

Amplikon-basierte Next-Generation Sequencing-Methode zur Typisierung humaner Norovirus-Stämme

27.11.2025

Jessica Panajotov

Norovirus Gastroenteritis

Symptome

Erbrechen, Durchfall, Fieber,
sekundär Kopfschmerzen

Risikogruppe

Kinder <5 Jahre, Erwachsene >70 Jahre

Übertragung

Fäkal-oral
z.B. über kontaminierte Oberflächen, Lebensmittel,
Kontakt mit Stuhl oder Erbrochenem von
Infizierten

Häufig betroffene Lebensmittel



Notifications 2024, Risk status: potentially serious

Lebensmittelkategorie	Meldungen
Zweischalige Weichtiere und entspr. Produkte (Austern)	38
Obst und Gemüse	4
Gesamt	42

Hauptinfektionsquelle Lebensmittel mit direktem oder indirektem Kontakt mit menschlichen Ausscheidungen

direkt	Abwasser im Meer, Virusanreicherung in Muscheln
indirekt	Mangelnde Hygiene bei Anbau, Ernte, Transport, Zubereitung (z.B. Tiefkühl-Beeren)

Schutz durch ausreichende Erhitzung der Lebensmittel

Das Norovirus

Familie *Caliciviridae*

Einteilung in zahlreiche Genogruppen (GI-GX)

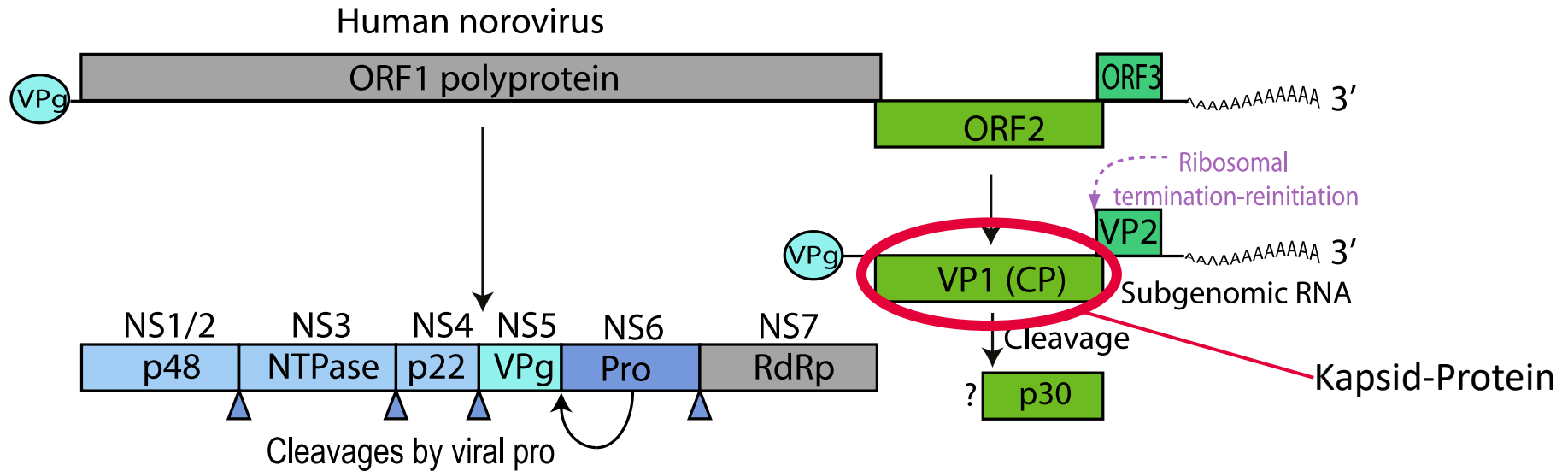
humanpathogen GI, GII (und selten GIV)

unterteilt in viele verschiedene Genotypen

GI.4 und GI.17 dominant in Deutschland

ausgeprägter Antigendrift und saisonaler
Antigen shift → Bildung zahlreicher Varianten

Norovirus Genomorganisation



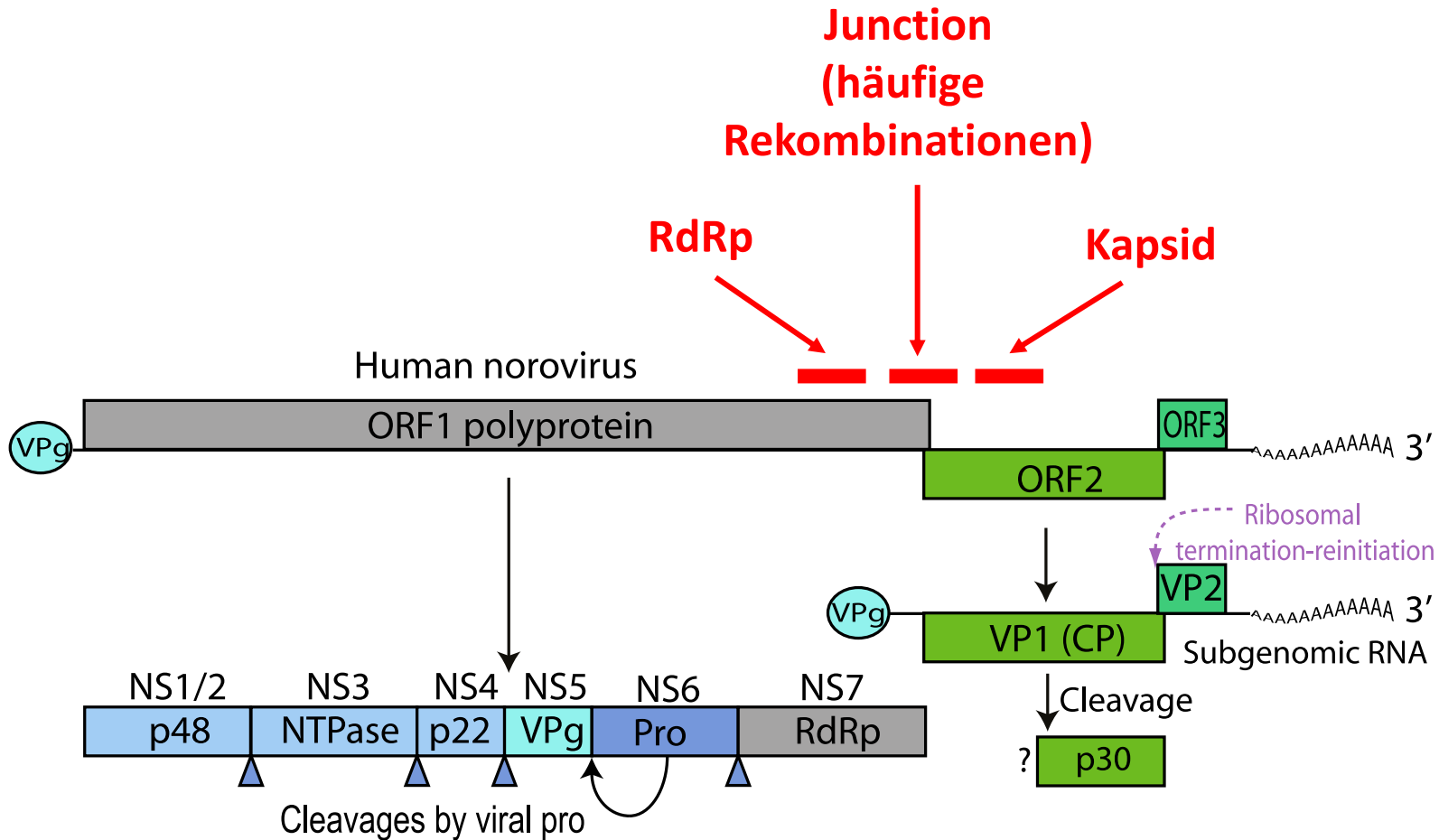
Aktuelle Nachweismethode für Norovirus in Lebensmitteln: ISO-15216-1/2:2021

→ nur Differenzierung zwischen GI und GII möglich

→ zur weiteren Typisierung sind zusätzliche Methoden nötig

Norovirus – Regionen zur Typisierung

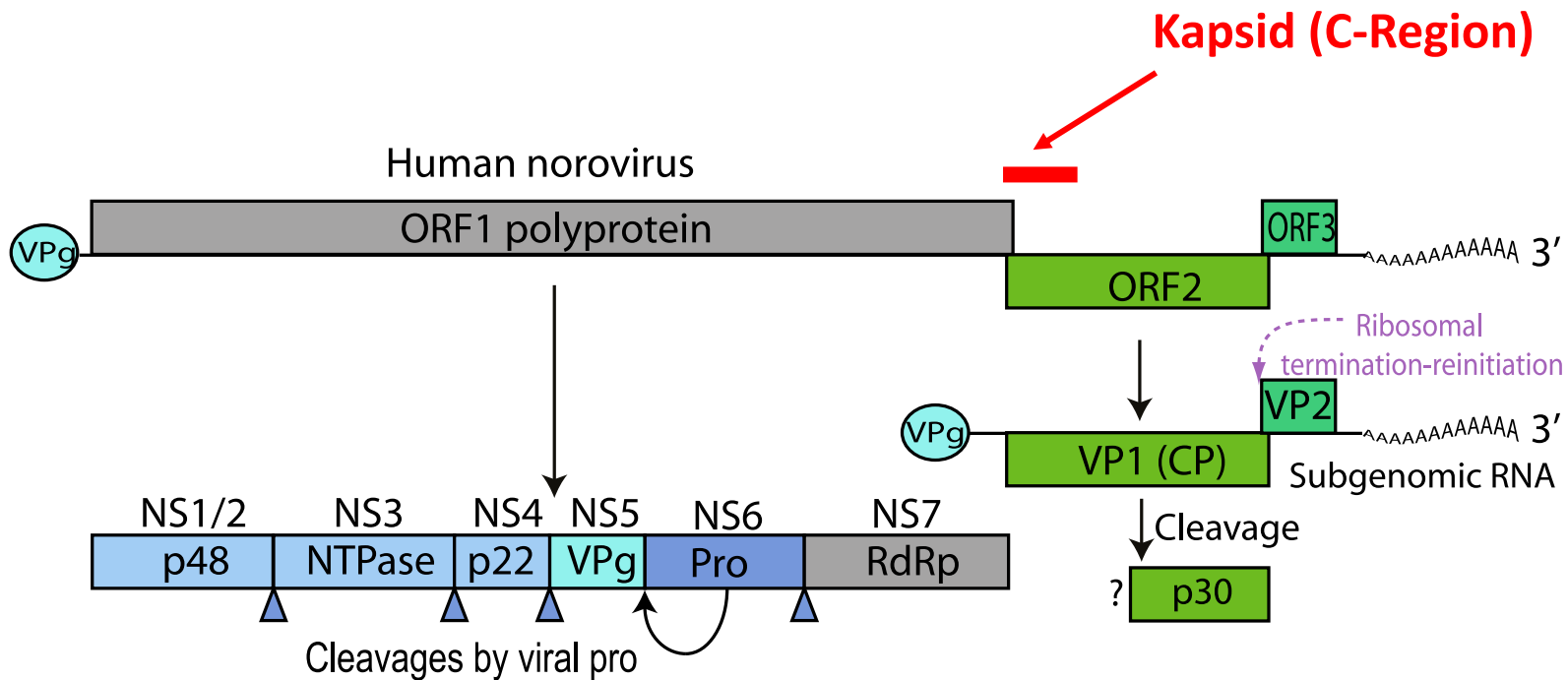
→ Verschiedene Regionen zur Typisierung publiziert:



Norovirus – Region zur Typisierung (aus §64-AG Viren)

→ Für Typisierung in Lebensmitteln:

(https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Protokoll-Nachweis-Noroviren.html)



Sanger Sequencing-Methode aus §64-AG Viren

(https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Protokoll-Nachweis-Noroviren.html)

Genotypspezifische (GI oder GII) RT-PCR für VP1

1. RT-PCR
2. Semi-nested PCR (nur Änderung des Foreward Primers)
3. Sanger Sequencing



Gut etabliert
Geringe Hands-on-Time
kostengünstig



nicht mehr gut mit
aktuellen Typisierungs-
Workflows (z.B. NGS
Bakterien) vereinbar

Mischkontaminationen
mehrerer NoV-Typen
können nicht identifiziert
werden

Typisierungsansatz mit NGS (von EURL Foodborne Viruses)

Guidelines for amplicon sequencing of the capsid region of noroviruses

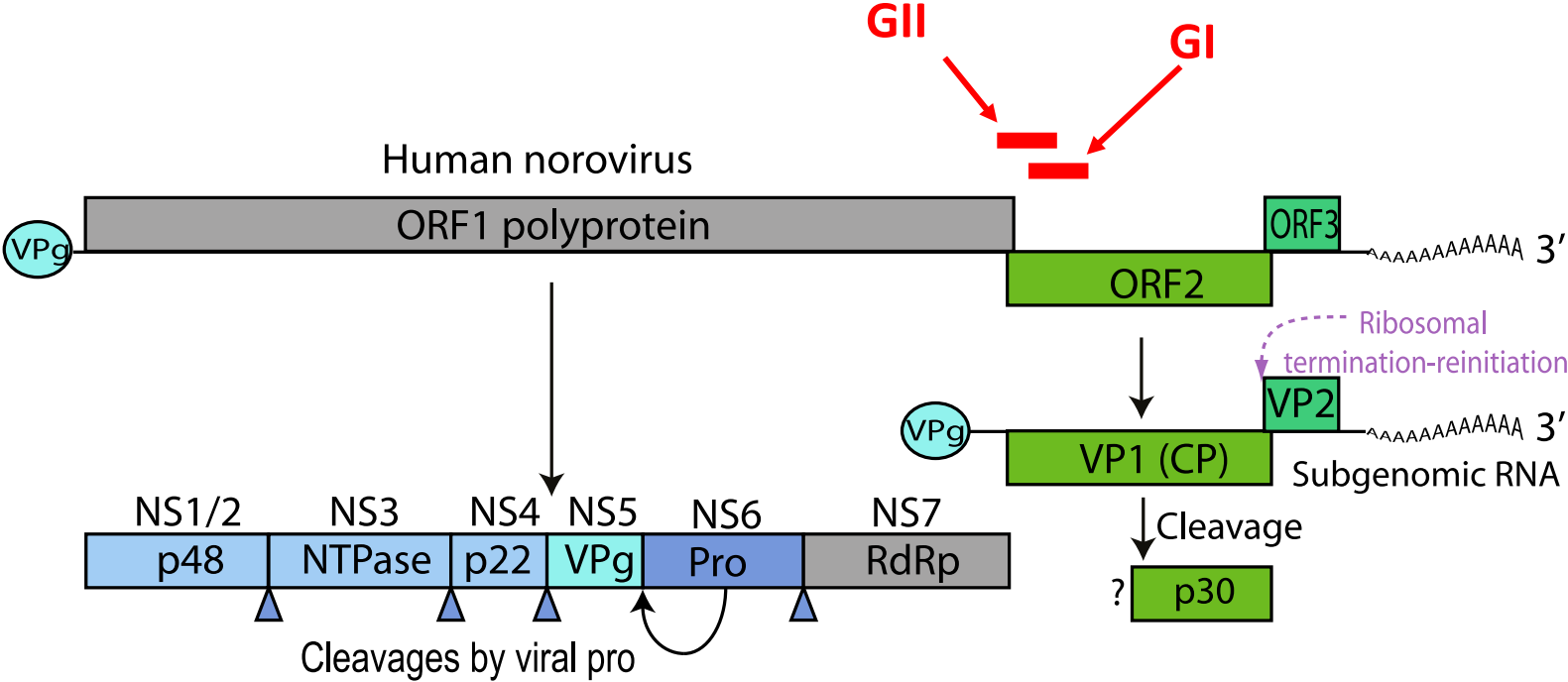
European Union Reference Laboratory for Foodborne Viruses

Swedish Food Agency, Uppsala, Sweden

and the NRL foodborne viruses working group on NGS



Typisierungsansatz mit NGS (von EURL Foodborne Viruses)



Typisierungsansatz mit NGS (von EURL Foodborne Viruses)

Doppelter Ansatz bei unbekannter Probe nötig

Start ähnlich zu klassischer Typisierungsmethode:

1. One-step RT-PCR (GI oder GII-spezifisch)
2. Semi-nested PCR (GI oder GII-spezifisch)
3. Bead-basierte Reinigung des PCR-Produkts von Primern und freien Adaptern
4. Illumina-Index-PCR
5. Bead-basierte Reinigung des PCR-Produkts von Primern und freien Adaptern
6. Analyse der Library mit Fragment-Analyzer



Semi nested PCR Primer mit angehängter Illumina Adaptersequenz am 5'-Ende , Kürzung des PCR-Produkts



Indexsequenzen und Illuminas p5/p7-Adapter werden angefügt

Etablierung der EURL-Methode am BfR

(1)

Extraktion von Virus RNA verschiedener Genogruppen aus **Stuhlproben**

(2)

Künstliche Kontamination **gefrorener Erdbeeren** mit Stuhlproben unterschiedlicher Genogruppen

(1A)

GI.5
Stuhl

(1B)

GII.4
Stuhl

Stuhlproben



TK-
Erdbeeren

RNA Extraktion

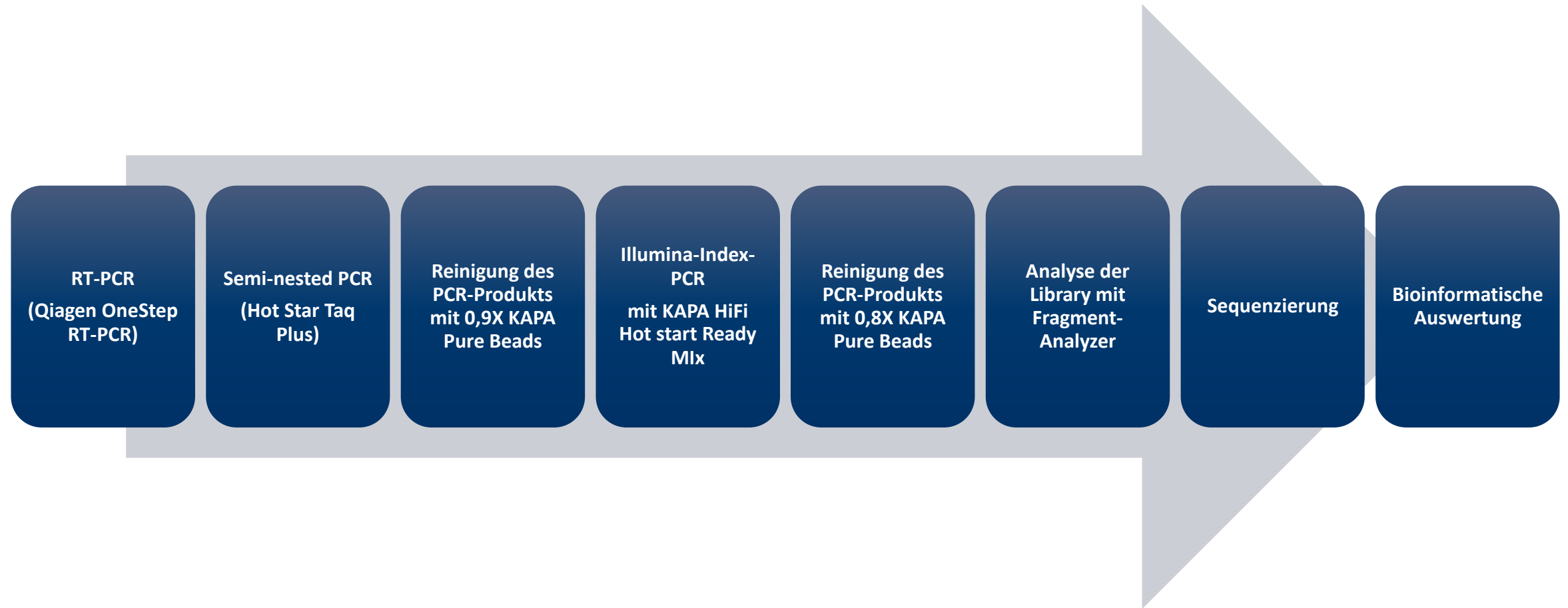
(2A)

Mix aus
2 Subtypen
aus GI

(2B)

Mix aus
2 Subtypen
aus GII

Etablierung der EURL-Methode am BfR



Sequenzierung

Länge der PCR-Produkte bzw. der Libraries je nach Genogruppe unterschiedlich.

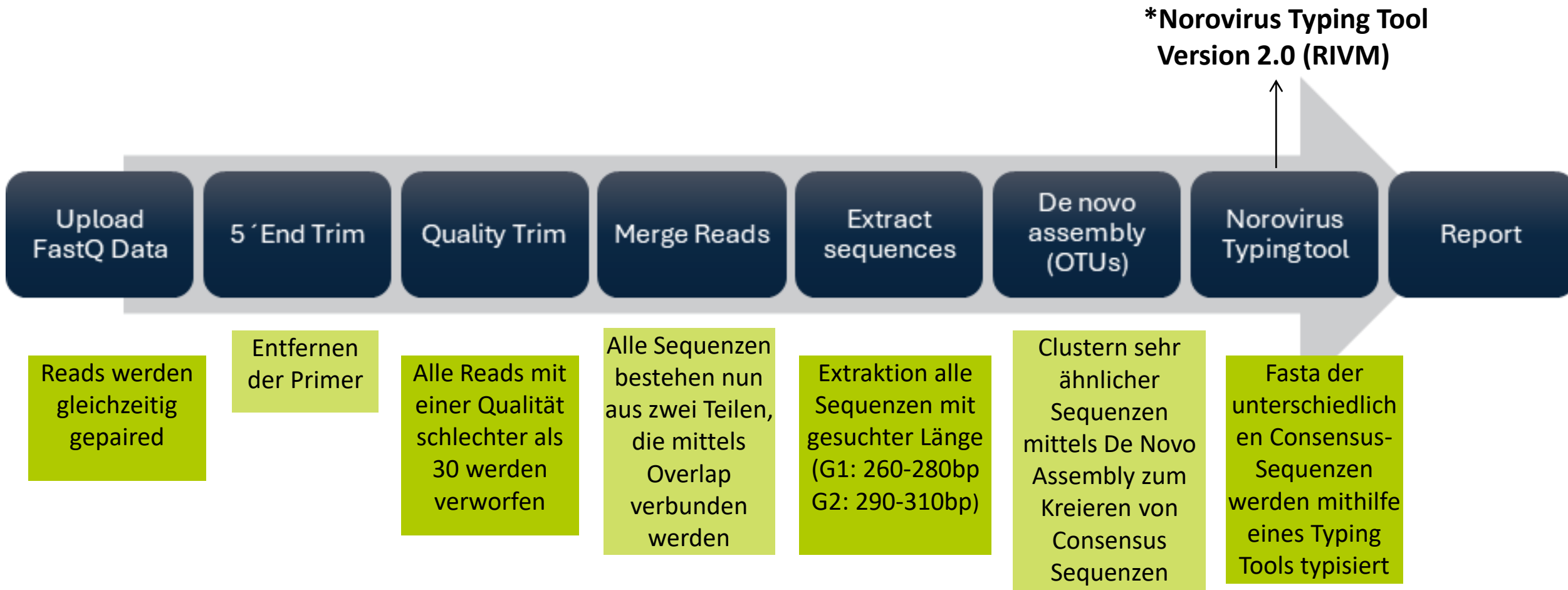
G1: 470-490bp
G2: 490-520bp

MiSeq Reagent Kit v3

Fragment Analyser hat in unserem Versuch zu kleine Libraries für G2 von ca 400bp ergeben

2x300bp, d.h. Readlänge von bis zu 600bp möglich

Bioinformatische Analyse (Geneious Prime)



Ergebnisse: Auswertung der Stuhlproben

(1A)

GI.5
Stuhl

Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (1022609680) later.

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
Contig_1	278	Caliciviridae Norovirus GI	78.10219		GI.5	Report	
Contig_2	274	Caliciviridae Norovirus GI	76.383766		GI.5	Report	
Contig_3	273	Caliciviridae Norovirus GI	78.48605		GI.5	Report	
Contig_4	273	Caliciviridae Norovirus GI	78.48605		GI.5	Report	
Contig_5	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.296295		GI.5	Report	
Contig_6	273	Caliciviridae Norovirus GI	77.40741		GI.5	Report	
Contig_7	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.666664		GI.5	Report	
Contig_8	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.666664		GI.5	Report	
Contig_9	273	Caliciviridae Norovirus GI	77.03703		GI.5	Report	

Ergebnisse: Auswertung der Stuhlproben

(1B)

GII.4
Stuhl

Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (707477344) later.

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
Contig_1	341	Caliciviridae Norovirus GII	74.46154		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_2	319	Caliciviridae Norovirus GII	74.433655		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_3	319	Caliciviridae Norovirus GII	74.433655		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_4	295	Caliciviridae Norovirus GII	75.61838		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_5	299	Caliciviridae Norovirus GII	74.20495		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_6	299	Caliciviridae Norovirus GII	74.20495		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_7	299	Caliciviridae Norovirus GII	73.85159		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_8	299	Caliciviridae Norovirus GII	74.91166		GII.4 Sydney_2016	Report	

Ergebnisse: Auswertung der Beerenprobe

Stuhlproben



TK-
Erdbeeren



(2A)

Mix aus
2 Subtypen
aus GI

- ➔ nur ein NoV-Stamm wurde identifiziert
- ➔ zu geringe Menge des zweiten Stammes?
- ➔ weitere Optimierungen nötig

Norovirus Genotyping Tool Results
You may bookmark this page to revisit results of this job (35535997) later.

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
Contig_1	280	Caliciviridae Norovirus GI	77.85714		GI.5	Report	
Contig_2	273	Caliciviridae Norovirus GI	79.28287		GI.5	Report	
Contig_3	273	Caliciviridae Norovirus GI	77.03703		GI.5	Report	
Contig_4	273	Caliciviridae Norovirus GI	77.15356		GI.5	Report	
Contig_5	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.666664		GI.5	Report	
Contig_6	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.296295		GI.5	Report	
Contig_7	273	Caliciviridae Norovirus GI	76.666664		GI.5	Report	



Zusammenfassung

Amplikon-basierte Next-Generation Sequencing-Methode zur Typisierung humaner Norovirus-Stämme

- soll Typisierung von Noroviren in Lebensmitteln ermöglichen
- auch Misch-Kontaminationen sollen identifiziert werden
- soll in etablierte NGS-Workflows integrierbar sein

Pilotversuch

- Erfolgreiche Typisierung von GI- und GII-Noroviren aus Stuhlproben
- Erfolgreiche Typisierung von GI-Norovirus aus künstlich kontaminierten TK-Erdbeeren

- Misch-Kontaminationen konnten nicht identifiziert werden
- Detektionslimit noch nicht bekannt

→ weitere Optimierung der Technik

Danke!

Bundesinstitut für Risikobewertung:

Katja Schilling-Loeffler

Eva Trojnar

Stefanie Prosetzky

Nadine Althof

Josephine Grützke

4NSZ

EURL (Uppsala, Schweden):

Magnus Simonsson



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Jessica Panajotov

Bundesinstitut für Risikobewertung

[bfr.bund.de](https://www.bfr.bund.de)



gültig für Texte, die vom BfR erstellt wurden
Bilder/Fotos/Grafiken sind ausgenommen, wenn nicht anders gekennzeichnet

BfR | Risiken erkennen –
Gesundheit schützen


Verbraucherschutz zum Mitnehmen

BfR2GO – das Wissenschaftsmagazin des BfR


[bfr.bund.de/veroeffentlichungen/bfr2go/](https://www.bfr.bund.de/veroeffentlichungen/bfr2go/)

Folgen Sie uns

 [@bfrde](#) | [@bfren](#) | [@Bf3R_centre](#)

 [@bfrde](#)


 [youtube.com/@bfr_bund](https://www.youtube.com/@bfr_bund)

 social.bund.de/@bfr

 [linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung](https://www.linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung)

 podcast.bfr.bund.de

 threads.net/@bfrde

 bsky.app/profile/bfrde.bsky.social