll weitere Impulse für die Vernetzung der Forschung auf diesem Gebiet geben, gleichzeitig aber auch die sich aus den wissenschaftlichen Ergebnissen ergebenden Konsequenzen für die lebensmittelhygienische Praxis untersuchen.

Wie in den beiden vergangenen Symposien veranstaltet das BfR diese Tagung auch in diesem Jahr in enger Zusammenarbeit mit der „Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren“ (ALV). Diese Gruppe wurde 2003 als „freie Forschergruppe“ mit dem Ziel gegründet, sich auf nationaler Ebene mit Themen rund um den Nachweis, die Überdauerungsfähigkeit und Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln zu beschäftigen. Die ALV trifft sich regelmäßig zum Wissensaustausch, führt Ringversuche im Rahmen von Methodenentwicklungen durch und organisiert Workshops zu Nachweismethoden für Viren in Lebensmitteln.

Die Bedeutung der Übertragung von Viren über Lebensmittel hat in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen. Der Ausbruch von Norovirus-Gastroenteritis in Ostdeutschland im September/Oktober 2012, bei dem fast 11.000 Kinder und Jugendliche nach dem Verzehr von Norovirus-kontaminierten Tiefkühl-Erdbeeren erkrankten, hat die große Dimension dieser Thematik verdeutlicht. Die in Deutschland gemeldeten Fälle von Hepatitis E-Erkrankungen, bei denen eine zoonotische Übertragung über Lebensmittel von infizierten Schweinen und Wildtieren angenommen wird, nehmen stetig zu. Wenngleich in den letzten Jahren deutliche Fortschritte beispielsweise bei der Entwicklung von Nachweismethoden für Viren in Lebensmitteln erzielt werden konnten, besteht immer noch umfangreicher Forschungsbedarf, um die genauen Übertragungswege aufzuklären und geeignete Maßnahmen zur Verhinderung von Erkrankungen ergreifen zu können. Ein europaweiter, durch Hepatitis A-Virus-kontaminierte Tiefkühlbeeren verursachter Krankheitsausbruch machte darüber hinaus die neuen Herausforderungen bei der Analyse von Kontaminations- und Verbreitungswegen von Lebensmittel-assoziierten Viren deutlich.

Im Programm des Symposiums sollen Übersichtsvorträge die aktuelle Situation bei Hepatitis E-, Norovirus- und Rotavirus-Erkrankungen in Deutschland darstellen. Weitere Übersichtsreferate thematisieren Rückverfolgungsanalysen, Aufklärungen von Krankheitsausbrüchen sowie die Hygiene bei der internationalen Primärproduktion von pflanzlichen Lebensmitteln. Die drei wissenschaftlichen Sessions behandeln in aktuellen Kurzvorträgen Themen zur Epidemiologie, Diagnostik und Inaktivierung Lebensmittel-assoziiierter Viren. Wir hoffen, mit diesem Programm sowohl Interessierte aus wissenschaftlichen Einrichtungen als auch aus Untersuchungsämtern und Überwachungsbehörden ansprechen zu können und damit die wichtigsten Aspekte Lebensmittel-assoziiierter Virusinfektionen zu behandeln.

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

Professor Dr. Dr. Andreas Hensel

**Veranstalter:**

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

**Wissenschaftliche Organisation:**

Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren

**Tagungsleitung:**

Professor Dr. Reimar Johne

**Termin und Ort der Veranstaltung:**

4. November 2015  
10:00–17:30 Uhr

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

## 2 Programm

10:00–10:15 Uhr

### **Begrüßung**

Professor Dr. Bernd Appel, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

10:15–10:45 Uhr

### **Hepatitis E-Virus – Überblick und aktuelle Situation in Deutschland**

PD Dr. Jürgen Wenzel, Universität Regensburg

*10:45–11:15 Uhr Kaffeepause*

## **Session I – Epidemiologie und Ausbruchsuntersuchungen**

Chair: Professor Dr. Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

11:15–11:35 Uhr

### **Rückverfolgungsanalysen zu einem europaweiten Hepatitis A-Ausbruch durch Tiefkühlbeeren**

Dr. Armin Weiser, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

11:35–11:55 Uhr

### **Ein Cateringbetrieb als Quelle eines Noroviren-Ausbruchs**

Jürg Schmid, Amt für Verbraucherschutz und Veterinärwesen, St. Gallen, Schweiz

11:55–12:15 Uhr

### **Lebensmittelassoziierte Noroviren – Ausbrüche in Österreich**

Dr. Ingeborg Lederer, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Wien

12:15–12:35 Uhr

### **Hepatitis E-Virus bei Wildtieren von Truppenübungsplätzen**

Dr. Helena Anheyer-Behmenburg, Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Kiel

12:35–12:55 Uhr

### **Querschnittsstudie zur HEV-Seroprävalenz bei Jägern im Wetteraukreis in Hessen, 2013**

Dr. Anika Schielke, Robert Koch-Institut, Berlin

*12:55–13:55 Uhr Mittagspause*

## Session II – Nachweismethoden und Typisierung

Chair: Dr. Anja Carl, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen

13:55–14:25 Uhr

### **Noro- und Rotavirusinfektionen – die aktuelle Situation in Deutschland**

Dr. Sandra Niendorf, Robert Koch-Institut (RKI), Berlin

14:25–14:40 Uhr

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

Dr. Janine Beutlich, CONGEN Biotechnologie GmbH, Berlin

14:40–14:55 Uhr

### **Foodproof Norovirus Detection Kit (GI, GII, GIV): Multiplex-PCR zur Differenzierung der human-pathogenen Noroviren in Lebensmitteln**

Arnt Ebinger, BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam

14:55–15:15 Uhr

### **Entwicklung eines sensitiven Verfahrens für den Nachweis von Hepatitis E-Viren in Roh- und Leberwurst**

Dr. Eva Trojnar, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

*15:15–15:45 Uhr Kaffeepause*

## Session III – Hygiene, Inaktivierung und Desinfektion

Chair: Professor Dr. Günter Klein, Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo)

15:45–15:15 Uhr

### **Risiko viraler Kontamination in der landwirtschaftlichen Primärproduktion – Erfahrungen aus FVO-Audits**

Professor Dr. Dietrich Mäde, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt (LAV), Halle (Saale)

16:15–16:35 Uhr

### **Studien zur viruziden Wirksamkeit von Räucherrauch**

Dr. Thiemo Albert, Universität Leipzig

16:35–16:55 Uhr

### **Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur Stabilität und Morphologie von Noroviren**

Dr. José Luis Cuéllar, Universität Leipzig

16:55–17:15 Uhr

### **Optimierung eines Zellkultursystems für die Stabilitätstestung des Hepatitis E-Virus**

Professor Dr. Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

17:15–17:30 Uhr

### **Schlussworte**

Professor Dr. Reimar Johne, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

### 3 Abstracts

#### 3.1 Hepatitis E-Virus – Überblick und aktuelle Situation in Deutschland

PD Dr. Jürgen Wenzel

Universität Regensburg, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Konsiliarlabor für HAV und HEV, Regensburg, E-Mail: juergen.wenzel@ukr.de

Die Hepatitis E ist die fünfte Form der klassischen Virushepatitiden A–E. Lange Zeit galt diese Erkrankung in Deutschland als ausschließlich importierte Infektion, die vorwiegend in Asien, Afrika, Mittel- und Südamerika erworben wurde. Erst in den letzten Jahren erkannte man, dass zumindest der sog. Genotyp 3 der Art Orthohepevirus A auch in Europa und Nordamerika vorkommt.

Der Erreger ist in Schweinen und Wildschweinen weit verbreitet. Auf den Menschen wird er wahrscheinlich durch kontaminierte Nahrungsmittel tierischen Ursprungs übertragen. Die Infektion ist in Deutschland eine häufige Zoonose und unterscheidet sich von der klassischen Genotyp 1-Hepatitis E, die fäkal-oral übertragen wird. Die Durchseuchung der erwachsenen Bevölkerung, gemessen anhand der HEV-IgG Antikörperprävalenz, liegt zwischen 20 und 30 % und zeigt einen altersabhängigen Anstieg.

Seit der Einführung der Meldepflicht 2001 steigen die Hepatitis E-Meldezahlen jedes Jahr an. Nur etwa 5 % der gemeldeten Fälle wurden im Ausland erworben. Im Jahr 2014 wurden erstmals etwa gleich viele Hepatitis A- und E-Fälle gemeldet (ca. 675). Im Jahr 2015 zeichnet sich noch einmal ein deutlicher Anstieg der Hepatitis E ab (ca. 700 bis zur KW 32). Obwohl die Meldezahlen auf den ersten Blick zunehmende Infektionsraten nahelegen, konnte durch seroepidemiologische Studien gezeigt werden, dass die Hepatitis E-Durchseuchung in Europa in den letzten Jahrzehnten stark abgenommen hat. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Die steigenden Meldezahlen sind demnach höchstwahrscheinlich auf eine gesteigerte Aufmerksamkeit im Gesundheitswesen zurückzuführen.

Im Blutspendewesen ist aufgrund der HEV-Epidemiologie mit 1 virämischen Spende unter 1000–2000 zu rechnen. Transfusionsassoziierte Übertragungen wurden für verschiedene Blutprodukte beschrieben, bleiben jedoch wahrscheinlich häufig unentdeckt.

Obwohl nur ca. 1 von 500 HEV-Infektionen stärkere Symptome verursacht, wurden wiederholt schwere Verläufe bei Personen mit Vorschädigung der Leber beobachtet. Auch chronische Infektionen kommen bei Patienten unter Immunsuppression vor und können bereits in relativ kurzer Zeit zur Leberzirrhose führen. Therapeutisch werden in erster Linie die Reduktion der Immunsuppression und das Nukleosidanalogon Ribavirin angewendet.



## **4 Session I – Epidemiologie und Ausbruchsuntersuchungen**

### **4.1 Rückverfolgungsanalysen zu einem europaweiten Hepatitis A-Ausbruch durch Tiefkühlbeeren**

Dr. Armin A. Weiser, Christian Thöns, Dr. Alexander Falenski, Matthias Filter, Professor Dr. Bernd Appel und PD Dr. Annemarie Käsbohrer

Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Berlin, E-Mail: armin.weiser@bfr.bund.de

FoodChain-Lab ist eine Open Source Software zur Vorwärts- und Rückverfolgung von Lebensmitteln bzw. deren Zutaten, dessen Entwicklung am BfR durch mehrere Lebensmittelkrisen in Deutschland seit 2011 motiviert und vorangetrieben wurde. Die Software besteht aus einem integrierten, flexiblen Datenmanagementbereich sowie Komponenten zur Analyse und Visualisierung von Warenketten.

Im November 2013 berief die EFSA Experten aus dem BfR in eine Arbeitsgruppe zur Aufklärung eines europaweiten Ausbruchs von Hepatitis A (HAV). Zu diesem Zeitpunkt waren über einen längeren Zeitraum hinweg in Italien, Irland und den Niederlanden zahlreiche HAV-Fälle aufgetreten, ohne dass der Zusammenhang geklärt werden konnte. Insgesamt erkrankten mehr als 1.400 Menschen in verschiedenen europäischen Ländern an Hepatitis A, und bei 331 Personen wurde der Ausbruchstamm KF182323 bestätigt. Tiefgefrorene Beeren bzw. Produkte mit solchen Beeren als Zutat wurden durch intensive Bemühungen immer wieder als Vehikel des Erregers identifiziert. Allerdings war offen, in welchem Zusammenhang die verschiedenen Produkte standen, also welche Beerenart(en), welches Erntejahr, welches Land oder Erntegebiet bzw. welche Herstellungs- oder Verarbeitungsprozesse Ursprung der Kontamination und somit des Ausbruchs gewesen war.

Zur Analyse des Ausbruchsgeschehens haben die betroffenen Staaten Daten zur Rückverfolgung der verschiedenen in Verdacht stehenden Lebensmittel bzw. der Beeren als Zutat erhoben und über das Schnellwarnsystem der Europäischen Kommission an die EFSA als zentrale Bewertungsstelle geschickt. Hierfür wurde ein unter Federführung des BfR entwickelter Erhebungsbogen genutzt. In einem iterativen Prozess hat das BfR wiederholt die Daten in FoodChain-Lab zusammengeführt, auf Plausibilität geprüft, eingehend analysiert, Datenlücken aufgezeigt und verschiedene Kontaminationsszenarien simuliert.

Die Arbeitsgruppe „HAV Trace“ konnte nach intensiver Zusammenarbeit mit einer Vielzahl von Datenlieferanten die Quelle des Ausbruches deutlich eingrenzen. Die spezielle Problematik der Zutat „tiefgekühlte Beeren“, deren saisonale Ernte bereits einige Jahre zurücklag und deren Herkunft z. T. in Drittländern mit schwieriger Datenerhebung lag ließ es nicht zu, dass die Kontaminationsquelle exakt bestimmt werden konnte.



## 4.2 Ein Cateringbetrieb als Quelle eines Noroviren-Ausbruchs

Jürg Schmid

Amt für Verbraucherschutz und Veterinärwesen (AVSV), St. Gallen, Schweiz, E-Mail: juerg.schmid@sg.ch

Veranlasst durch Kundenreklamationen wurde in einem Cateringbetrieb festgestellt, dass kalte Platten, die an fünf Gruppen geliefert worden waren, bei mindestens 60 Personen zu Erkrankungen geführt hatten. Die Symptome (Durchfall und massives Erbrechen) wiesen auf eine Noroviren-Erkrankung hin.

Der zuständige Lebensmittelinspektor klärte vor Ort, wie eine Kontamination durch Noroviren hätte stattfinden können. Die ersten Abklärungen nach erkranktem Personal ergaben ein negatives Ergebnis. Es waren keine Krankheitsfälle bekannt.

Hartnäckige Rückfragen des Lebensmittelinspektors brachten dann aber zutage, dass am Produktionstag eine Person Symptome einer Noroviren-Erkrankung aufwies, trotzdem aber arbeitete.

Diese Person musste sich am Morgen auf dem Weg zu einem der vielen Toilettenbesuche im Lagerbereich für Gebinde übergeben. So wurden saubere Gebinde, die für den Transport der kalten Platten vorgesehen waren, kontaminiert. Gleichzeitig fand eine aerogene Kontamination statt. Anschließend geschah ein fataler Fehler: Das Erbrochene blieb mehrere Stunden liegen, und die kontaminierten Gebinde wurden verwendet.

Die Mitarbeiter, welche die kalten Platten für das Catering herstellten, kontaminierten ihre Hände mit Noroviren und übertrugen diese auf die sauberen Lebensmittel. Gleichzeitig führte die aerogene Kontamination zu vielen Erkrankungen beim Catering-Personal.

Die Erkrankungen dieser Mitarbeiter erschienen nicht auf den Dienstplänen, da sich die Symptome am Wochenende zeigten. Typisch bei einer Noroviren-Erkrankung ist die sehr kurze Erholungszeit, und so konnten sie am Montag bereits wieder arbeiten.



### 4.3 Lebensmittelassoziierte Noroviren – Ausbrüche in Österreich

Dr. Ingeborg Lederer<sup>1</sup>, Sabine Maritschnik<sup>2</sup>, Dr. Daniela Schmid<sup>2</sup> und PD Dr. Burkhard Springer<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>AGES GmbH, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene; <sup>1</sup>Zentrum für lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten, Graz; <sup>2</sup>Abteilung Infektionsepidemiologie, Wien, E-Mail: ingeborg.leederer@ages.at

#### *Einleitung*

Nach einer Einschätzung der WHO (World Health Organisation) ist jedes Jahr ein Drittel der Bevölkerung in den Industrieländern von lebensmittelbedingten Erkrankungen betroffen. Nur in 10 % der Fälle wird ein Krankheitserreger identifiziert. Noroviren (NoV) sind die am häufigsten identifizierten Erreger von lebensmittelbedingten Gastroenteritis Ausbrüchen. In Österreich sind seit der Novelle des Epidemiegesetzes im Jahr 2006 virale Lebensmittelvergiftungen bei Verdacht, Erkrankung und Todesfall meldepflichtig. Die Nationale Referenzzentrale hat zusammen mit der Abteilung Surveillance und Infektionsepidemiologie in der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) von 2004 bis Juni 2015 insgesamt 23 Noroviren Ausbrüche epidemiologisch und virologisch abgeklärt.

#### *Material und Methoden*

Alle Ausbrüche wurden deskriptiv und analytisch epidemiologisch abgeklärt (deskriptiv: Beschreibung des Ausbruchs nach Zeit, Ort und Person; analytisch: retrospektive Kohorten, Fall-Kontroll-Studie). Die Detektion und Typisierung der Ausbruchsstämme erfolgte mittels multiplex one-tube RT-PCR und durch Sequenzierung nach nested multiplex RT-PCR. Die Untersuchung von Lebensmitteln und Umgebungsabstrichen wurde gemäß Standardmethoden durchgeführt.

#### *Resultate und Diskussion*

Von den 23 untersuchten Ausbrüchen waren 65,2 % (n=15) gemäß epidemiologischer Evidenz auf Lebensmittel zurückzuführen. Ein NoV-Ausbruch ereignete sich nach einer Überschwemmung mit fäkal kontaminiertem Wasser. Alle Lebensmittel-assoziierten Ausbrüche wurden durch analytisch epidemiologische Abklärung identifiziert. Bei keinem Ausbruch konnten Noroviren im Lebensmittel nachgewiesen werden. NoV-Nachweise in Lebensmittel-, Umgebungs- und Wasserproben mittels RT-PCR sind wichtige Instrumente um Transmissionsketten zu identifizieren, sie sind jedoch oft aufgrund zu geringer Viruskonzentration oder mangelnder bzw. inkorrekturer Beprobung eine methodische Herausforderung. Daher sind für die Feststellung von Infektionsquellen und Erregerreservoir analytisch epidemiologische Untersuchungen unerlässlich.



#### 4.4 Hepatitis E-Virus bei Wildtieren von Truppenübungsplätzen

Dr. Helena Anheyer-Behmenburg<sup>1,2</sup>, Dr. Ulrich Schotte<sup>2</sup>, Dr. Kathrin Szabo<sup>1,3</sup>, Dr. Alfred Binder<sup>2</sup>, Professor Dr. Reimar Johné<sup>3</sup> und Professor Dr. Günter Klein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit; <sup>2</sup>Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Abteilung II Veterinärmedizin; <sup>3</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, E-Mail: guenter.klein@tiho-hannover.de

Die Fallzahlen humaner Hepatitis E-Erkrankungen in Deutschland nehmen in den letzten Jahren kontinuierlich zu. Im Jahr 2014 wurden insgesamt 670 Erkrankungsfälle an das Robert Koch-Institut übermittelt, wobei vermehrt autochthone Infektionen identifiziert werden konnten. Hierbei wird eine zoonotische Virusübertragung über infizierte Haus- und Wildschweine vermutet. Wildschweine, aber auch Wildwiederkäuer, wie aus vereinzelt Berichten aus dem europäischen Ausland bekannt, können hierbei als Erregerreservoir dienen.

Ziel dieser Studie war es, die Verbreitung des Hepatitis E-Virus (HEV) in der Wildtierpopulation zu ermitteln. Dazu wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jagdjahren insgesamt 1510 Tiere (Wildschweine, Reh-, Rot- und Damwild) von Truppen- und Standortübungsplätzen der Bundeswehr aus Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Sachsen, Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern beprobt und mittels PCR getestet. Ausgewählte PCR-Amplifikate positiver Tiere wurden sequenziert. Zusätzlich zum Genomnachweis erfolgte die serologische Diagnostik von HEV-spezifischen Antikörpern bei 1240 Tieren aus derselben Tiergruppe.

PCR-positive Tiere wurden ausschließlich von Truppen- und Standortübungsplätzen in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg und Sachsen detektiert. Hierbei wurden neben Wildschweinen auch Reh- und Rotwild HEV-positiv getestet, was den ersten Nachweis bei beiden Tierarten in Deutschland darstellt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte unabhängig von der Tierart den Nachweis von HEV Genotyp 3. Serologische Nachweise von HEV-spezifischen Antikörpern erfolgten bei Tieren fast aller Plätze, wobei sowohl Wildschweine als auch Wildwiederkäuer positiv getestet wurden. Die Prävalenzen, im direkten sowie indirekten Nachweis, variierten nicht nur stark zwischen den Tierarten und Plätzen, sondern auch teils erheblich zwischen den Jagdjahren.



#### 4.5 Querschnittsstudie zur HEV-Seroprävalenz bei Jägern im Wetteraukreis in Hessen, 2013

Dr. Anika Schielke<sup>1#†</sup>, Dr. Veronika Ibrahim<sup>2</sup>, Dr. Irina Czogiel<sup>1</sup>, Dr. Mirko Faber<sup>1</sup>, Dr. Christina Schrader<sup>3</sup>, Paul Dremsek<sup>4</sup>, PD Dr. Rainer G. Ulrich<sup>4</sup> und Professor Dr. Reimar Johne<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut (RKI), Berlin; <sup>#</sup>Postgraduiertenausbildung für Angewandte Epidemiologie (PAE), Robert Koch-Institut, Berlin; <sup>†</sup>European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Schweden; <sup>2</sup>Fachdienst Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung des Wetteraukreises, Friedberg; <sup>3</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin; <sup>4</sup>Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald-Insel Riems, E-Mail: SchielkeA@rki.de

Eine aktuelle Studie schätzt die Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus (HEV) in der erwachsenen deutschen Allgemeinbevölkerung auf 17 %. Wildschweine werden als ein bedeutendes Tierreservoir für HEV angesehen. Das Ziel der hier vorgestellten Querschnittsstudie war die Schätzung der HEV-Seroprävalenz bei Jägern sowie die Ermittlung des Einflusses von Jagd- und Verzehrsgewohnheiten darauf.

Im Jahr 2013 wurden auf Informationsveranstaltungen im Wetteraukreis in Hessen Jäger mit Hilfe eines Fragebogens zu Jagdverhalten und Verzehrsgewohnheiten befragt und um Blutproben gebeten. Bei Treibjagden wurden außerdem Organ-, Muskelfleisch- und Blutproben von Wildschweinen gewonnen. Diese wurden auf HEV-RNA oder HEV-spezifische Antikörper untersucht. Die Fragebögen wurden mittels uni- und multivariabler Analyse ausgewertet.

Die durchschnittliche Seroprävalenz bei den Jägern (n=126) betrug 21 % und war mit 67 % in der Gruppe der 70-79-Jährigen am höchsten. Die mittlere HEV-Seroprävalenz bei den Wildschweinen lag bei 41 %. In 4 von 22 Leberproben (18 %) und in 1 von 22 Muskelproben (4,5 %) konnte HEV-RNA nachgewiesen werden. Jäger, die in einem Gebiet mit hoher HEV-Prävalenz bei Wildschweinen jagen, zeigten eine signifikant geringere HEV-Seroprävalenz, wenn sie beim Ausnehmen und/oder Zerwirken der Wildschweine regelmäßig Handschuhe trugen (für Alter adjustiertes Prävalenzverhältnis 0,12; 95 % Konfidenzintervall 0,02-0,86). Dieser Effekt war nicht in den anderen Jagdgebieten mit geringerer HEV-Durchseuchung der Wildschweine zu beobachten.

Diese Studie unterstützt somit bereits existierende Empfehlungen, beim Kontakt mit Blut und anderen Körperflüssigkeiten von HEV-Tierreservoirien Schutzhandschuhe zu tragen. Der geringe Unterschied in der HEV-Seroprävalenz von Jägern und Allgemeinbevölkerung legt nahe, dass neben dem Jagen andere Risikofaktoren eine große Rolle für die HEV-Übertragung spielen.



## 5 Session II – Nachweismethoden und Typisierung

### 5.1 Noro- und Rotavirusinfektionen – die aktuelle Situation in Deutschland

Dr. Sandra Niendorf<sup>1</sup>, Dr. Andreas Mas Marques<sup>1</sup>, Dr. Judith Koch<sup>2</sup> und Dr. Marina Höhne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut, Konsiliarlabor für Noroviren, Konsiliarlabor für Rotaviren, Berlin; <sup>2</sup>Robert Koch-Institut, FG33 Impfprävention, Berlin, E-Mail: NiendorfS@rki.de

Akute Gastroenteritiden sind eine der häufigsten Erkrankungen in Deutschland. Bis zu 64 % dieser Fälle werden durch Infektionen mit Noro- oder Rotaviren ausgelöst. Noroviren infizieren sowohl Kinder als auch Erwachsene. Auf Grund ihrer hohen Umweltstabilität und der niedrigen Infektionsdosis von etwa 20 Viruspartikeln, kommt es sehr häufig, vor allem in den Wintermonaten, zu größeren Ausbrüchen in Gemeinschaftseinrichtungen, wie Kindertagesstätten, Schulen und Pflegeheimen. Aus diesem Grund treten Norovirusinfektionen in den entsprechenden Altersgruppen stark gehäuft auf. Die Übertragung der Viren erfolgt fäkal-oral, von Person zu Person, oder über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser. Kontaminierte Erdbeeren führten im Jahr 2012 zum bislang größten Norovirusausbruch in Deutschland, bei dem rund 11.000 Patienten, meist Kinder, infiziert wurden. In der zurückliegenden Saison 2014/2015 wurden deutschlandweit ~91.000 Norovirusinfektionen an das Robert Koch-Institut übermittelt. Im Konsiliarlabor wurden 158 Ausbrüche molekular-epidemiologisch untersucht. Die Mehrzahl dieser Ausbrüche (38 %) wurde von Viren des Genotyps GII.4 verursacht. Zehn verschiedene rekombinante Viren verursachten 26 % der untersuchten Ausbrüche, während die Viren der Genogruppe GI in insgesamt 16 % als ätiologisches Agens identifiziert wurden.

Rotavirus-Gastroenteritiden treten gehäuft bei Kleinkindern unter 2 Jahren und älteren Menschen (> 70 Jahre) auf. Insbesondere Säuglinge sind durch z.T. schwer verlaufende Gastroenteritiden mit hoher Hospitalisierungsrate besonders gefährdet. Eine durchgemachte Infektion vermittelt eine Immunität, die sich mit der Anzahl der durchgemachten Infektionen verbessert. Im Jahr 2006 wurden die oralen Lebendimpfstoffe Rotarix und RotaTeq in Deutschland zugelassen und 2013 wurde die Impfung durch die Ständige Impfkommission (STIKO) für Säuglinge generell empfohlen. Vom Zeitpunkt der Impfstoffzulassung bis 2014 ist die Zahl der übermittelten Rotavirusfälle um 70 % und die Hospitalisierungen um 65 % zurückgegangen. Auch in nicht geimpften Altersgruppen (> 5 Jahre) ist ein rückläufiger Trend sichtbar, der als Zeichen einer Herdenimmunität zu werten ist.

Eine umfangreiche Surveillance von Rotaviren ist notwendig, um zirkulierende Viren zu charakterisieren und die mögliche zoonotische Einbringung von neuen Varianten in die humane Population zu erkennen. Mit Hilfe einer molekularen Surveillance können genetische Veränderungen der Viruspopulation identifiziert und auf potentielle Einflüsse der Impfung untersucht werden. Auf Grund dieser Daten wäre es möglich, die Impfstoffe auch an Escape-Varianten anzupassen.



## **5.2 Inhibitorische Effekte von Fruchtsaft-Konzentraten auf das Screening von Lebensmittelassoziierten Viren mittels Reverse Transkriptase (RT) Real-Time PCR – ein Verbesserungsansatz**

Dr. Janine Beutlich, Jennifer Geister, Patrizia Eckelt und Dr. Steffen Mergemeier

CONGEN Biotechnologie GmbH, Berlin, E-Mail: j.beutlich@congen.de

Hepatitis A-Virus (HAV) und Norovirus (NoV) sind in Industrieländern die häufigsten Ursachen lebensmittelbedingter Erkrankungen in Verbindung mit Frischprodukten, Meeresfrüchten und Fertiggerichten. In den letzten Jahren kam es vermehrt zu Meldungen von Lebensmittel-assoziierten Viren in Lebensmittelprodukten sowie von Krankheitsausbrüchen, die auf kontaminierte Früchte zurückzuführen waren. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass hohe Konzentrationen bestimmter Lebensmittelbestandteile in Obst- und Gemüseprodukten, wie zum Beispiel komplexe Kohlenhydrate, eine inhibitorische Wirkung auf die RT real-time PCR haben. Aus diesem Grund können diese Assays zu falsch negativen Ergebnissen führen. Dies stellt insbesondere für die Routinediagnostik eine Herausforderung dar.

In dieser Studie wurden verschiedene Fruchtsaft-Konzentrate hinsichtlich ihrer Performance in RT real-time PCR Systemen zur Detektion von HAV und NoV untersucht. Zur Evaluierung von möglichen inhibitorischen Effekten wurde der Fokus auf den Nachweis einer internen Kontroll-RNA (ICR) gelegt.

Insgesamt wurden RNA-Extrakte aus 19 Fruchtsaft-Konzentraten (Acerola, Ananas, Apfel, Erdbeere, Granatapfel, 2 x Heidelbeere, Himbeere, Holunderbeere, Kiwi, Mango, Melone, 2 x Orange, Papaya, Sauerkirsche, Süßkirsche, 2 x Zitrone) analysiert. Die Extraktion erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls von SureFast® PREP DNA/RNA Virus (CONGEN, Berlin). Die Proben wurden sowohl ohne als auch mit Zugabe verschiedener Mengen (0, 30, 60, 80, 100 mg) eines Inhibitorenbinders extrahiert. Zum Vergleich der Performance der unterschiedlichen Matrices wurden 100 µl ICR vor der Extraktion zu jeder Probe pipettiert und entweder mit dem SureFast® Norovirus PLUS oder dem SureFast® Norovirus/Hepatitis A 3plex Kit (beide CONGEN) in Kanal 533-580 nm verglichen. Der Nachweis erfolgte als "One Step RT real-time PCR", d. h. reverse Transkription und die folgende PCR wurden im selben Reaktionsgefäß prozessiert gemäß ISO/TS 15216-1:2013 und LFGB §64.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe eines Inhibitorenbinders die hemmende Wirkung von Fruchtsaft-Konzentraten auf die RT-PCR reduziert und zu akkurateren Analyseergebnissen führt.

Insbesondere aufgrund globalisierter Versorgungsketten werden eine zeitnahe Erfassung sowie epidemiologische Ausbruchsuntersuchungen basierend auf zuverlässigen Methoden zum Nachweis von lebensmittelvergiftenden Viren, wie NoV und HAV, immer wichtiger.



### **5.3 Foodproof Norovirus Detection Kit (GI, GII, GIV): Multiplex-PCR zur Differenzierung der human-pathogenen Noroviren in Lebensmitteln**

Arnt Ebinger, Matthias Giese, Cordt Grönwald und Dr. Kornelia Berghof-Jäger

BIOTECON Diagnostics GmbH, Forschung & Entwicklung, Potsdam, E-Mail: aebinger@bc-diagnostics.com

Noroviren (Caliciviridae) sind die weltweit führende Ursache akuter Gastroenteriden beim Menschen und unterteilen sich in 7 Genogruppen, wobei die Genogruppen I, II und IV human-pathogen sind. Ca. 14 % aller Norovirus-Ausbrüche sind auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen. Das Muster der prädominanten Genogruppen unterscheidet sich dabei stark von denen der Mensch-zu-Mensch Übertragung. So spielt die Genogruppe II im Gegensatz zur Genogruppe I eine geringere Rolle. Wohingegen bei der Mensch-zu-Mensch Übertragung der Ausbruchstamm der Genogruppe II (GII.4) für ca. 60–80 % aller Norovirus Infektionen verantwortlich sein soll. Eine diagnostische Unterscheidung der Noroviren kann somit erste epidemiologische Hinweise liefern. Die BIOTECON Diagnostics GmbH hat hierfür ein one-step reverse-transcriptase real-time PCR basierend auf der ISO/TS 15216 und § 64-LFGB für Lebensmittelanalysen entwickelt. Eine in das Kit integrierte Prozesskontrolle (MS2-Phage) soll die Validität der Resultate gewährleisten.

Für die Spezifität der Triplex-PCR wurden 15 verschiedene Norovirus-Genotypen, 11 unterschiedliche Virus-Spezies sowie 10 nicht-kontaminierte Stuhlproben analysiert. Die LOD wurde anhand quantifizierter genomischer RNA (dynamic range 10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup>; GI: E = 102,5 %; R<sup>2</sup> = 96,5 %; slope = -3,264 // GII: E = 86,5 %; R<sup>2</sup> = 93,4 %; slope = -3,695) und Plasmid-DNA evaluiert. Hier konnten jeweils 10 Kopien/Reaktion sicher detektiert werden. Bei den simulierten Mischinfektionen wurden keine falsch-negativen Ergebnisse und gleichbleibende Sensitivität gemessen. Die diagnostische Sensitivität wurde anhand verschiedener Matrices wie Stuhlproben, Meeresfrüchten (CEFAS PT55), Hackfleisch und Erdbeeren analysiert. Dabei konnte stets 100 %ige ‚accuracy‘ erzielt werden. Die Intra- und Inter-Reproduzierbarkeit der PCR wurde mit 30 Kopien/Reaktion genomischer RNA jeweils für GI und GII auf sechs verschiedenen real-time PCR-Geräten evaluiert mit einer Gesamtvariation für GI = 0,8 % und GII = 1,0 %.

Das *foodproof Norovirus Detection Kit* ist eine spezifische, hoch-sensitive und reproduzierbare Multiplex-PCR. Das Kit wurde zudem an die Anforderungen der Lebensmittelanalytik adaptiert und eignet sich somit auch für den Norovirus-Nachweis aus komplexen und inhibitionsreichen Matrices, nicht zuletzt aufgrund der integrierten Prozesskontrolle.



## 5.4 Entwicklung eines sensitiven Verfahrens für den Nachweis von Hepatitis E-Viren in Roh- und Leberwurst

Dr. Eva Trojnar<sup>1</sup>, Dr. Kathrin Szabo<sup>1,2</sup>, Dr. Alfred Binder<sup>3</sup>, Dr. Ulrich Schotte<sup>3</sup>, Dr. Helena Anheyer-Behmenburg<sup>2,3</sup>, Professor Dr. Lüppo Ellerbroek<sup>1</sup>, Professor Dr. Günter Klein<sup>2</sup> und Professor Dr. Reimar Johné<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, <sup>2</sup>Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, <sup>3</sup>Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Abteilung Veterinärmedizin, E-Mail: eva.trojnar@bfr.bund.de

Infektionen mit Hepatitis E-Viren (HEV) führen zu großen Epidemien von akuter Hepatitis in den endemischen Ländern Afrikas, Asiens und Mittelamerikas. Die Übertragung der Viren erfolgt hier überwiegend über verunreinigtes Trinkwasser. Aber auch in Deutschland wurden 670 Hepatitis E-Fälle im Jahr 2014 gemeldet. Die überwiegende Mehrzahl dieser Fälle kann jedoch nicht auf Reisen in die Endemiegebiete zurückgeführt werden. Hier wird eine zoonotische Übertragung des HEV durch Kontakt zu infizierten Schweinen oder Wildschweinen, oder durch Lebensmittel, die aus infizierten Tieren hergestellt wurden, angenommen. Für die Untersuchung von verdächtigen Lebensmitteln und zur Aufklärung von Erkrankungsausbrüchen ist die Verfügbarkeit von sicheren und sensitiven Nachweismethoden von entscheidender Bedeutung. Es existieren jedoch derzeit keine amtlichen oder standardisierten Methoden für den Nachweis von HEV in Lebensmitteln und nur wenige Protokolle wurden bisher hierfür veröffentlicht.

Ziel der Studie war daher die Entwicklung einer sensitiven Nachweismethode für den HEV-Nachweis in Roh- und Leberwurst. Hierfür wurden verschiedene Methoden zur Reinigung und Konzentrierung von HEV aus artifiziell kontaminierten Wurstproben getestet und optimiert. Die Effizienz des Zellaufschlusses, wodurch auch intrazelluläres Virus nachgewiesen werden soll, wurde gesondert überprüft. Der Nachweis der viralen RNA erfolgte mittels real-time RT-PCR.

Die optimierte Methode nutzt eine Homogenisierung mittels Stomacher und TRI Reagent® Solution. Eine zusätzliche Behandlung des erhaltenen Überstands mit Chloroform verbesserte die Nachweisraten. Die ermittelten Detektionsgrenzen der Methode lagen bei  $2,9 \times 10^3$  RNA-Kopien pro 5 g Rohwurst und  $5,3 \times 10^4$  RNA-Kopien pro 2 g Leberwurst. Die optimierte Methode wurde anschließend benutzt, um 120 Wurstprodukte aus dem Handel zu untersuchen. In 14 von 70 Salamis (20 %) und 11 von 50 Leberwürsten (22 %) konnte HEV-RNA nachgewiesen werden.

Die Daten zeigen, dass die entwickelte Methode ein zuverlässiges und sensitives Verfahren für den Nachweis von HEV-RNA in Roh- und Leberwurst darstellt. Die Methode wird derzeit in einem Ringversuch validiert.



## 6 Session III – Hygiene, Inaktivierung und Desinfektion

### 6.1 Risiko viraler Kontamination in der landwirtschaftlichen Primärproduktion – Erfahrungen aus FVO-Audits

Professor Dr. Dietrich Mäde

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt (LAV), Halle (Saale)  
E-Mail: dietrich.maede@lav.ms.sachsen-anhalt.de

Deutschland wurde im Jahr 2011 von einem großen EHEC-Ausbruch durch kontaminierte Sprossen mit mehr als 50 Todesfällen und im Jahr 2012 von einem Norovirusausbruch mit 10950 registrierten Fällen durch tiefgefrorene Erdbeeren getroffen. Durch ungegart verzehrte pflanzliche Lebensmittel übertragene humanpathogene Viren zählen mittlerweile zu den häufigsten Erregern lebensmittelbedingter Erkrankungen. Dies wurde zum Anlass genommen, eine Serie von Audits des Lebensmittel- und Veterinärarnamtes der EU mit dem Focus auf die Sicherheit frischer pflanzlicher Lebensmittel durchzuführen.

Das erste Audit 2013 führte nach China zur Überwachung der Herstellung von tiefgefrorenen Erdbeeren. Ein Jahr nach dem Ausbruch in Deutschland hatten die Kollegen in China bereits Maßnahmen zur Vermeidung der Übertragung pathogener Mikroorganismen und Viren getroffen. So sind die Erdbeerfelder mit ganz neuen Bewässerungsanlagen ausgestattet gewesen, am Ende des Audits konnten auch die durch internationale Standards geforderten Feldtoiletten vorgewiesen werden. In diesem Audit musste allerdings auch festgestellt werden, dass die in großem Umfang durchgeführten Laboranalysen nicht den internationalen Analysenstandards entsprechen. Ebenso kritisch ist, dass internationale Regelungen für eine repräsentative Probenahme fehlen.

Zypern als Urlaubsland aber auch als Exporteur von frischem Blattgemüse und Beerenfrüchten unterliegt als Mitgliedsstaat wie auch Frankreich, welches im Anschluss auditiert wurde, der europäischen Gesetzgebung. Beide Mitgliedsstaaten weisen bis auf kleinere Mängel in der Umsetzung der Standards bei hygienischen Einrichtungen für Pflücker und andere Saisonarbeiter gute Bedingungen für Erzeugung sicherer Lebensmittel auf. Hier wäre die Frage an den europäischen Gesetzgeber zu stellen, inwieweit eine Einhaltung von hygienischen Bedingungen bei der Bewässerung möglich ist, wenn die mikrobiologischen Kriterien diesbezüglich nicht geregelt sind. So liegen in beiden Staaten ausführliche Untersuchungen mit weitestgehend zufriedenstellenden mikrobiologischen Ergebnissen vor, allerdings können die Behörden keine Grenze aufzeigen, ab welcher nicht mehr von einer ausreichenden Qualität ausgegangen werden kann.

Marokko ist in den Wintermonaten der Hauptlieferant der EU für frische Beerenfrüchte und frische Tomaten. Dieser Wirtschaftszweig ist für die dortige Volkswirtschaft von sehr großer Bedeutung. Dem entsprechend ist die amtliche Überwachung sehr gut und mit der entsprechenden Schwerpunktsetzung auf Exporterzeugnisse vergleichsweise effizient organisiert. Gesetzgebung und Überwachung sind durch engen Austausch nahezu mit jener der Mitgliedsstaaten der EU identisch. Die hygienischen Bedingungen bei Anbau und Verarbeitung entsprechen den europäischen Standards. Die Hälfte der Betriebe gehört zu größeren EU-Unternehmen, die anderen Betriebe gehören größeren marokkanischen Unternehmern. Der Anbau in den Farmen ist weitestgehend vertraglich geregelt und modern organisiert.

Im Fazit wäre festzuhalten, dass die Überwachung der Erzeugung frischer pflanzlicher Lebensmittel weltweit an Bedeutung gewonnen hat. Defizite sind lokal vorhanden, sie lassen sich durch besseres Miteinander der Behörden und einen Erfahrungsaustausch untereinander beseitigen.



## 6.2 Studien zur viruziden Wirksamkeit von Räucherrauch

Dr. Thiemo Albert<sup>1</sup>, Dr. Anett Lange-Starke<sup>1</sup>, Professor Dr. Peggy G. Braun<sup>1</sup>, Professor Dr. Uwe Truyen<sup>2</sup> und Professor Dr. Karsten Fehlhaber<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>Universität Leipzig, Zentrum für Veterinary Public Health, Leipzig; <sup>1</sup>Institut für Lebensmittelhygiene; <sup>2</sup>Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, E-Mail: albert@vetmed.uni-leipzig.de

Bislang existieren unseren Recherchen zufolge keine publizierten Daten zum Einfluss von Räucherrauch auf die Infektiosität von lebensmittelassoziierten Viren. Im Rahmen eines Forschungsvorhabens wurden daher erstmals Studien zur antiviralen Wirkung von Räucherverfahren anhand der Verwendung verschiedener Surrogat-Viren durchgeführt.

Im Fokus der Arbeit stand die Etablierung von Versuchsmodellen zur Beurteilung der Viruzidie von Räucherrauch (Frikionsrauch/Reiberauch, Flüssigrauch) gegenüber murinem Norovirus (MNV) S 99 und MNV CW 1, Influenza-A-Virus H1N1 (A/WSN/33) sowie bovinem Enterovirus 1 (BEV, Stamm LCR-4). Hierzu wurden auf Edelstahlträgern aufgebrachte Virussuspensionen mit Rauch exponiert. Zudem wurden Edelstahlträger mit Virussuspensionen beimpft, die vorab mit Rauch beschichtet wurden. Zur Anwendung kam aus Rotbuchenholz erzeugter Frikionsrauch [hermetisch, Umluft langsam ( $\varnothing$  1,2 m/s)]. Der Nachweis des Vorliegens rohwarerelevanter Rauchdichten und Zeitintervalle (max. 120 min) in der Anlage (ASR 1297 Titan, Maurer AG) erfolgte über sensorische Untersuchungen sowie über die Bestimmung des Guajacolgehaltes bei Mettenden (22 cm  $\times$  2 cm). Weiterhin wurde ein kommerziell verfügbares Flüssigrauchpräparat verwendet. Bei allen Versuchen wurde eine Expositionstemperatur von 22 °C gewählt.

Beide Raucharten zeigten einen deutlichen antiviralen Effekt gegenüber den MNV-Isolaten mit Titerreduktionen von 3 log-Stufen (Flüssigrauch, unmittelbar nach Exposition) bzw. 4,5 log-Stufen nach 40-minütiger Exposition mit Frikionsrauch. Auch bei Kontamination rauchbehafteter Edelstahloberflächen wurde bei beiden Viren nach 10 min (Frikionsrauch) bzw. 25 min (Flüssigrauch) ein Titerverlust von ca. 3 log-Stufen festgestellt. Räucherrauch zeigte auch gegenüber Influenzavirus H1N1 sowie gegenüber BEV einen antiviralen Effekt, allerdings war eine Auswertung einzelner Versuchsreihen aufgrund von Virustiterverlusten durch Trocknungseffekte zum Teil nicht möglich. Zudem waren die Nachweisgrenzen aufgrund der Zytotoxizität des Räucherrauches bei allen getesteten Viren vergleichsweise hoch.

Mit der Studie konnte erstmals die antivirale Wirkung von Räucherrauch beschrieben werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Räuchern von Lebensmitteln zur Risikominimierung im Zusammenhang mit Viren beitragen kann.



### **6.3 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur Stabilität und Morphologie von Noroviren**

Dr. José Luis Cuéllar<sup>1</sup>, Christina Jarke<sup>2</sup>, Dr. Marina Höhne<sup>3</sup>, Professor Dr. Peggy G. Braun<sup>2</sup>, Professor Dr. Edwin Donath<sup>1</sup> und Dr. Thiemo Albert<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Universität Leipzig, Leipzig; <sup>1</sup>Institut für Medizinische Physik und Biophysik; <sup>2</sup>Institut für Lebensmittelhygiene; <sup>3</sup>Robert Koch-Institut, Berlin, E-Mail: luiscuecam@gmail.com

Die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) ist ein modernes Verfahren im Bereich der Nanotechnologie und kann unter anderem zur Untersuchung der Morphologie sowie der mechanischen Eigenschaften von Viren unter dem Einfluss physikalischer Parameter eingesetzt werden. Mittels AFM kann die Elastizität von Viruspartikeln im pico-Newton-Bereich präzise über entsprechende Kraftsensoren bestimmt werden, welche Oberflächenstrukturen mit einer bis auf atomare Abstände reichenden Auflösung (Nanoindentierung) abrastern können. Durch die Ermittlung entsprechender physikalischer Parameter (z. B. Young's modulus  $Y$ , Härteparameter) können dabei Virus- bzw. Viruskapsid-spezifische Fingerprints erzielt werden.

Bis zur Proliferation in der Wirtszelle sind Viren verschiedenen Stressoren ausgesetzt (z. B. Änderungen im pH-Wert oder osmotischem Druck). Die AFM erlaubt hierbei Einblicke, ob und inwieweit sich die strukturelle Integrität der Viruskapside unter bestimmten Umweltbedingungen ändert. Durch Erkenntnisse von Zusammenhängen zwischen mechanischer Eigenschaft und Struktur sowie Funktion von Viruskapsiden, können mittels AFM auch neue Möglichkeiten zur Virusinaktivierung aufgezeigt werden. Somit ergeben sich auch Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Forschung mit Lebensmittel-assoziierten Viren. Fragen zur Stabilität dieser Erreger gegenüber lebensmitteltechnologischen Prozessen (z. B. Erhitzung, Säuerung) können durch diese Technologie auf Nanostrukturebene untersucht werden. Damit stellt die AFM eine Ergänzung des für die Durchführung von Studien zur Virusstabilität und -inaktivierung zur Verfügung stehenden Methodenspektrums (u. a. PCR, Zellkultur) dar.

Im Beitrag wird die Methode der AFM sowie deren Möglichkeiten und Grenzen beispielhaft anhand mit humanen und murinen Noroviren durchgeführter Untersuchungen vorgestellt.



## 6.4 Optimierung eines Zellkultursystems für die Stabilitätstestung des Hepatitis E-Virus

Professor Dr. Reimar Johne<sup>1</sup>, PD Dr. Jörg Hofmann<sup>2</sup> und Dr. Eva Trojnar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Berlin; <sup>2</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Virologie, Berlin, E-Mail: Reimar.Johne@bfr.bund.de

Das Hepatitis E-Virus (HEV) kann beim Menschen eine akute Hepatitis verursachen; chronische Hepatitis E-Infektionen werden vor allem bei Transplantationspatienten beschrieben. Der Mensch kann sich an subklinisch infizierten Haus- und Wildschweinen infizieren. Auch indirekte Virus-Übertragungen über Umwelt-Kontaminationen oder Lebensmittel, die aus infizierten Tieren hergestellt wurden, spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Zur Bewertung der Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Übertragungswege und zur Etablierung geeigneter Maßnahmen zum Schutz vor der Infektion ist die Analyse der Stabilität des HEV von entscheidender Bedeutung. Leider existierten bisher keine effizienten Zellkultur-Systeme, die für solche Untersuchungen die Infektiosität von HEV messen können.

Aus der Serumprobe eines chronisch HEV-infizierten Transplantationspatienten konnte ein HEV-Genotyp 3-Stamm in Kulturen der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 isoliert, vermehrt und passagiert werden. Die HEV-Infektion verlief ohne die Ausbildung eines zytopathogenen Effektes und wurde durch real-time RT-PCR und Immunfluoreszenz nachgewiesen. Da das Viruswachstum sehr langsam war und die Infektion nur mit hohen Virusdosen gelang, wurde das Zellkultur-System optimiert. Die Infektion stark konfluenter Zellen sowie eine Senkung der Konzentration von fötalem Kälberserum erhöhten das Viruswachstum. Durch Vereinzeln von A549-Zellen konnte darüber hinaus die Sub-Zelllinie A549/D3 etabliert werden, die eine höhere Empfänglichkeit für den HEV-Stamm aufweist. Insgesamt können im optimierten System nun reproduzierbar 3-4 log-Verdünnungen des HEV titriert und analysiert werden. Das System wird derzeit dafür genutzt, die Hitze- und Langzeitstabilität von HEV in Zellkultur-Medium zu untersuchen.

Die Untersuchungen zeigen, dass bestimmte HEV-Stämme in der Zellkultur isoliert werden können, wobei bisher unklar ist, welche genetischen Faktoren von HEV das Zellkultur-Wachstum beeinflussen. Die Erfolge bei der Optimierung des Zellkultursystems weisen darauf hin, dass sich in Zukunft effizientere Anzüchtungsmethoden für HEV entwickeln lassen. Es wird erwartet, dass das optimierte Zellkultursystem zukünftig neben der Nutzung für Stabilitätsuntersuchungen auch für grundlegende Forschungen zum Vermehrungszyklus von HEV eingesetzt werden kann.



## 7 Autorenverzeichnis

- Albert, Thimo 31, 33  
Anheyer-Behmenburg, Helena 17, 27  
Appel, Bernd 11  
Berghof-Jäger, Kornelia 25  
Beutlich, Janine 23  
Binder, Alfred 17, 27  
Braun, Peggy G. 31, 33  
Cuéllar, José Luis 33  
Czogiel, Irina 19  
Donath, Edwin 33  
Dremsek, Paul 19  
Ebinger, Arnt 25  
Eckelt, Patrizia 23  
Ellerbroek, Lüppo 27  
Faber, Mirko 19  
Falenski, Alexander 11  
Fehlhaber, Karsten 31  
Filter, Alexander 11  
Geister, Jennifer 23  
Giese, Matthias 25  
Grönewald, Cordt 25  
Hofmann, Jörg 35  
Höhne, Marina 21, 33  
Ibrahim, Veronika 19  
Jarke, Christina 33  
Johne, Reimar 17, 19, 27, 35  
Käsbohrer, Annemarie 11  
Klein, Günter 17, 27  
Koch, Judith 21  
Lange-Starke, Anett 31  
Lederer, Ingeborg 15  
Mäde, Dietrich 29  
Maritschnik, Sabine 15  
Mas Marques, Andreas 21  
Mergemeier, Steffen 23  
Niendorf, Sandra 21  
Schielke, Anika 19  
Schmid, Daniela 15  
Schmid, Jürg 13  
Schotte, Ulrich 17, 27  
Schrader, Christina 19  
Springer, Burkhard 15  
Szabo, Kathrin 17, 27  
Thöns, Christian 11  
Trojnar, Eva 27, 35  
Truyen, Uwe 31  
Ulrich, Rainer G. 19  
Weiser, Armin 11  
Wenzel, Jürgen 7, 9