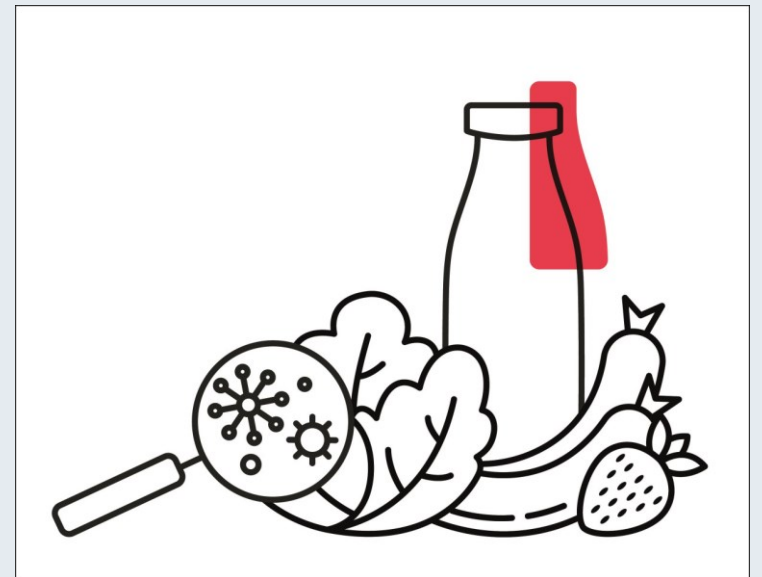


# Qualitativer Nachweis von Adenoviren von Lebensmittel- Oberflächen

Eva Trojnar, Nadine Althof, Reimar Johne

BfR-Symposium Lebensmittel-assoziierte Viren

## 6. BfR-Symposium Lebensmittel- assoziierte Viren



# Lebensmittel-bedingte Viruserkrankungen

- Lebensmittel-assoziierte Viruserkrankungen keine Seltenheit mehr
- Bewusstsein für viele „typischen“ Virus/Matrix-Kombinationen als Ursache einer Erkrankung oder eines Ausbruchs immer größer
- Voraussetzung für Nachweis: validierte Methoden
- Sammlung der Verfahren für den Nachweis von Viren in Lebensmitteln (ASU) wächst



# Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL): Auftrag zur Veröffentlichung einer Amtlichen Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung
- Geschäftsstelle ASU beim BVL eingerichtet
- Erarbeitung, Festlegung und Standardisierung von neuen Probenahme- und Untersuchungsverfahren erfolgt in Arbeitsgruppen (Sachkenner aus Überwachung, Wissenschaft und Wirtschaft)



The screenshot shows the top navigation bar of the BfR website with links for ENGLISH, NUTZERBEFRAGUNG, PRESSE, AKTUELLES, DATENSCHUTZ, GEBÄRDENSPRACHE, and LEICHTE SPRACHE. Below this is a secondary menu with 'Aufgaben', 'Arbeitsbereiche', 'Service', and 'Menü'. The main content area has a light blue background with the title 'Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU)' and an icon of laboratory glassware. Below the title is the text 'gemäß § 64 LFGB, § 38 TabakerzG, § 28b GenTG'. At the bottom left, a breadcrumb trail reads: 'Arbeitsbereiche > Untersuchungen > Aufgaben im Bereich Untersuchungen > Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren'.

§ 64 LFGB: Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch  
§ 38 TabakerzG: Tabakerzeugnisgesetz  
§ 28b GenTG: Gentechnikgesetz

# Amtliche Sammlung von Untersuchungsver

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit  
Amtlichen Sammlung von Verfahren zur Probenahme und
- Geschäftsstelle ASU beim BVL eingerichtet
- Erarbeitung, Festlegung und Standardisierung von neuer  
erfolgt in Arbeitsgruppen (Sachkenner aus Überwachung

Nr.	aktive Arbeitsgruppen gemäß § 64 LFGB (Stand 08/2025)	fortlaufende Zählung
01	Chemisch-physikalische Untersuchungsverfahren für Milch und Milchprodukte	1
02	Molekularbiologische Methoden zur Pflanzen- und Tierartendifferenzierung	2
03	Fleischerzeugnisse	3
07	Molekularbiologische Methoden – Mikrobiologie	4
08	Nitrat/Nitrit	5
10	Pestizide	6
15	Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln	7
16	Viren in Lebensmitteln	8
20	Backwaren	9
22	Ballaststoffe	10
23	Elementanalytik	11
23_2	Elementanalytik – UAG „Elemente in Bedarfsgegenständen“	12
24	Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel (kurz: GVO-Nachweis)	13
25	Kosmetische Mittel	14
25_1	Kosmetische Mittel – UAG „MOSH/MOAH-Analytik“	15
26	Lebensmittelallergene	16
27	Mykotoxinanalytik	17
30	Vitaminanalytik	18
33	Bedarfsgegenstände	19
34	Lebensmittelhistologie	20
37	Analysemethoden für die Futtermitteluntersuchung	21
38	Pflanzentoxine	22
39	Massenspektrometrische Proteinanalytik	23
40	NGS-Speziesidentifizierung (Next Generation Sequencing)	24
41	MALDI-TOF (Matrixunterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie)	25
42	MCPD- und Glycidylester	26
43	IRMS (Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie)	27
44	NMR (Kernspinresonanzspektroskopie)	28
45	NGS-Bakteriencharakterisierung (Next Generation Sequencing)	29
46	Frucht- und Gemüsesäfte	30
47	Mineralwasser – Mikrobiologie	31
48	Fischerzeugnisse	32
49	Bieranalytik	33

# §64 LFGB : Viren in Lebensmitteln

- Seit 2019 unter der Leitung von Reimar Prof. Johne, Referent Jakob Frenzel
- In den letzten 10 Jahren wichtige Methoden validiert

§ 64-Methode für Viren **L08.00-63: 2016-10**

Untersuchung von Lebensmitteln- Qualitativer Nachweis von **Hepatitis E-Viren in Wurstwaren** mittels Real-time-RT-PCR



§ 64-Methode für Viren **L06.32-2:2020-02**

Untersuchung von Lebensmitteln- Qualitativer Nachweis von **Noroviren in Hackfleisch** mittels real-time RT-PCR



§ 64-Methode für Viren **L06.17.01-1 2020-11**

Untersuchung von Lebensmitteln- Qualitativer Nachweis von **Hepatitis-E-Viren in Leber** mittels real-time RT-PCR



§ 64-Methode für Viren **L 00.00-200 : 2025-08**

Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von **Adenoviren auf Lebensmittel-Oberflächen** mittels real-time PCR



# Adenoviren

- Adenoviren vergleichsweise wenig als enterale Infektionserreger bekannt
- Übertragung ähnlich zu Noroviren, fäkal-oral
- Hauptsächlich bei Säuglingen & Kleinkindern
- Bedeutung im Zusammenhang mit lebensmittelbedingten Infektionen noch unklar
- entsprechende Verfahren zum Nachweis des Erregers fehlten bisher



# Adenoviren

- Humane Adenoviren (HAdV, *Adenoviridae*) unbehüllt
  - doppelsträngiges DNA-Genom (ca. 34 000–38 000 bp)
  - sieben definierte Spezies (A–G), mindestens 51 Serotypen
  - Breite Palette an Erkrankungen (respiratorisch, gastrointestinal, okulär)
  - Enterische HAdV Typ 40 & 41 (Spezies F) Auslöser akuter Gastroenteritiden (Säuglinge, Kleinkinder)
- 
- auch über oberflächlich kontaminierte Lebensmittel möglich?
  - Genauer Ausmaß und Bedeutung von Lebensmittel-bedingten Infektionen mit enterischen HAdV bisher nicht bekannt



# Adenoviren

- HAdV Typ 41 bestellt & in Zellkultur vermehrt
- Genblock bestellt ( $2,49 \times 10^{10}$  Moleküle in 1  $\mu$ l)
  
- **Etablierung der Methode:**
  - I. Aufnahme der Viren von der Lebensmittel-Oberfläche mittels Tupfer & DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel)
  - II. Nachweis der viralen DNA mittels real-time PCR



# Adenoviren

- HAdV Typ 41 bestellt & in Zellkultur vermehrt
- Genblock bestellt ( $2,49 \times 10^{10}$  Moleküle in 1  $\mu$ l)
- **Etablierung der Methode:**
  - I. Aufnahme der Viren von der Lebensmittel-Oberfläche mittels Tupfer & DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel)
  - II. Nachweis der viralen DNA mittels real-time PCR

Comparative Study > J Med Virol. 2003 Jun;70(2):228-39. doi: 10.1002/jmv.10382.

## Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR

Albert Heim<sup>1</sup>, Carmen Ebnet, Gabi Harste, Patricia Pring-Akerblom

Affiliations + expand

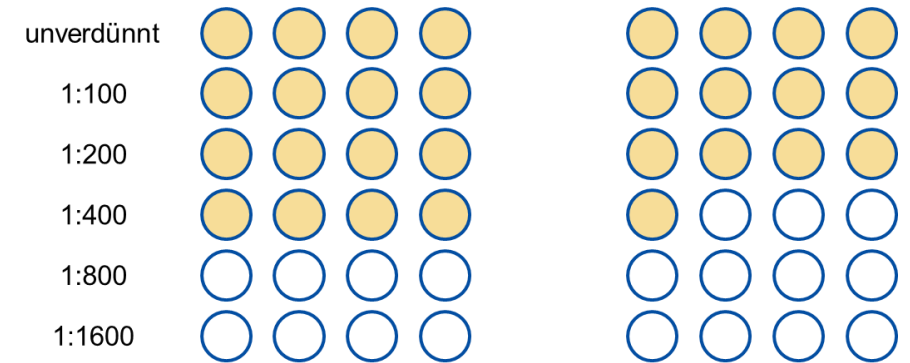
PMID: 12696109 DOI: 10.1002/jmv.10382

AQ1 5'GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT'3  
AQ2 5'GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C'3  
AP FAM-TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA-TMR

# Adenoviren

- HAdV Typ 41 bestellt & in Zellkultur vermehrt
- Genblock bestellt ( $2,49 \times 10^{10}$  Moleküle in 1  $\mu$ l)
- **Etablierung der Methode:**
  - I. Aufnahme der Viren von der Lebensmittel-Oberfläche mittels Tupfer & DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel)
  - II. Nachweis der viralen DNA mittels real-time PCR
  - III. Ermittlung der LOD (*limit of detection*)
- Kontamination von 8 Proben pro Verdünnungsstufe
- 6 Verdünnungsstufen (10  $\mu$ l Virus/Probe)

Adenovirus-Zellkulturüberstand mit bekannter Konzentration (Bestimmung über G-Block)



 Livsmedelsverket  
Swedish Food Agency

 European Union Reference Laboratory  
for Foodborne Viruses

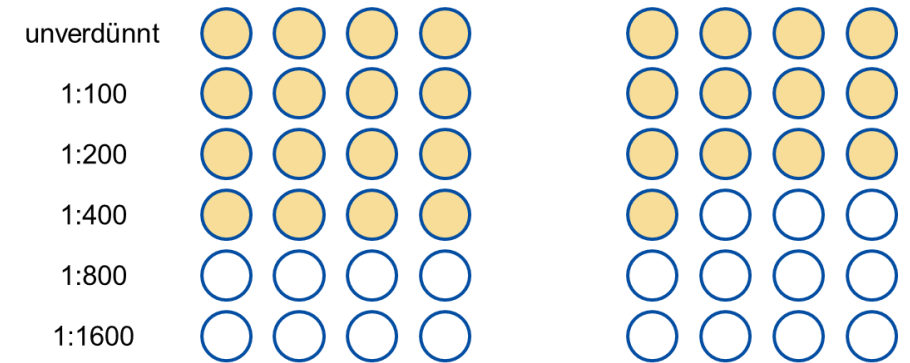
EURL Guidance document for verification  
of ISO 15216-2:2019

PODLOD Programm Version 12 für Excel (FU-Berlin)

# Adenoviren

- HAdV Typ 41 bestellt & in Zellkultur vermehrt
- Genblock bestellt ( $2,49 \times 10^{10}$  Moleküle in 1  $\mu$ l)
- **Etablierung der Methode:**
  - I. Aufnahme der Viren von der Lebensmittel-Oberfläche mittels Tupfer & DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel)
  - II. Nachweis der viralen DNA mittels real-time PCR
  - III. Ermittlung der LOD (*limit of detection*)
    - Kontamination von 8 Proben pro Verdünnungsstufe
    - 6 Verdünnungsstufen (10  $\mu$ l Virus/Probe)

Adenovirus-Zellkulturüberstand mit bekannter Konzentration (Bestimmung über G-Block)



$LOD_{50} \approx 2,3 \times 10^3$  Kopien total oder  $\approx 65$  Kopien/cm<sup>2</sup> total

$LOD_{95} \approx 9,8 \times 10^3$  Kopien total oder  $\approx 281$  Kopien/cm<sup>2</sup> total

# Adenoviren, Validierungsstudie

- künstlich kontaminierte Lebensmittelproben (Paprika-Stück, ca. 5 × 7 cm)
- Probenmaterial an 11 Labore verschickt
- Pro Labor jeweils 12 Proben (4 × negativ, 4 × positiv, 4 × schwach positiv)
- DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel) & Nachweis mittels real-time PCR

Jedes Labor erhielt

- **12 Proben (Adenovirus & Lambda-Phage)**
- **Suspensionen für positive PCR-Kontrollen (Adenovirus & Lambda-Phage)**
- **Tupfer**
- **DNA-Extraktions Kit & PCR-Kit**
- **Primer-Sonden-System (Adenovirus & Lambda Phage)**
- **Protokoll**

Konzentrationsdosis:

L<sub>0</sub>: nicht kontaminiert (4 x)  
L<sub>1</sub>:  $2,13 \times 10^5/\mu\text{l}$  (4 x)  
L<sub>2</sub>:  $2,13 \times 10^3/\mu\text{l}$  (4 x)



# Adenoviren, Validierungsstudie

- künstlich kontaminierte Lebensmittelproben (Paprika-Stück, ca. 5 × 7 cm)
- Probenmaterial an 11 Labore verschickt
- Pro Labor jeweils 12 Proben (4 × negativ, 4 × positiv, 4 × schwach positiv)
- DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel) & Nachweis mittels real-time PCR

Pro Probenset zu analysieren

- **12 Proben (Adenovirus & Lambda-Phage)**
- **Positive PCR-Kontrolle (Adenovirus & Lambda-Phage zur Extraktion)**
- **Negative PCR-Kontrolle (Adenovirus & Lambda-Phage)**
- **Verdünnungsreihe mit mindestens vier Verdünnungsstufen aus der Lambda-Phagen DNA für die Erstellung der Standardkurve (Bestimmung der Extraktionseffizienz)**

Konzentrationsdosis:

L<sub>0</sub>: nicht kontaminiert (4 x)  
L<sub>1</sub>: 2,13 x 10<sup>5</sup>/μl (4 x)  
L<sub>2</sub>: 2,13 x 10<sup>3</sup>/μl (4 x)



# Adenoviren, Validierungsstudie

- künstlich kontaminierte Lebensmittelproben (Paprika-Stück, ca. 5 × 7 cm)
  - Probenmaterial an 11 Labore verschickt
  - Pro Labor jeweils 12 Proben (4 × negativ, 4 × positiv, 4 × schwach positiv)
  - DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food Mini Kit für DNA aus Lebensmitteln (Macherey-Nagel) & Nachweis mittels real-time PCR
- 
- 7 von 11 Labore testeten zusätzlich das NucleoMag-Kit für die DNA-Extraktion
  - Analyse eines weiteren vollständigen Probensatzes



Konzentrationsdosis:

L<sub>0</sub>: nicht kontaminiert (4 x)  
L<sub>1</sub>: 2,13 x 10<sup>5</sup>/μl (4 x)  
L<sub>2</sub>: 2,13 x 10<sup>3</sup>/μl (4 x)

# Validierungsstudie: Ergebnisse

Probe	SOLL	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8	Labor 9	Labor 10	Labor 11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++++	31,24	27,574	31,64	29,7661	29,62	32,94	27,13	33,04	30,99	30,3	35,66
4	++	41,61	35,9882	-	40,3068	38,86	44,47	38,16	39,98	40,6	39,42	-
5	++++	30,92	27,5849	29,95	30,3827	28,92	31,88	27,05	29,4	31,16	30,14	33,07
6	++	38,77	37,2029	39	38,9295	37,78	43,48	36,28	39,17	40,96	39,31	-
7	++++	30,69	27,0236	30,52	31,7721	29,76	31,93	26,97	31,18	31,11	31,71	35
8	++++	30,83	27,2474	28,81	30,1981	29,66	34,04	26,54	31,3	30,63	30,55	33,74
9	-	-	-	-	-	-	-	-	41,52	-	-	42,36
10	++	40	35,3535	38,65	39,1282	39,74	40,44	36,05	43,09	38,5	40,01	44,9
11	++	38,26	35,2125	38,45	38,246	39,9	42,77	36,51	40,07	41,29	39,93	41,02
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK Adeno		28,7	25,0851	25,52	26,262	26,62	30,03	25,29	28,19	28,76	29,08	29,75
NK Adeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

# Validierungsstudie: Ergebnisse

Probe	SOLL	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8	Labor 9	Labor 10	Labor 11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++++	31,24	27,574	31,64	29,7661	29,62	32,94	27,13	33,04	30,99	30,3	35,66
4	++	41,61	35,9882	-	40,3068	38,86	44,47	38,16	39,98	40,6	39,42	-
5	++++	30,92	27,5849	29,95	30,3827	28,92	31,88	27,05	29,4	31,16	30,14	33,07
6	++	38,77	37,2029	39	38,9295	37,78	43,48	36,28	39,17	40,96	39,31	-
7	++++	30,69	27,0236	30,52	31,7721	29,76	31,93	26,97	31,18	31,11	31,71	35
8	++++	30,83	27,2474	28,81	30,1981	29,66	34,04	26,54	31,3	30,63	30,55	33,74
9	-	-	-	-	-	-	-	-	41,52	-	-	42,36
10	++	40	35,3535	38,65	39,1282	39,74	40,44	36,05	43,09	38,5	40,01	44,9
11	++	38,26	35,2125	38,45	38,246	39,9	42,77	36,51	40,07	41,29	39,93	41,02
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK Adeno		28,7	25,0851	25,52	26,262	26,62	30,03	25,29	28,19	28,76	29,08	29,75
NK Adeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

# Validierungsstudie: Ergebnisse

Probe	SOLL	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8	Labor 9	Labor 10	Labor 11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++++	31,24	27,574	31,64	29,7661	29,62	32,94	27,13	33,04	30,99	30,3	35,66
4	++	41,61	35,9882	-	40,3068	38,86	44,47	38,16	39,98	40,6	39,42	-
5	++++	30,92	27,5849	29,95	30,3827	28,92	31,88	27,05	29,4	31,16	30,14	33,07
6	++	38,77	37,2029	39	38,9295	37,78	43,48	36,28	39,17	40,96	39,31	-
7	++++	30,69	27,0236	30,52	31,7721	29,76	31,93	26,97	31,18	31,11	31,71	35
8	++++	30,83	27,2474	28,81	30,1981	29,66	34,04	26,54	31,3	30,63	30,55	33,74
9	-	-	-	-	-	-	-	-	41,52	-	-	42,36
10	++	40	35,3535	38,65	39,1282	39,74	40,44	36,05	43,09	38,5	40,01	44,9
11	++	38,26	35,2125	38,45	38,246	39,9	42,77	36,51	40,07	41,29	39,93	41,02
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK Adeno		28,7	25,0851	25,52	26,262	26,62	30,03	25,29	28,19	28,76	29,08	29,75
NK Adeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

# Validierungsstudie: Ergebnisse

Probe	SOLL	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8	Labor 9	Labor 10	Labor 11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++++	31,24	27,574	31,64	29,7661	29,62	32,94	27,13	33,04	30,99	30,3	35,66
4	++	41,61	35,9882	-	40,3068	38,86	44,47	38,16	39,98	40,6	39,42	-
5	++++	30,92	27,5849	29,95	30,3827	28,92	31,88	27,05	29,4	31,16	30,14	33,07
6	++	38,77	37,2029	39	38,9295	37,78	43,48	36,28	39,17	40,96	39,31	-
7	++++	30,69	27,0236	30,52	31,7721	29,76	31,93	26,97	31,18	31,11	31,71	35
8	++++	30,83	27,2474	28,81	30,1981	29,66	34,04	26,54	31,3	30,63	30,55	33,74
9	-	-	-	-	-	-	-	-	41,52	-	-	42,36
10	++	40	35,3535	38,65	39,1282	39,74	40,44	36,05	43,09	38,5	40,01	44,9
11	++	38,26	35,2125	38,45	38,246	39,9	42,77	36,51	40,07	41,29	39,93	41,02
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK Adeno		28,7	25,0851	25,52	26,262	26,62	30,03	25,29	28,19	28,76	29,08	29,75
NK Adeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

# Validierungsstudie: Ergebnisse

- Alle 11 Labore Ergebnisse zugesandt
- **132 Ct-Wert-Angaben für Adenovirus & 132 für Lambda-Phage** (NucleoSpin Kit)
- Errechnete Wiederfindungsraten für jede einzelne Probe
- Alle Adenovirus-Werte valide, da Extraktionseffizienz ausreichend (5-90 % WFR)
- 2 x falsch-positive Werte
- 3 x falsch-negative Werte
- Alle 132 Proben in die Statistik einbezogen
- (zusätzlich 84 Ct-Werte für Adenovirus & 84 für Lambda-Phage; NucleoMag Kit)
- Normentwurf verfasst & geprüft
- Norm veröffentlicht



# Validierungsstudie: Ergebnisse

§ 64-Methode für Viren L 00.00-200 : 2025-08

Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von **Adenoviren auf Lebensmittel-Oberflächen** mittels real-time PCR

Relative Spezifität	95,45 %
Relative Sensitivität	96,59 %
Relative Richtigkeit	96,21 %
Falsch-positiv-Rate	1,5 %
Falsch-negativ-Rate	2,3 %



# Vergleich der zwei Extraktionsmethoden

- direkter Vergleich schwierig, da beim NucleoSpin 132 Proben & bei NucleoMag 84 analysiert
- Ergebnisse sehr vergleichbar (Ct-Werte, WFR)
- NucleoMag trotz aufwendigerer Aufarbeitung weniger für Fehler anfällig (?)

Labor	NucleoSpin	NucleoMag
6	alles richtig	1x falsch negativ
8	1 x falsch positiv	alles richtig
11	2 x falsch negativ 1 x falsch positiv	alles richtig

Labore 5, 7, 9, 10 je die gleichen Ergebnisse  
(alles richtig)

# Danke...

...den fähigen Händen von

Fr. Anja Schlosser

Fr. Stefanie Prosetzky



FGr 46, Viren

Prof. Reimar Johne

Dr. Nadine Althof

Silke Apelt

Alle Mitglieder der §64 Arbeitsgruppe

Insbesondere die Teilnehmer

Referent: Hr. Jakob Frenzel

## ...für IHRE Aufmerksamkeit 😊!

Dr. Eva Trojnar  
T +49 30 18412-74601  
Eva.Trojnar@bfr.bund.de

Bundesinstitut für Risikobewertung  
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://bfr.bund.de/veroeffentlichungen/bfr2go/)

Folgen Sie uns

 @bfrde | @bfren | @Bf3R\_centre

 @bfrde

 [youtube.com/@bfr\\_bund](https://youtube.com/@bfr_bund)

 [social.bund.de/@bfr](https://social.bund.de/@bfr)

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

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

 [threads.net/@bfrde](https://threads.net/@bfrde)

 [bsky.app/profile/bfrde.bsky.social](https://bsky.app/profile/bfrde.bsky.social)