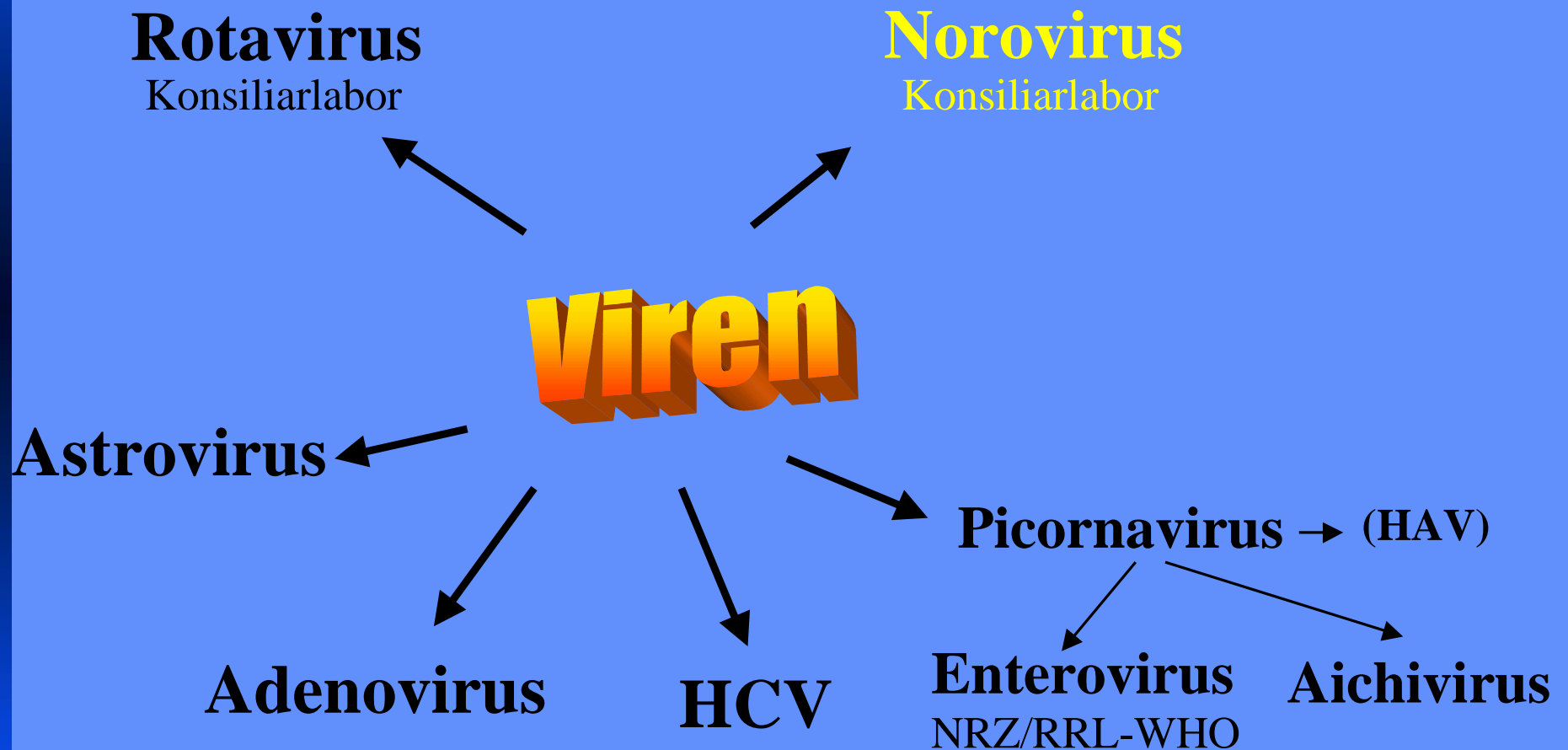
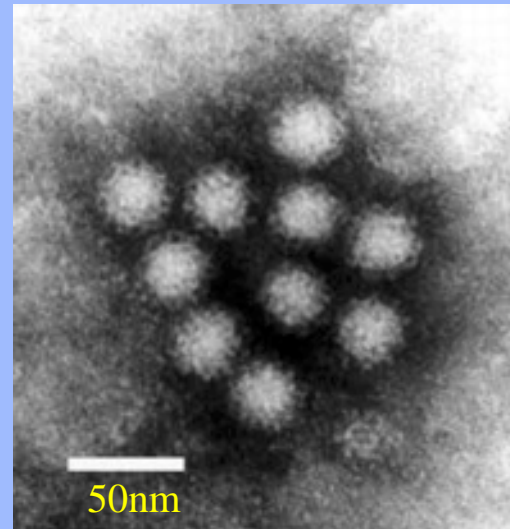
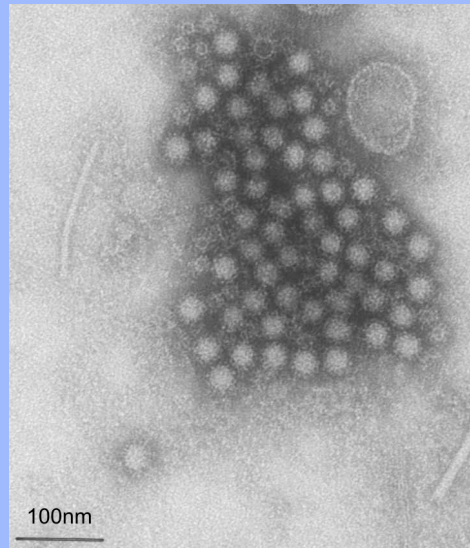


Molekulare Epidemiologie viraler Erreger (Robert Koch Institut)



Noroviren als Auslöser akuter Gastroenteritiden



90% nicht bakt. bedingter Gastroenteritis-Ausbrüche
werden durch das Norovirus verursacht

Gastroenteritiden

P a t h o g e n e

Viren

Norovirus (Norwalk-like)

Sapovirus (Sapporo-like)

Rotavirus

Adenovirus

Astrovirus

Enterovirus

Aichivirus(Kobuvirus)

Torovirus (Coronavirus)

Picobirnavirus

Bakterien

Salmonella

Shigella

E.coli

Parasiten

Giardia lamblia

Cryptosporidium

Trichinella sporades

4 Genera in der Familie der Caliciviridae

Genus	Vertreter z.B.	natürlicher Wirt	ausgelöste Krankheit
Norwalk-like Viren (NLVs) Norovirus	Norwalk-Virus	Mensch Rind, Maus	akute Gastroenteritis
Sapporo-like Viren (SLVs) Sapovirus	Sapporo-Virus	Mensch	akute Gastroenteritis
Vesiviren	Katzen-Calicivirus (FCV)	Katze, Hund	Pneumonie
	Vesicular exanthema of swine virus (VESV)	Schwein	Vesikuläres Exanthem
Lagoviren	Virus (RHDV)	Kaninchen	Rabbit haemorrhagic disease Leberdystrophie

Noroviren

Übertragung: Fäkal-oral



über kontaminierte Lebensmittel oder Gegenstände
Aerogen durch Bildung virushaltiger Aerosole beim
Erbrechen(Person zu Person)



IKZ:

6-72 Stunden

Symptome:

Plötzlich einsetzende Übelkeit,
Erbrechen und Durchfall
z.T. Bauch-, Kopfschmerzen,
Schüttelfrost, (Fieber);i. d. R. blande Verläufe(1-3 Tage)

Therapie: orale Substitutionstherapie mit Elektrolyt-u. Glukosezusätzen
bei schwerer Exsikkose intravenöse Therapie

Immunität und Resistenz

- Noroviren sind hoch ansteckend!
(<100 Partikeln)

Bei einem Infektionsausbruch erkranken
aber nicht alle der exponierten Personen

Warum ?

- **protektive AK ?**
- **wirtsgenetische Faktoren ?**

Antikörper Prävalenz

age groups	pos. individuals (%)
<6 month	70,8
6-11 month	21,7
12-23 month	44,1
24-35 month	50,9
36-47 month	55,0
48-59 month	55,0
5-9 years	69,0
10-19 years	70,2
20-29 years	78,7
30-39 years	85,6
40-49 years	91,4
50-59 years	90,0
60-69 years	88,2
>70 years	92,0



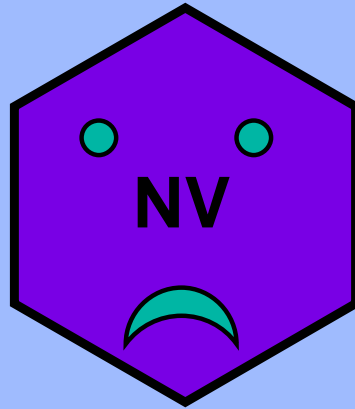
Norovirus in vitro Replikation ?

kein Zellkultursystem und Tiermodell
für das humane Norovirus

somit kein Test auf neutralisierende (protektive) Antikörper

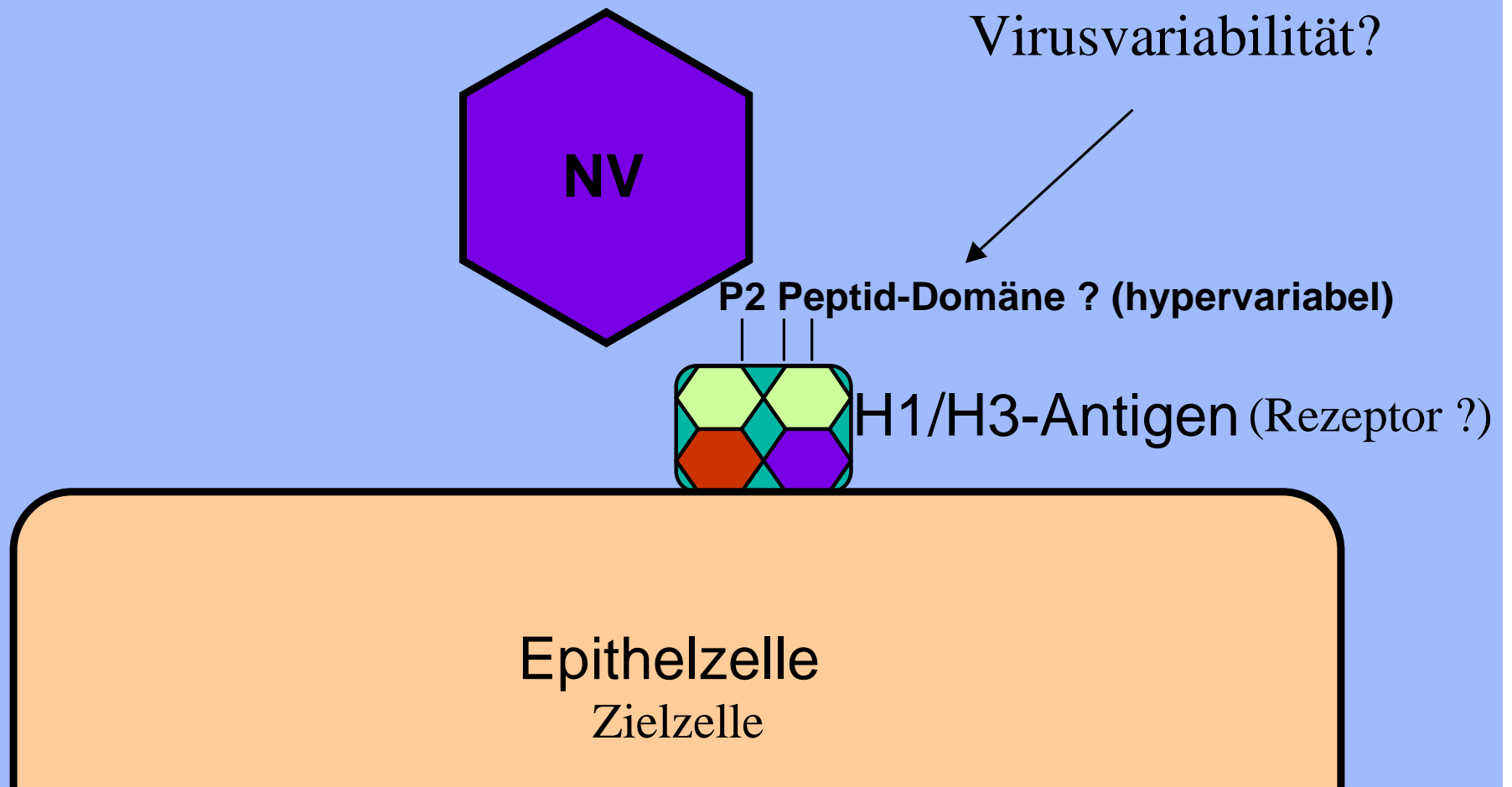
Warum erkranken nicht alle exponierten Personen?

Norovirus /VLP (Virus Like Partikel) Attachment



Epithelzelle
(Zielzelle)

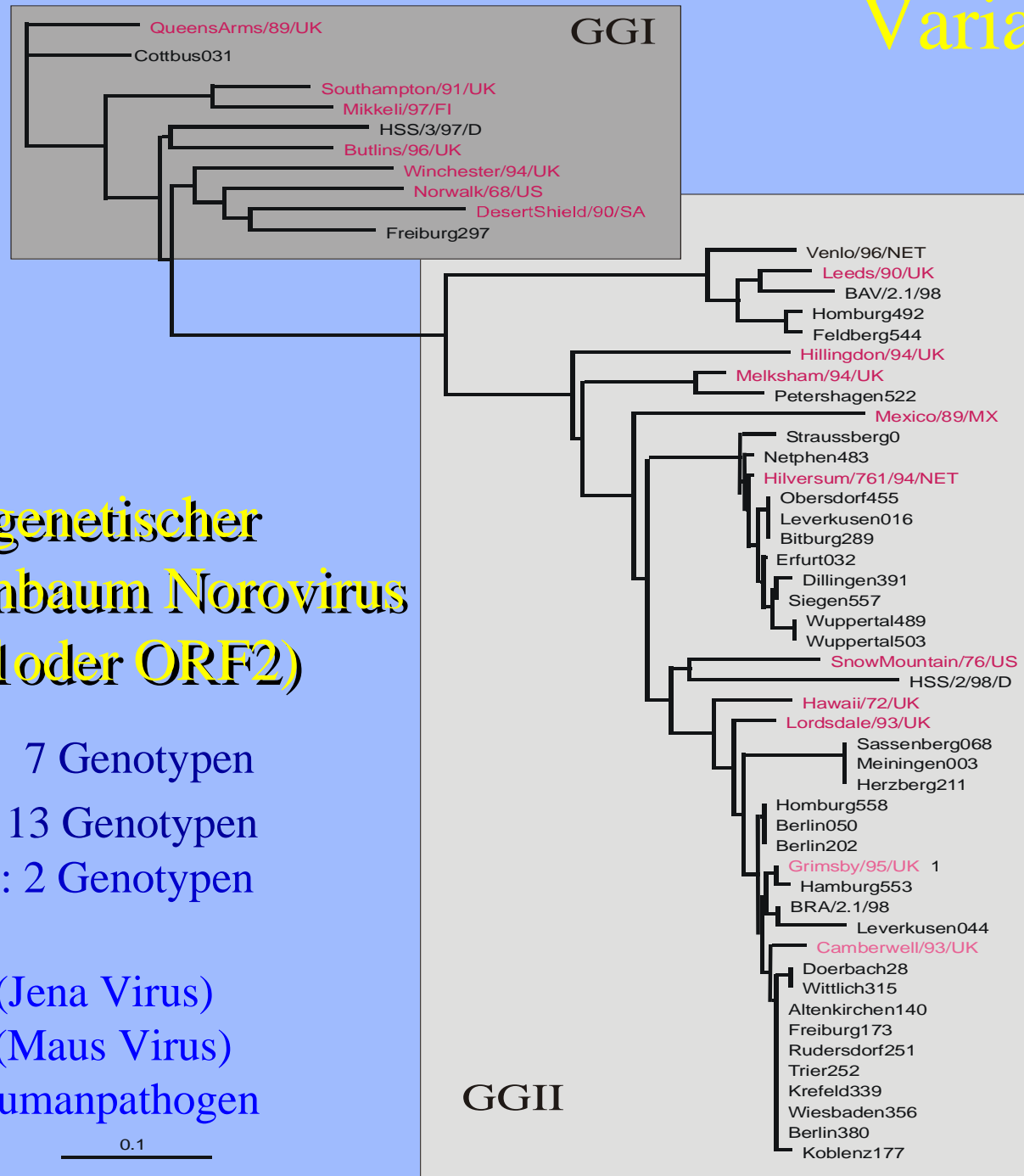
Norovirus/VLP Attachment



Se+ ca 80 % (auch asymptomatische Infektionen)

Se- ca.20 % (kein H1/H3 Antigen an der Zelloberfläche exponiert,
d.h. kein NV attachment durch fehlenden Rezeptor)

Variabilität



Phylogenetischer Stammbaum Norovirus (ORF1 oder ORF2)

GG I: 7 Genotypen

GG II: 13 Genotypen

GG IV: 2 Genotypen

GGIII (Jena Virus)

GGV (Maus Virus)

nicht humanpathogen

bei oraler Polioimpfung
(Sabin 1, 2, 3)

Norovirus

Genom-Variabilität

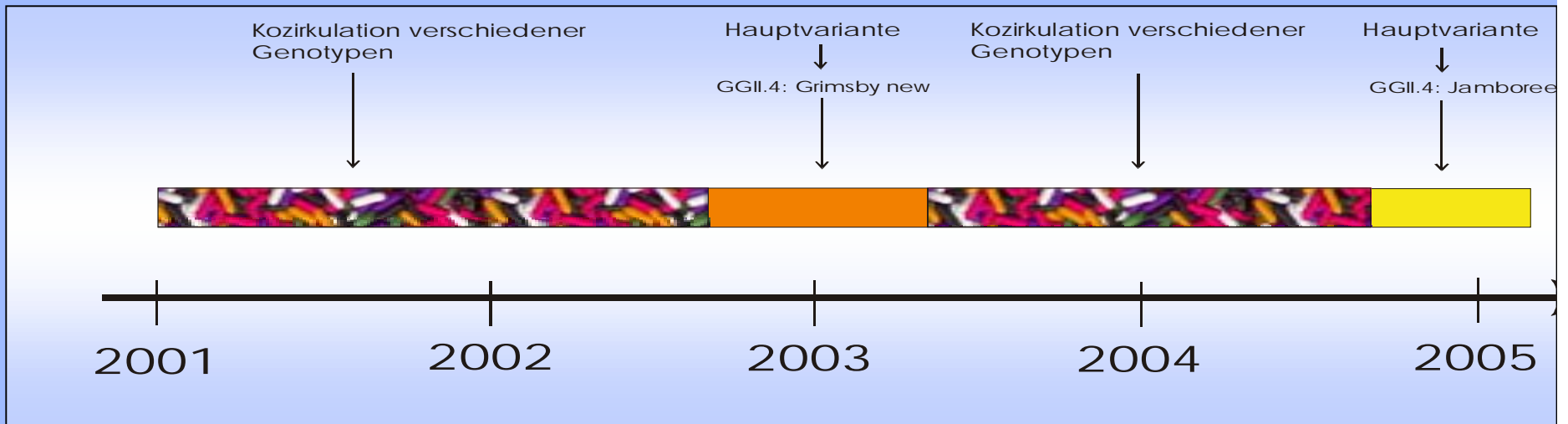
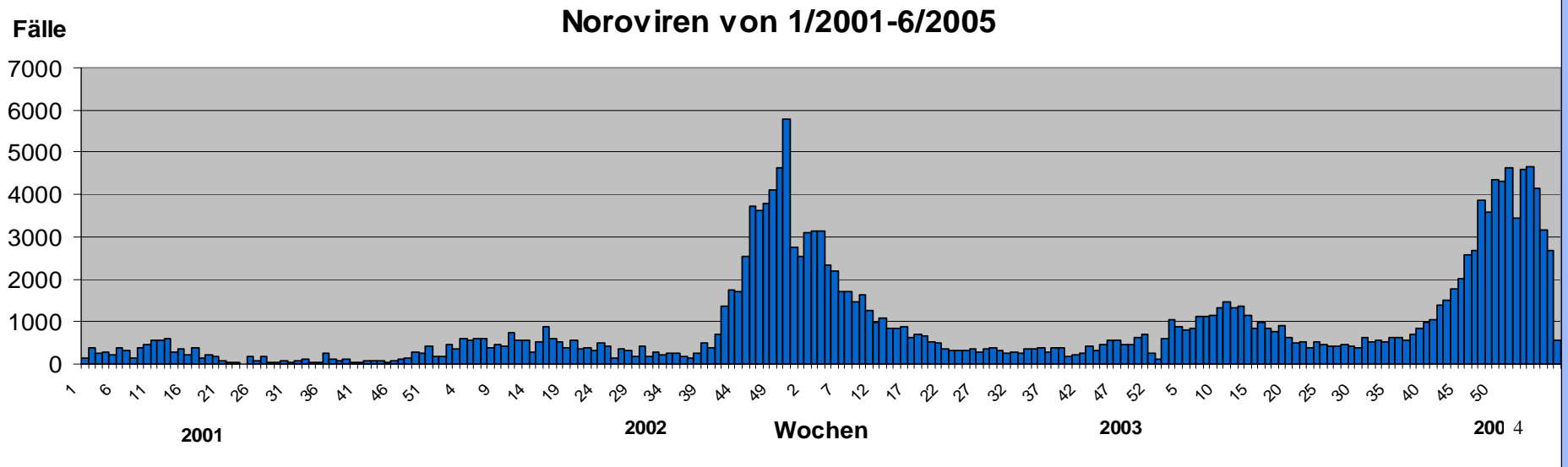
antigene drift
(Mutationen)

antigene shift
intertypische Rekombination
(Doppelinfection von Isolaten diff.
Genotypen)

intratypische Rekombination
(Doppelinfection von Isolaten einer
Genotypgruppe)

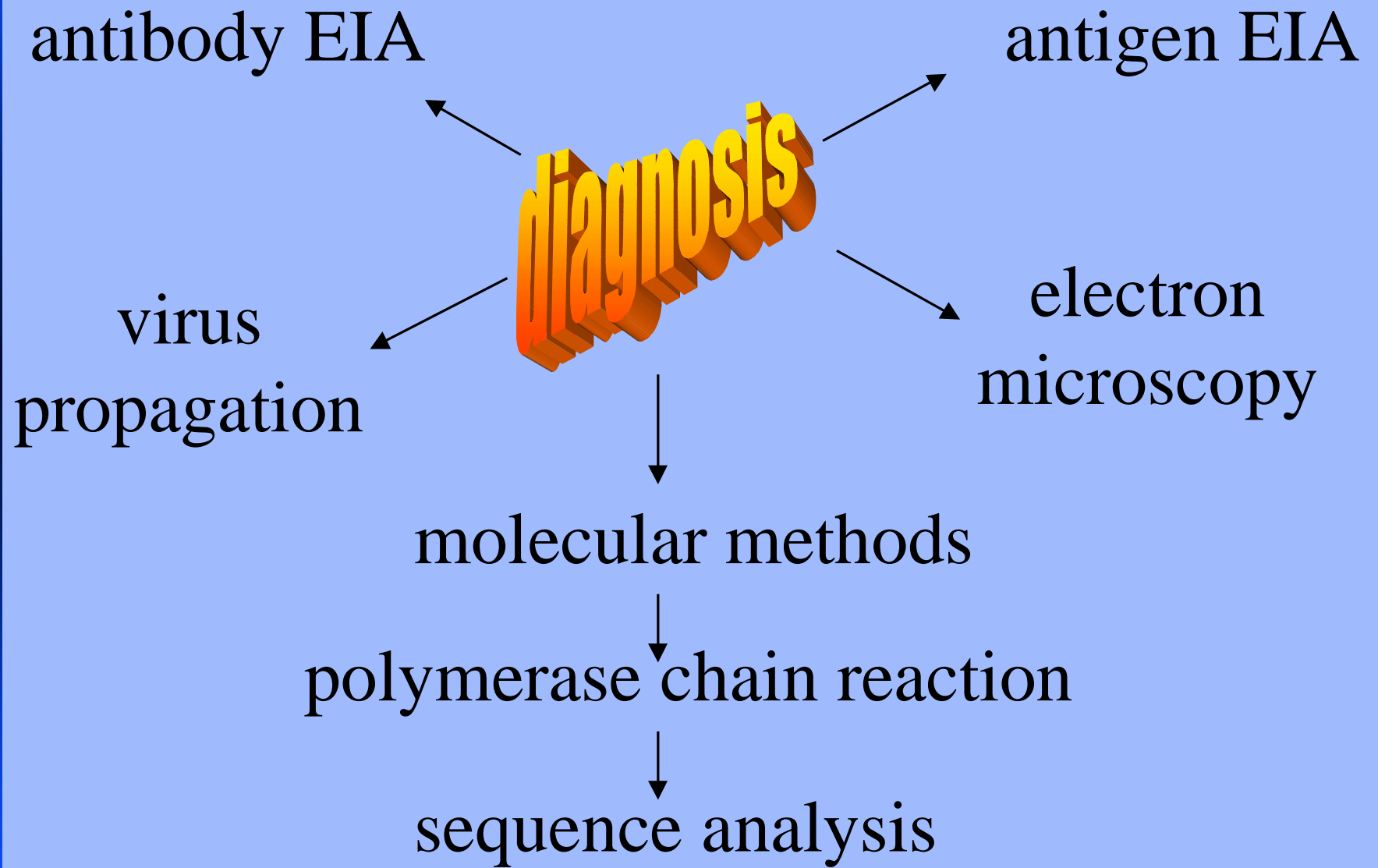


Melddaten nach IfSG (Meldepflicht seit 1.1.2001)



molekular-genetische Erfassung der Norovirus-Variabilität (Auftreten neuer Virusvarianten)

Lancet 2004



Norovirus-Nachweis im Stuhl

gibt es ein Problem?

- **nicht die Viruskonzentration im Stuhl sollte das Problem sein**
- **nicht die Virusstabilität in der Stuhlprobe**
- **nicht der Zeitpunkt der Abnahme der Stuhlprobe**

denn

Vergleich der Methoden

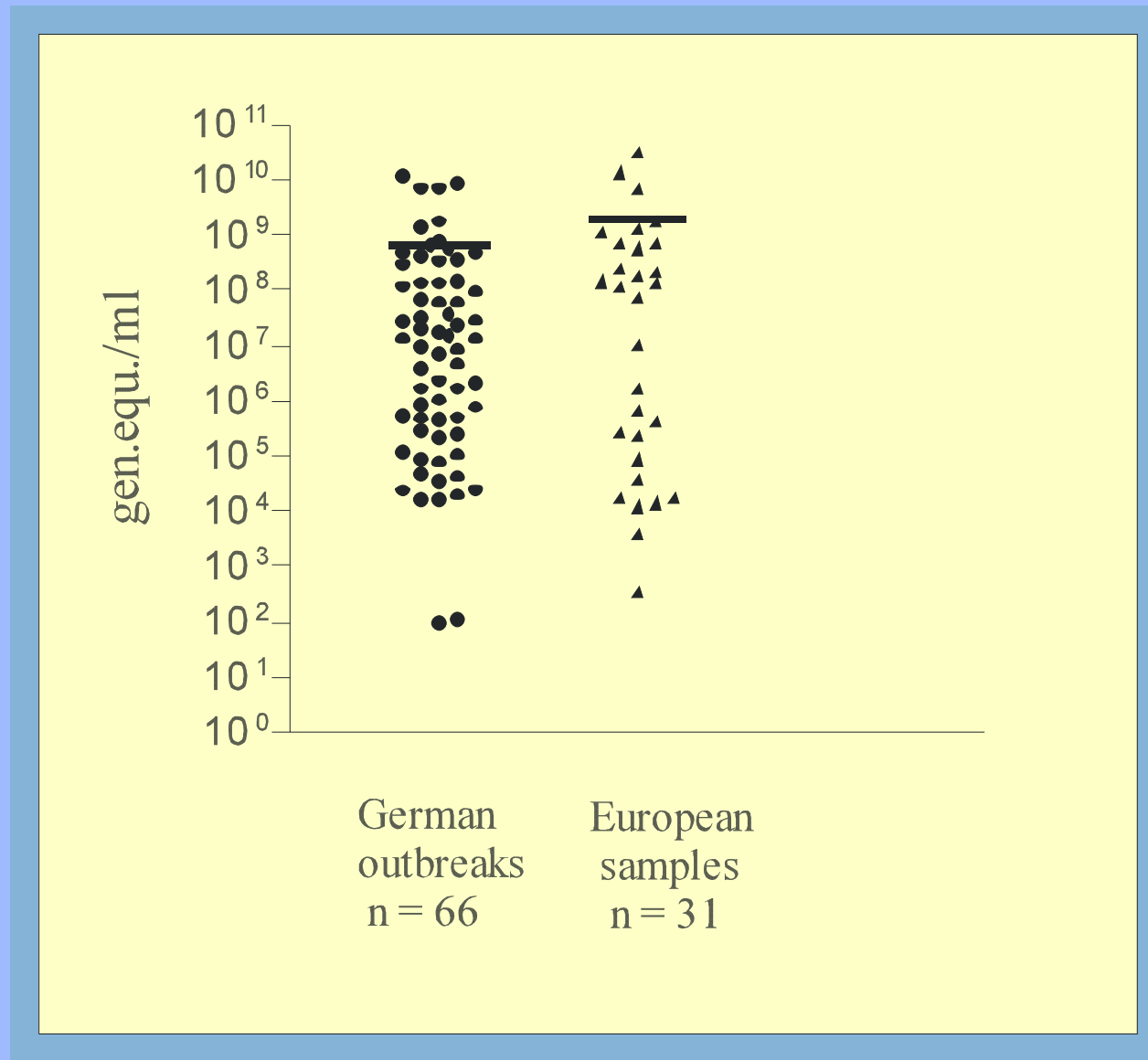
Sensitivität

PCR $>10^2$ RNA Kopien/ml Stuhlsuspension

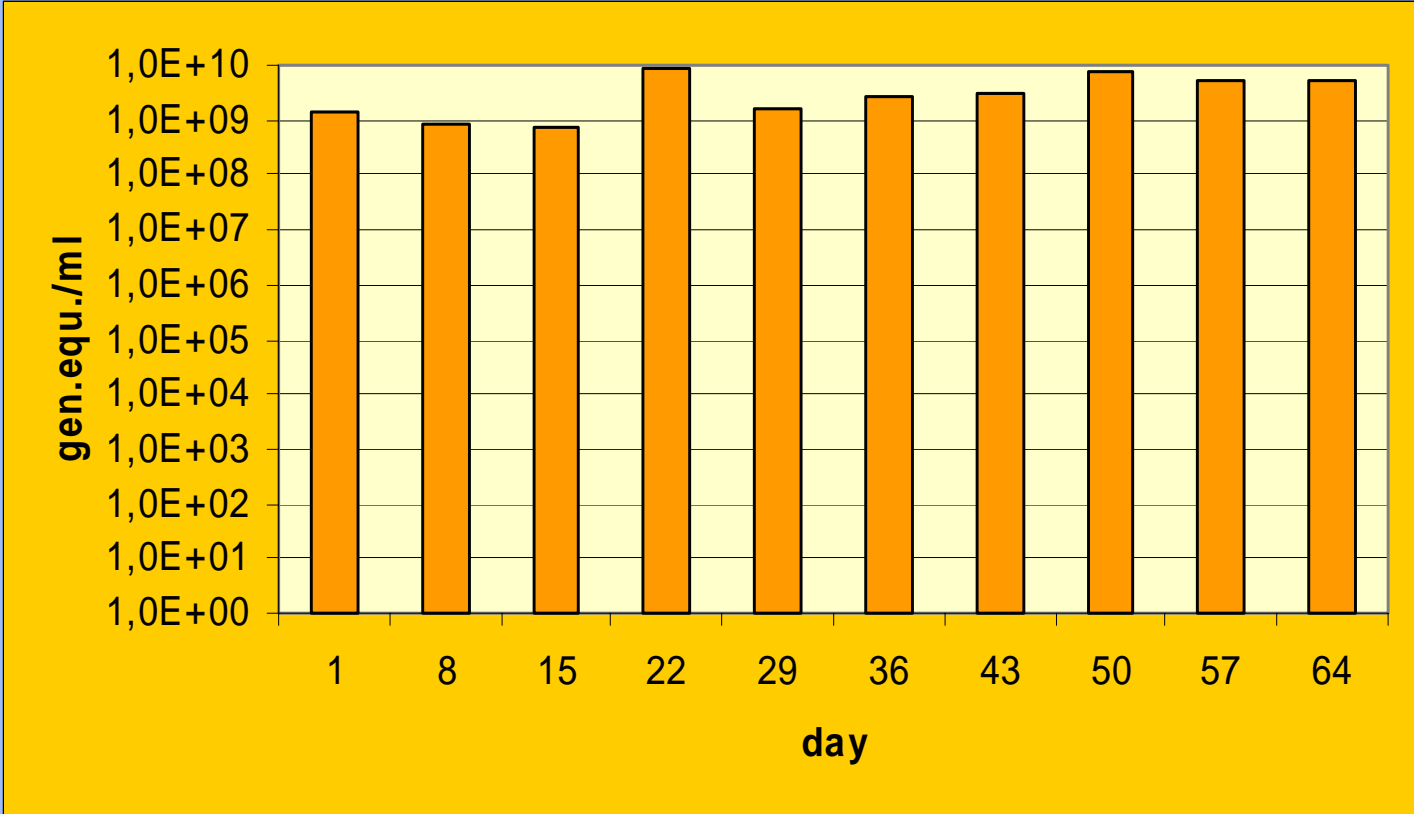
ELISA $>10^5$ Viruspartikeln/ml Stuhlsuspension

ELMI $>10^6$ Viruspartikeln/ml Stuhlsuspension

Viruslast (RNA Kopien pro ml Stuhlsuspension)

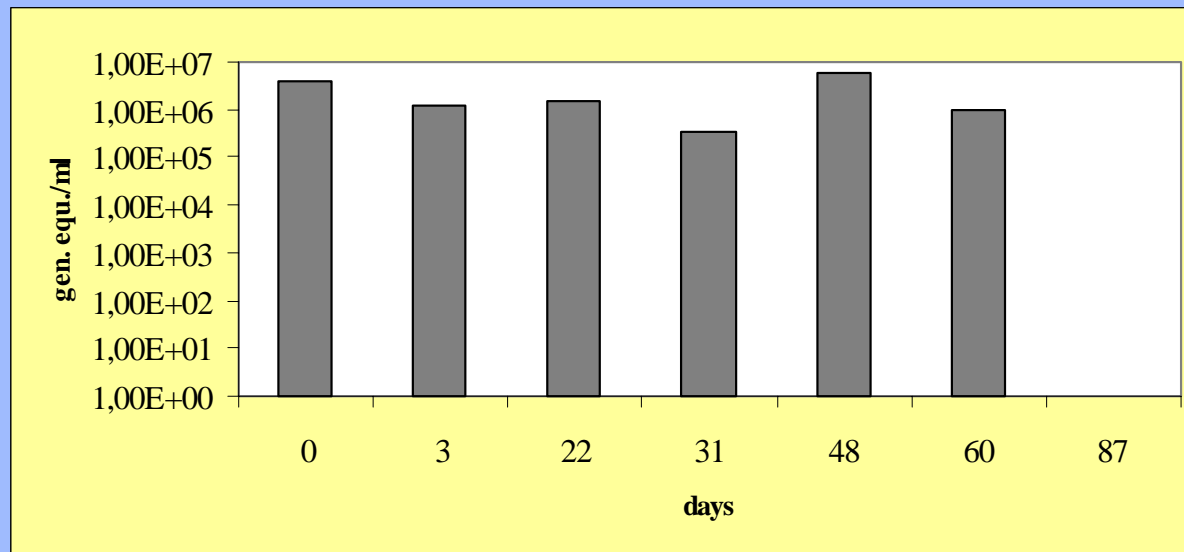


Norovirus - Stabilität



Langzeitstabilität von Norovirus positiven Stuhlproben bei Raumtemperatur

Noroviruslast bei einem Langzeit-Ausscheider



in der Regel \geq 7-14 Tage

Abnahme und Diagnostik zeitnah



Norovirus - Variabilität

kontra

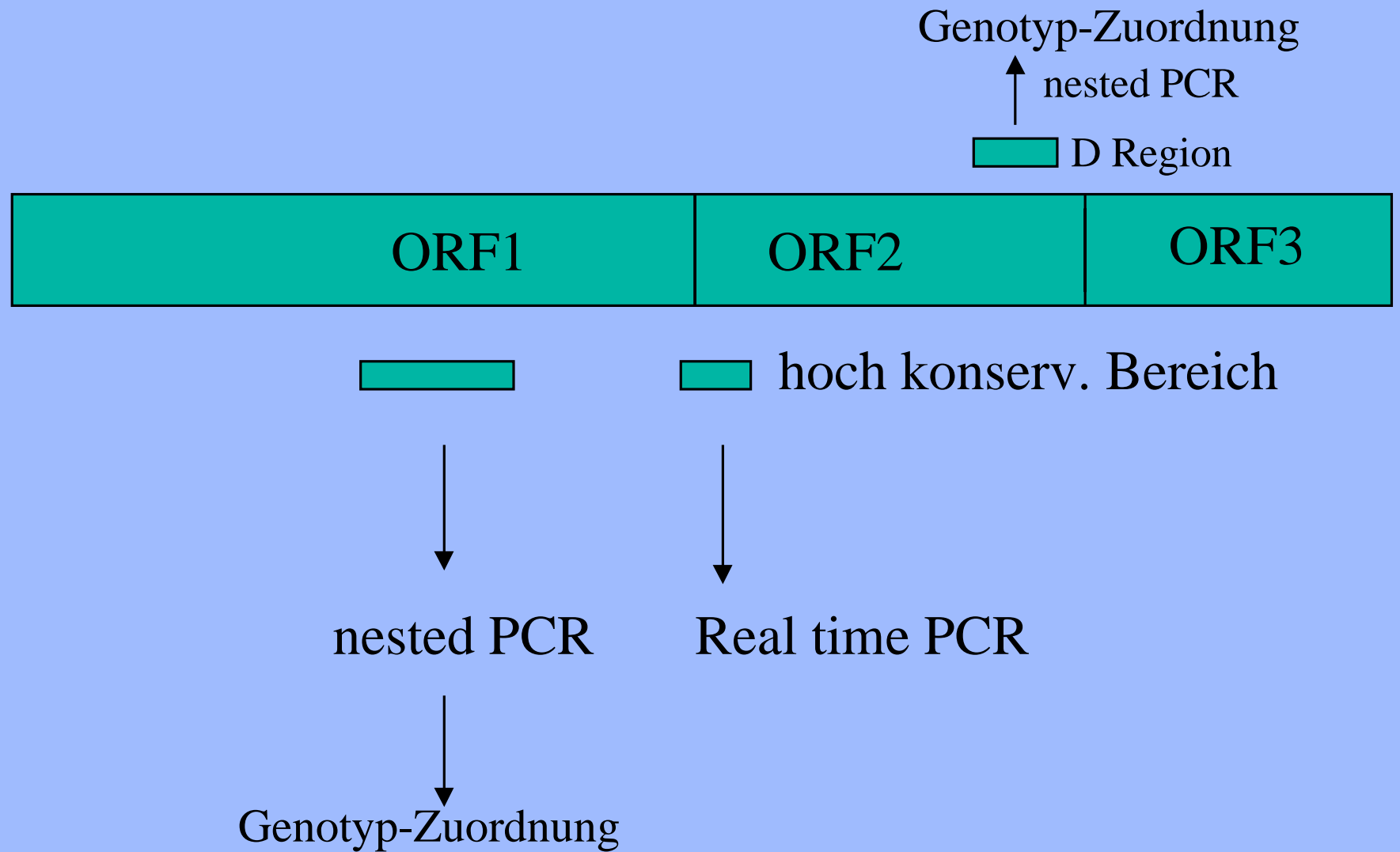
Virusnachweis?

gegenwärtiger Stand

GGI 7 Genotypen

GGII 13 Genotypen

GGIV 2 Genotypen



Norovirus RNA Amplifikation differenter Genotypen
 kein Problem

Norovirus Antigen ELISA

RIDASCREEN^R Norovirus
r-Biopharm

IDEIATM-Norovirus
DakoCytomation

Einsatz monoklonaler/polyklonaler Ak gegen
Capsidprotein (ORF2)?

Austestung von 22 Genotypen ?

Sensitivität/ Spezifität(falsch negativ/falsch positiv)

dominanter Genotyp GGII.4

Wie gut ist die Diagnostik ?

(Sensitivität/Spezifität)

- Einzelerkrankung
- Ausbruch

Ein Test sollte für beide Fragestellungen geeignet sein

- **RT-PCR**

z.B. real time oder nested PCR

- **ELISA**

RIDASCREEN Norovirus (r-Biopharm)

IDEIA Norovirus (DakoCytomation)

- **Elektronenmikroskopie**

Austestung eines dominanten Genotyps!
derzeit GGII.4 Jamboree

PCR „kontra“ ELISA

diverse Untersuchungen zum Vergleich, zumal die in house Norovirus-PCR vor den ELISAs zum Einsatz kam

in diversen Laboren (meist nicht publiziert)

Publikationen

IDEIA/DAKO - PCR

- 2004 CDC (Ando/Glass)

Sensitivität < 30% für 6 GGII Genotype

Spezifität 100 %

Schlussfolgerung: nicht geeignet

- 2003 Colindale/London (Gray/Brown)

Sensitivität 55% (24% EM)

Spezifität 98% (99% EM)

Schlussfolgerung: alternative Methode bezüglich screening zur EM bei der Aufklärung von Ausbrüchen, wenn negativ, dann PCR

Rabenau/Doerr et al. in Intervirology, Jan. 2003

which method is the best?

	nested PCR	EM	ELISA/DAKO
Sensitivität	94%	58%	31%
Spezifität	92%	98%	94%

Schlussfolgerung

- Alle drei Methoden nützlich für epidemiolog. Unters. von Gastroenteritis-Ausbrüchen
- bei Einzelerkrankungen sollten wenigstens zwei obiger Methoden angewandt werden

zwischen Mai 2003 und September 2003 Austestung diverser
Stuhlrückstellproben aus der Routine-Diagnostik (gelagert bei -20Grad)

PCR

RIDASCREEN/r-biopharm

30 positive

8 pos.+7gw.

36 negative

15 neg.

15 pos.

6 gw.

RKI Daten

Februar 2004 Vergleich PCR – RIDASCREEN – IDEIA
(Stuhl-Rückstellproben/-20Grad)

PCR	RIDASCREEN	IDEIA
16 pos.	15 pos./1gw.	7 pos.
19 neg.	4 neg. 12 pos. 3 gw.	19 neg.

März 2005 Vergleich PCR – RIDASCREEN – IDEIA (aktuelle Proben/Genotyp **JAM-GGIL4**)

PCR	RIDASCREEN	IDEIA
pos. 34	pos. 23 neg. 9 (gw. 2)	pos. 13 neg. 21
neg. 48	neg. 22 pos. 18 (gw. 8)	neg. 48
Ergebnis: Sensitivität	ca. 70%	38%
Spezifität	ca. 55%	100%

Viruslast nach real time PCR: 83% > 10⁷ Kopien/ml Stuhlsusp.

Norovirus – Nachweis - Resumee

RT-PCR:

- hohe Sensitivität und Spezifität (Goldstandard)
- selbst neue Genotypen wurden gefunden
- als real time PCR (one tube) praktikabel u. schnell
- als nested PCR hohe Anforderung an Labore
- Abrechnung ?

Antigen ELISA: Verbesserung dringend angezeigt

- generell schnell, Abrechnung ok
- RIDASCREEN(r-Biopharm) **Achtung!** falsch positiv
- IDEIA(DakoCytomation) **Achtung!** falsch negativ
- für Einzeluntersuchungen nicht geeignet
- für Ausbruchsuntersuchungen wie die Praxis derzeit zeigt ganz hilfreich, allerdings Befundbestätigung im Einzelfall durch die PCR

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

und bitte keine Norovirusinfektion

