

Untersuchung der Hitzeinaktivierung von humanen Norovirus und Surogaten in Erdbeer-Püree

Christina Bartsch, Carolina Plaza-Rodriguez, Eva
Trojnar, Matthias Filter, Reimar Johné

Bundesinstitut für Risikobewertung

Hintergrund: Norovirus-Gastroenteritis-Ausbrüche durch Tiefkühl-Beeren



EU-Notifications (RASFF 01.01.2012 bis 31.08.2014)

Food type	NoV	HAV
Shellfish incl. oysters	78	1
Frozen berries	9	16
Berry cake	0	1
Dates	0	1
Salad	0	1
Total	87	20

Norovirus-Ausbruch in Deutschland, 2012



Oktober/November 2012:

→ **10.974 erkrankte Kinder/Jugendliche** nach
Verzehr von importierten Tiefkühl-Erdbeeren

Sichere Zubereitung von Tiefkühl-Beeren (?)

Bundesinstitut für Risikobewertung
Postfach 12 69 42 • 10609 Berlin
Presserechtlich verantwortlich:
Dr. Heidi Wichmann-Schauer und Dr. Reimar Johne
Tel. +49 30 18412-0 • Fax +49 30 18412-4741
bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de



Schutz vor viralen Lebensmittelinfektionen

Menschen infizieren sich mit Viren vor allem durch direkten Kontakt zu erkrankten Menschen. In Krankenhäusern und Altenheimen, sind Noroviren eine häufige Ursache für Gastroenteritis-Ausbrüche. Insbesondere Noroviren, Rotaviren und Hepatitis E-Viren können auf Lebensmittel übertragen werden. Lebensmittel können mit Viren verunreinigt werden, wenn sie mit unreinigtem Wasser in Kontakt kommen. Betroffene Personen Hygieneregeln mit dem Verzehr von Fleisch und Innereien von infizierten Tieren als Infektionsquelle in Frage. Im Gastrointestinaltrakt vermehren sich Mikroorganismen, sie bleiben aber inaktiv.

Wie können sich Verbraucher vor viralen Lebensmittelinfektionen schützen?

Wer sich vor Infektionen mit Viren und anderen Krankheitserregern schützen möchte, sollte Obst, Gemüse und Blattsalate vor dem Verzehr sorgfältig waschen und insbesondere auf den Rohverzehr folgender Lebensmittel verzichten:

- ▶ Fleisch und Innereien von Wild- und Hauschweinen,
- ▶ Austern und andere Muscheln,
- ▶ gefrorene Beeren.

Zum Schutz vor Infektionen sollten deshalb insbesondere diese Lebensmittel vor dem Verzehr kräftig erhitzt werden.

Das bekannte Reservoir des Virus mit Freiwilligen wurde von 10 bis 100 Viren pro Liter. Selbst von ein bis zwei Viren kann es zu akutem Krankheitsausbruch kommen. Die Symptome verschwinden.

Untersuchung der Norovirus-Hitzestabilität

Problem: Kein für Lebensmitteluntersuchungen verwendbares Zellkultursystem vorhanden!

→ Direkte Infektiositäts- und Inaktivierungstests mit humanen Noroviren nicht möglich!

Untersuchung der Norovirus-Hitzestabilität

Problem: Kein für Lebensmitteluntersuchungen verwendbares Zellkultursystem vorhanden!

→ Direkte Infektiositäts- und Inaktivierungstests mit humanen Noroviren nicht möglich!

Lösungsmöglichkeiten:

1. Nutzung von **Surrogat-Viren**

2. Nutzung **molekularbiologischer Methoden**

Untersuchung der Norovirus-Hitzestabilität

Problem: Kein für Lebensmitteluntersuchungen verwendbares Zellkultursystem vorhanden!

→ Direkte Infektiositäts- und Inaktivierungstests mit humanen Noroviren nicht möglich!

Lösungsmöglichkeiten:

1. Nutzung von Surrogat-Viren

- Murines Norovirus (MNV)
auf muriner Makrophagen-
Zelllinie RAW 264.7
- Tulane Virus (TV)
auf Affen-Nierenzelllinie
LLC-MK2

2. Nutzung molekularbiologischer Methoden

Untersuchung der Norovirus-Hitzestabilität

Problem: Kein für Lebensmitteluntersuchungen verwendbares Zellkultursystem vorhanden!

→ Direkte Infektiositäts- und Inaktivierungstests mit humanen Noroviren nicht möglich!

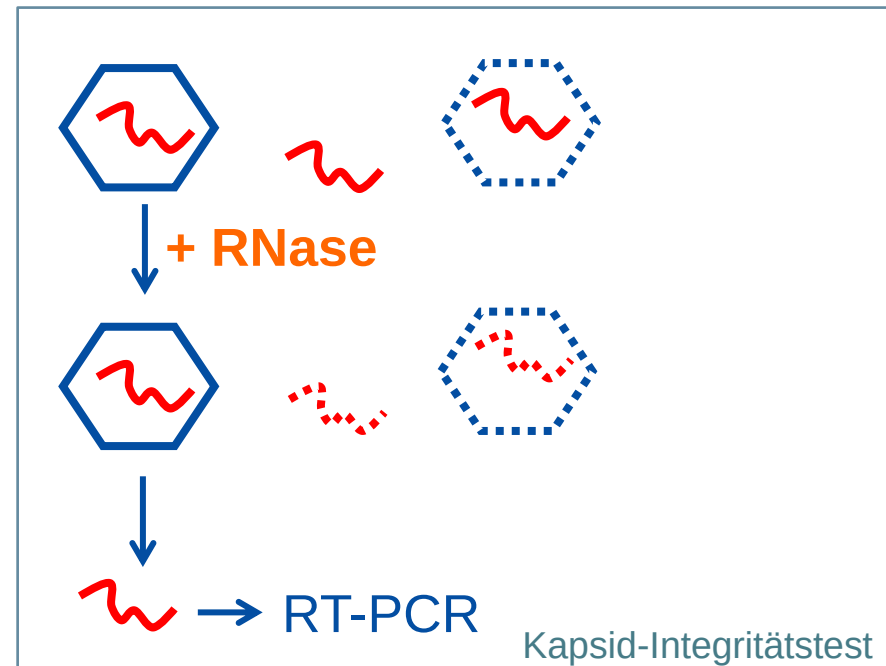
Lösungsmöglichkeiten:

1. Nutzung von Surrogat-Viren

- Murines Norovirus (MNV)
auf muriner Makrophagen-
Zelllinie RAW 264.7
- Tulane Virus (TV)
auf Affen-Nierenzelllinie
LLC-MK2

2. Nutzung molekularbiologischer Methoden

- Kapsid-Integritätstest für humanes Norovirus GII.3

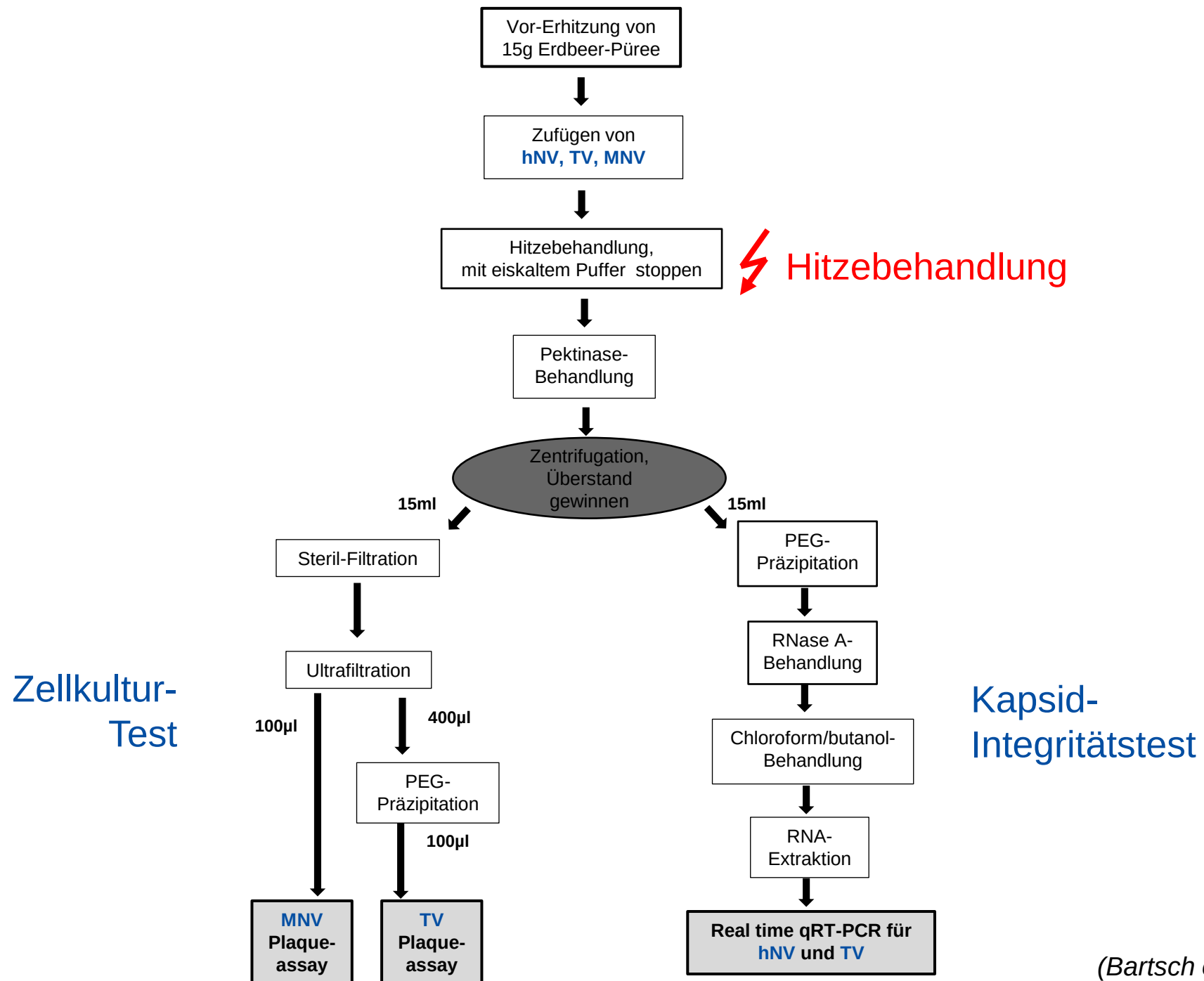


Norovirus-Hitzeinaktivierung in Erdbeerpüree

Probleme bei der Methodenentwicklung:

- starke Temperaturschwankung und sehr langsames Erhitzen nach Zugabe von Virus
 - Vor-Erhitzung des Pürees auf definierte, höhere Temperaturen und Zugabe einer kälteren Virussuspension
- Infektiositätstest nach Ultrafiltration mit TV nicht möglich
 - zusätzliche PEG-Präzipitation
- Kapsidintegritätstest für MNV nicht möglich (RNA wird auch ohne Hitzebehandlung abgebaut)
 - kein Kapsidintegritätstest für MNV

Untersuchungsschema



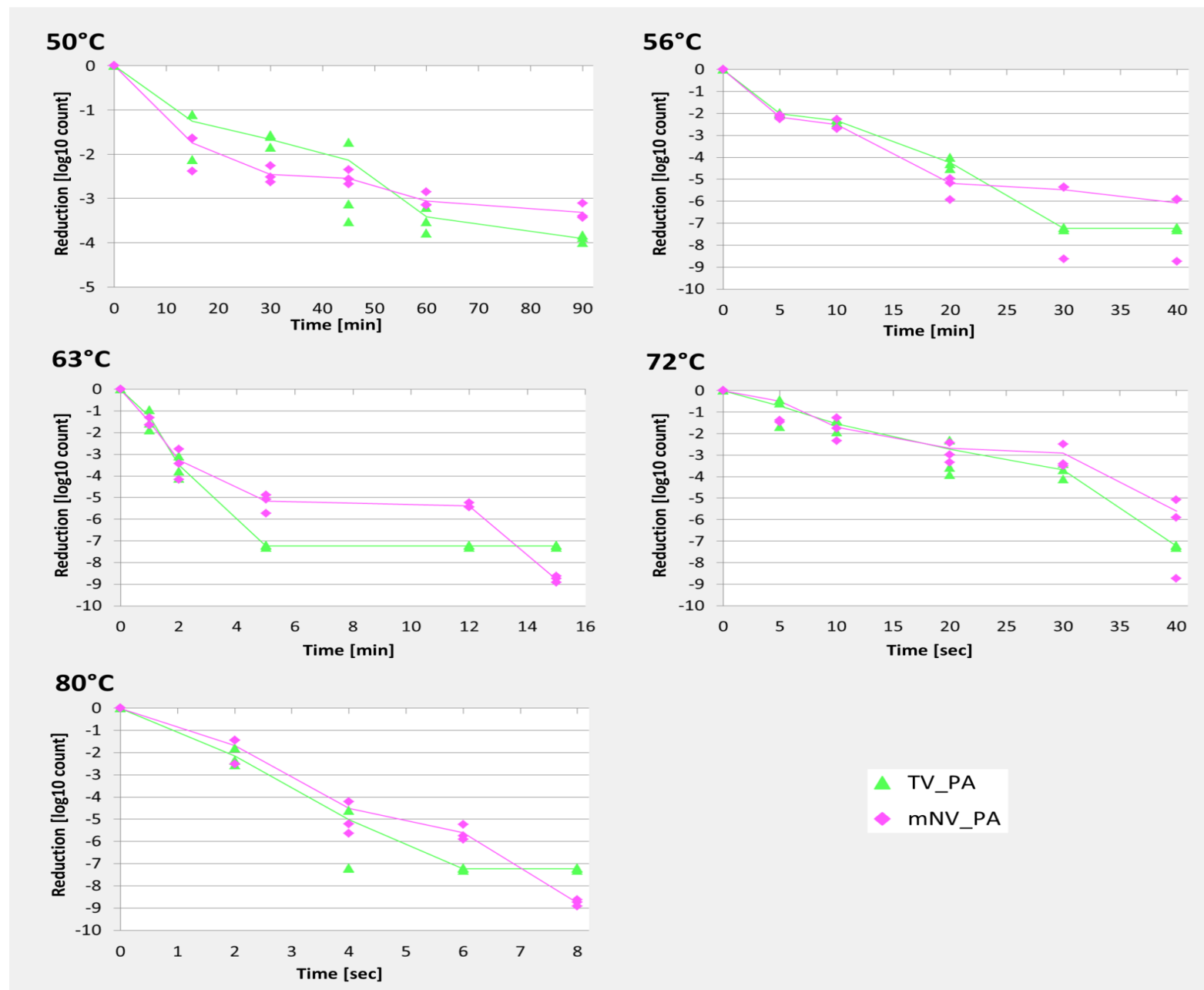
(Bartsch et al., 2018)

Temperatur-Zeit-Kombinationen

Temperatur in °C	Behandlungszeit				
	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
50	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
56	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min
63	1 min	2 min	5 min	12 min	15 min
72	5 sec	10 sec	20 sec	30 sec	40 sec
80	2 sec	4 sec	6 sec	8 sec	-

(Bartsch et al., 2018)

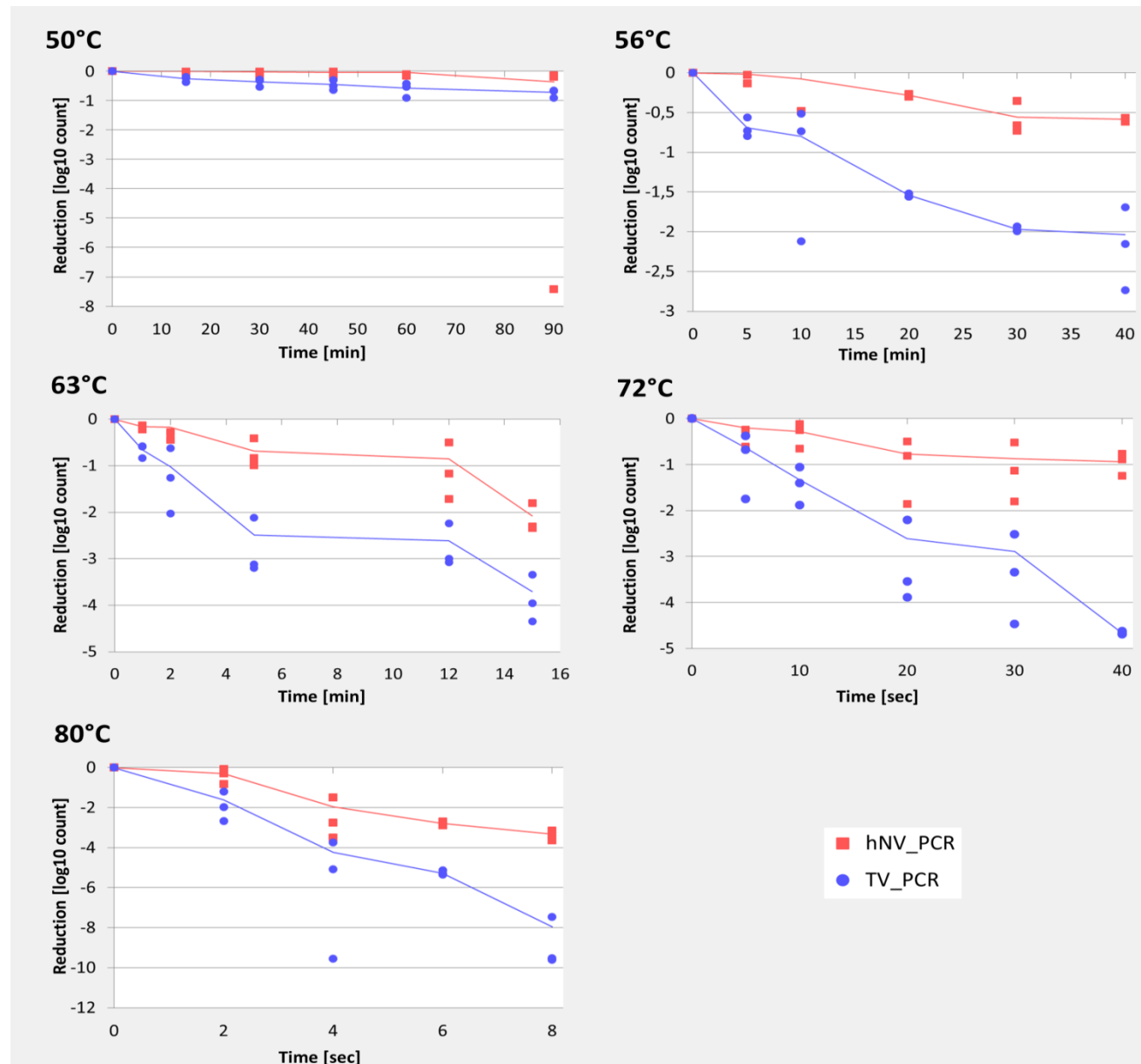
Ergebnisse: Infektiosität Surrogatviren



→ Ähnliches Verhalten, MNV etwas stabiler als TV

(Bartsch et al., 2018)

Ergebnisse: Kapsidintegritätstest



→ humanes Norovirus deutlich stabiler als TV!

(Bartsch et al., 2018)

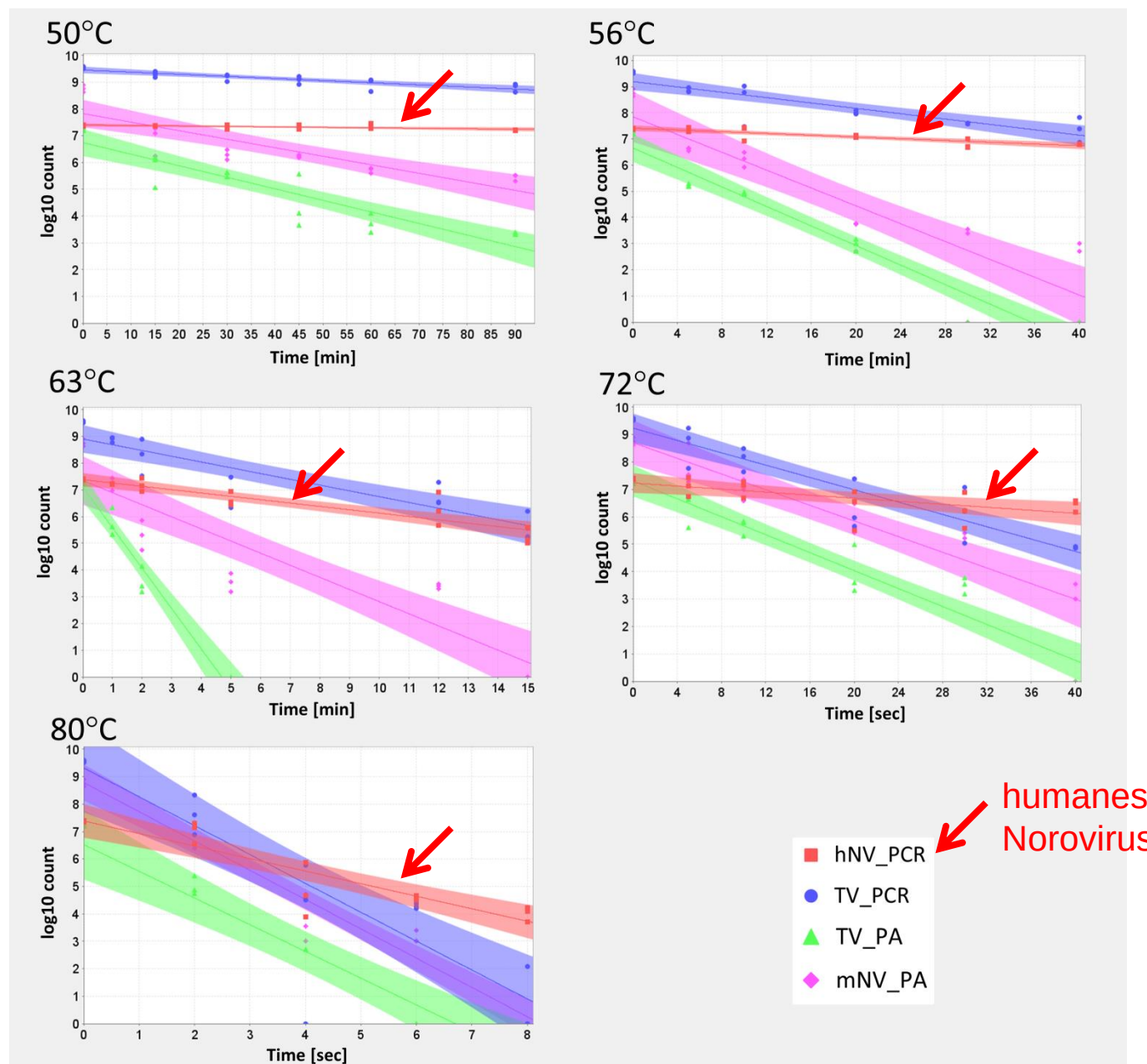
Ergebnisse: D-Werte

Virus (Assay)	T°C	D-value (min)		RMSE	R ²	
hNV (PCR ^a)	50	584. 1	±	189.5	0.1	0.4
	56	59.8	±	8.1	0.1	0.8
	63	8.0	±	1.0	0.4	0.8
	72	0.6	±	0.2	0.5	0.5
	80	0.0	±	0.0	0.6	0.8
TV (PCR ^a)	50	126. 3	±	18.8	0.2	0.7
	56	19.5	±	2.6	0.4	0.8
	63	4.6	±	0.6	0.7	0.8
	72	0.2	±	0.0	0.7	0.9
	80	0.0	±	0.0	1.7	0.8
TV (PA ^b)	50	23.2	±	2.6	0.6	0.8
	56	5.4	±	0.3	0.7	0.9
	63	0.7	±	0.0	0.5	1.0
	72	0.1	±	0.0	0.7	0.9
	80	0.0	±	0.0	1.3	0.8
MNV (PA ^b)	50	31.4	±	4.8	0.6	0.7
	56	5.9	±	0.7	1.2	0.8
	63	2.2	±	0.3	1.3	0.8
	72	0.1	±	0.0	1.0	0.8
	80	0.0	±	0.0	0.7	1.0

D-Wert: **Zeit**, die zur **Reduzierung um 1 log₁₀-Stufe** bei einer bestimmten Temperatur benötigt wird

(Bartsch et al., 2018)

Erstellung von Inaktivierungs-Modellen



(Bartsch et al., 2018)

Globales Inaktivierungs-Modell für humanes Norovirus in Erdbeerpüree

Temperatur (°C)	Zeit	$\log_{10}$ Reduktion	
50	90 min	0.2 $\log_{10}$	Nicht ausreichend!
56	30 min	0.4 $\log_{10}$	
63	15 min	1.8 $\log_{10}$	
72	40 sec	1.4 $\log_{10}$	OK
80	8 sec	3.6 $\log_{10}$	

(Bartsch et al., 2018)

Zusammenfassung

- Durch das Fehlen von Zellkultur-Assays kann die Hitzestabilität von humanem Norovirus nicht direkt ermittelt werden
- Surrogat-Viren (MNV, TV) wurden deshalb in Infektiositätassays verwendet
- TV ist im Kapsidintegritätsassay deutlich stabiler als im Infektiositätsassay
- Humanes Norovirus ist im Kapsidintegritätsassay deutlich stabiler als TV
 - Surrogatviren können nur schlecht das Verhalten von humanem Norovirus widerspiegeln
- Ein globales Modell für die humane Norovirus-Inaktivierung wurde erstellt:
 - Temperaturen unter 70°C sind nicht geeignet, aber bei 80°C für 10 sec. etwa 4 log₁₀-Reduktion
 - Modell sollte validiert werden, sobald Infektiosität gemessen werden kann

Acknowledgements



Bundesinstitut für Risikobewertung

BfR:

Christina Bartsch

Eva Trojnar

Carolina Plaza-Rodriguez

Matthias Filter



*Project funding:
(no. 1332-647)*



Bundesinstitut für Risikobewertung

Bundesinstitut für Risikobewertung

DiedersdorferWeg 1 • D-12277 Berlin

Tel. 030 18412 - 1006 • Fax 030 18412 - 2064

Reimar.Johne@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de