

## Tenazität und Inaktivierung von humanem Norovirus auf unterschiedlichen Werkstoffen von Bedarfsgegenständen in der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung

– Anschluss zu AiF 15215 N –

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle:</b>	Hochschule Ostwestfalen Lippe Institut für Lebensmitteltechnologie ILT-NRW Labor Mikrobiologie Prof. Dr. Barbara Becker/Dr. Sascha Mormann
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e. V. (BVDF), Bonn Lemgoer Arbeitskreis Fleisch und Feinkost e.V. (LAFF), Lemgo
	Projektkoordinator: Katrin Steinhauer Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 193.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Die Norovirus-Infektion ist die häufigste Ursache für Gastroenteritiden beim Menschen. Das humane Norovirus (hNV) ist hochkontagiös und wird von Mensch-zu-Mensch, fäkal-oral, aerogen und durch Lebensmittel übertragen. Die überwiegende Anzahl der Ausbrüche wird durch Sekundärkontaminationen bedingt, die durch Hygienemängel häufig im Rahmen der Lebensmittelproduktion, -verarbeitung oder -zubereitung erfolgen. Durch infiziertes Personal, kontaminierte Rohstoffe oder Oberflächen, wie z. B. Verpackungen, Arbeitsflächen, Maschinen, Transportbänder, Transportkisten oder Latexhandschuhe, können Viren in das Lebensmittel gelangen. Vor diesem Hintergrund sind Informationen zur Überdauerungsfähigkeit (Tenazität) sowie zur wirkungsvollen Inaktivierung von hNV durch Desinfektionswirkstoffe auf Oberflächen in der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung von besonderer Bedeutung.

Untersuchungen zur Tenazität von hNV auf Oberflächen und zur Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen gegenüber hNV sind

bisher nur begrenzt verfügbar. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass für hNV keine Zellkultur zur Verfügung steht, in der sich hNV *in vitro* vermehren bzw. quantifizieren lässt. Das erschwert Aussagen darüber zu treffen, welchen Einfluss Umweltbedingungen bzw. Desinfektionsmittel auf hNV haben. Besonders Aussagen zur Infektiosität sind nicht möglich. Zur Quantifizierung von hNV wurde im Rahmen des IGF-Projekts AiF 15215 N („Einfluss technologischer Prozesse auf die Inaktivierung und Tenazität von Norovirus in Lebensmitteln“) ein quantitatives real-time Reverse-Transcriptase(RT)-PCR-Verfahren entwickelt (MORMANN et al., 2010). Dieses beinhaltet eine RNase-Behandlung, mit deren Hilfe freie RNA zerstört wird und den Nachweis intakter Viruspartikel ermöglicht. Studien der Forschungsstelle zeigten, dass RNA aus hNV sehr stabil ist und Erhitzungen von 95 °C für 180 min überdauert (MORMANN und BECKER, 2011).

Im Rahmen von hNV-Inaktivierungsstudien werden in der Regel zellkulturgängige Surrogatviren verwendet, die eine Quantifizierung sowohl mittels Zellkultur als auch mittels real-time RT-qPCR ermöglichen. Inwiefern

sich Ergebnisse zur Inaktivierung der Surrogatviren *Feline Calicivirus* (FCV) und murines Norovirus (MNV) auf humanes Norovirus übertragen lassen, wird kontrovers diskutiert. Über die genauen Wirkmechanismen von Desinfektionsmitteln auf Viren und deren Einfluss auf die Infektiosität ist bislang wenig bekannt. MNV und FCV werden zwar generell als Surrogate für hNV akzeptiert, sie zeigen jedoch gegenüber physikochemischen Einflüssen unterschiedliche Stabilitäten. Offen ist die Frage, ob sich die Ergebnisse von Surrogatviren auf humanes Norovirus übertragen lassen.

#### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden Arbeitsprotokolle entwickelt, die die Durchführung von Stabilitäts- (Tenazität) bzw. Inaktivierungstests (Wirkstoffprüfung) auf Werkstoffen ermöglichen. Die Anzahl infektiöser Viren (FCV, MNV) wurde mittels Plaque-Assay in Zellkultur, die Anzahl intakter Virus-Partikel (FCV, MNV, hNV) durch real-time RT-qPCR (PCR) bestimmt. Im Rahmen dieser Studie wurden real-time RT-qPCR-Systeme für die kulturgängigen Surrogatviren FCV und MNV etabliert, um die PCR-Daten mit Zellkultur-Daten zu vergleichen. Die Ergebnisse werden unter dem Gesichtspunkt ausgewertet, inwiefern die real-time RT-qPCR-Ergebnisse intakter Viruspartikel Rückschlüsse auf infektiöse Viren erlauben. Daraus lassen sich Anhaltspunkte ableiten, ob die hNV-real-time RT-qPCR-Ergebnisse im Rahmen von Inaktivierungsstudien verifizierbar sind.

Tenazitätsanalysen zeigen, dass die Materialbeschaffenheit der Werkstoffträger (Edelstahl, Kunststoff) keinen Einfluss auf die Überdauerungsfähigkeit von FCV, MNV und hNV hat. Ein Lagerzeitraum von 7 Tagen bei Raumtemperatur (RT) bedingt, dass infektiöse FCV und MNV nicht mehr nachgewiesen werden können. Dahingegen ist zu beobachten, dass die Zahl intakter Kapside von FCV, MNV sowie hNV kaum reduziert werden. Bei 7 °C sind die Testviren deutlich stabiler als bei RT. Obwohl nach 70 Tagen nur MNV unveränderte Infektiosität besaß, entsprach die Anzahl intakter Kapside (FCV, MNV, hNV) nahezu dem Ausgangstiter. Die Ergebnisse zeigen, dass die zur Hemmung bakteriellen Wachstums eingesetzte Kühlung

(7 °C) die Inaktivierung der infektiösen Testviren verzögert.

In Wirkstoffprüfungen kamen die Desinfektionswirkstoffe Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, Glutaraldehyd, Natriumhypochlorit, Peressigsäure sowie die Produkte NADES bzw. NADES 2.0 (Elektro-Chemisch-Aktiviertes Wasser) in praxisrelevanter Konzentration zur Anwendung. Die Desinfektionsmittel wurden nach definierter Einwirkzeit durch Verdünnung inaktiviert. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Zytotoxizitäts-, Nachwirkungs- und Inhibitionskontrollen sichergestellt, dass die Desinfektionswirkstoffe weder die Zellkulturen noch die PCR beeinflussen.

Mit Hilfe von Suspensionstests wurden Wirkstoff-Konzentrationen und Einwirkzeiten ermittelt und daraus Parameter für weiterführende Wirkstofftests auf Oberflächen abgeleitet. Zur Einordnung der Desinfektionswirkung wurde in Anlehnung an die „Richtlinien für die Prüfung Chemischer Desinfektionsmittel“ (DVG) eine Titer-Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  als viruzid definiert. Deutliche Titer-Reduktion  $\geq 4 \log_{10}$  wurde unter Verwendung beider Nachweismethoden bei den drei Test-Viren durch Peressigsäure (2 %) ermittelt. Natriumhypochlorit (0,1 %) inaktiviert ebenfalls FCV, MNV und hNV, ohne die Anzahl intakter Virionen im gleichen Maß zu verringern. Gegenüber hNV führten zudem Ethanol (70 %), 1-Propanol (70 %) sowie NADES (10 %) bei 5-minütiger Einwirkzeit zu einer Titerreduktion von 1,5 - 3  $\log_{10}$ , jedoch nicht zu einer vollständigen Inaktivierung. Keine Wirkung auf hNV war bei 2-Propanol (70 %) und Glutaraldehyd (2,5 %) zu beobachten.

Insgesamt erscheint gegenüber den eingesetzten Desinfektionswirkstoffen FCV stabiler als MNV – sowohl bei Betrachtung der Infektiosität als auch intakter Kapside. Während MNV in Tenazitätsuntersuchungen als Surrogatvirus genutzt werden kann, scheint in Wirkstoffprüfungen der Einsatz von FCV eher angezeigt. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Aussagen zur Infektiosität von hNV grundsätzlich nicht durch Einsatz eines Surrogatvirus möglich sind.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse sind für alle produzierenden Unternehmen der Lebensmittelindustrie sowie für Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen

(Kantinen, Mensen, Alten- und Pflegeheime, Krankenhäuser, Kreuzfahrtschiffe etc.) relevant. Sie können in Betrieben im Rahmen der Qualitätssicherung genutzt werden und bei der Erstellung von Hygieneplänen Berücksichtigung finden. Des Weiteren können Dosierungen und Einwirkzeiten auf hNV-Inaktivierung angepasst werden. Dadurch wird eine Verbesserung der Hygienemaßnahmen und des Verbraucherschutzes gewährleistet. Ebenso sind diese Daten für die Aufstellung von Konzepten im Rahmen von Good Hygiene Practice (GHP) und Good Manufacturing Practice (GMP) verwertbar.

Häufig stellt sich die Frage, wie nach Norovirusausbrüchen Räume und Gegenstände zuverlässig desinfiziert werden können. Desinfektionsmittelhersteller können ihre Produkte auf Basis der Daten aus dem Projekt modifizieren. Dabei sind Neuentwicklungen von wirkungsvollen Desinfektionsmitteln mit Wirkung gegen humanes Norovirus auf Basis der Ergebnisse möglich.

Dienstleistungslaboratorien können ihr Portfolio unter Verwendung der im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelten Arbeitsprotokolle zur praxisnahen Durchführung von Stabilitäts- (Tenazität) bzw. Inaktivierungstests (Wirkstoffprüfungen) erweitern. Die Ergebnisse beinhalten das Potential, um hieraus Untersuchungsmethoden für weitere unbehüllte lebensmittelassoziierte Viren abzuleiten.

3. Becker, B. und Mormann, S.: Humanes Norovirus – Nachweis und Stabilität. FOOD-Lab 5-6, 30-33 (2012).
4. Mormann, S. und Becker, B.: Stability of released Norovirus RNA against degradation in selected food samples and against defined heat treatment. Tagungsband 12. Fachsymp. VAAM-Fachgr. Lebensmittelmikrobiol., 4.-6.5.2011, Damp, Poster P3, Abstract, 75-76 (2011).
5. Mormann, S., Dabisch, M. und Becker, B.: Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. Appl. Environ. Microbiol. 76, 536 -545 (2010).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Hochschule Ostwestfalen Lippe  
Institut für Lebensmitteltechnologie ILT-NRW  
Labor Mikrobiologie  
Liebigstr. 87, 32657 Lemgo  
Tel.: +49 5261 702-5289  
Fax: +49 5261 702-404  
E-Mail: [barbara.becker@hs-owl.de](mailto:barbara.becker@hs-owl.de)

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: [fei@fei-bonn.de](mailto:fei@fei-bonn.de)

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Mormann, S., Heißenberg, C., Pfannebecker, J. und Becker, B.: Tenacity of Human Norovirus and the Surrogates Feline Calicivirus and Murine Norovirus during Long-Term Storage on Common Nonporous Food Contact Surfaces. J. Food Protect. 78, 224-229 (2015).

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

