

# Caliciviren

## Virale Auslöser akuter Gastroenteritiden

### Zusammenfassung

Die weltweit in großer genetischer Vielfalt kozirkulierenden, hochinfektösen und Umwelteinflüssen gegenüber recht widerstandsfähigen humanen Caliciviren verursachen neben vereinzelt Infektionen sehr oft regelrechte Gastroenteritisausbrüche. Sie verbreiten sich durch Kontamination von Nahrungsmitteln oder Wasser sowie durch direkte Personenkontakte sowohl durch Schmierinfektion als auch über Aerosole und sind daher eine große Herausforderung an die Hygiene und das Gesundheitswesen. Trotz des Fehlens von Zellanzucht- und Tiermodellensystemen für diese humanpathogenen Viren wurden durch den Einsatz molekularer Diagnose- und Charakterisierungsmethoden große Fortschritte in Bezug auf das Verständnis humaner Caliciviren, vor allem der „Norwalk-like-Viren“, gemacht. Immer mehr Genomsequenzen dieser Viren werden in internationalen Datenbanken publiziert. Sie bilden die Grundlage für die Verbesserung der molekularen Methoden zur Analyse der viralen Pathogenese und Epidemiologie und zur Entwicklung effektiver Präventions- und Kontrollstrategien.

### Schlüsselwörter

Humane Caliciviren · Norwalk-like-Viren (NLVs) · Sapporo-like-Viren (SLVs) · Virale Gastroenteritis · Lebensmittelbedingte Erkrankungen

**G**astroenteritiden (Magen- und Darminfektionen) sind global verbreitet und in der Dritten Welt eine der häufigsten Ursachen der Kindersterblichkeit. Es wird geschätzt, dass jedes Jahr 1,5 Billionen Diarrhöefälle auftreten, in deren Folge 2,5–3,2 Millionen Kinder unter fünf Jahren sterben [1, 2]. In den Industriestaaten sind die Gastroenteritiden nach den Atemwegserkrankungen die zweithäufigste Erkrankung im Kindesalter, wobei es hier aber selten zu Komplikationen kommt. Sehr viele Agenzien wie Bakterien, Viren, Parasiten und Toxine können Durchfallerkrankungen und Erbrechen oder sogar lebensbedrohliche Syndrome auslösen. Nach Einschätzung der WHO wird ein großer Anteil der Durchfallerkrankungen durch kontaminierte Lebensmittel verursacht. Allein in den USA wird die Zahl der jährlichen Erkrankungen, die durch Lebensmittelinfektionen („foodborne diseases“) bedingt sind, auf 76 Millionen geschätzt, was immerhin 36% der pro Jahr in diesem Land auftretenden Gastroenteritiden entspricht [3]. Man kann davon ausgehen, dass in Regionen, in denen die Hygiene und das Niveau sanitärer Einrichtungen sehr viel schlechter sind, lebensmittelbedingte Erkrankungen zwangsläufig noch sehr viel häufiger auftreten, zumal über viele Fälle sporadischer Erkrankungen zumeist gar nicht berichtet wird. Auch Gastroenteritisausbrüche repräsentieren oft nur die „Spitze eines Eisbergs“. Aber wegen der großen Zahl an Betroffenen und der damit verbundenen sozialökonomischen Auswirkungen erregen gerade sie besondere Aufmerksamkeit und Besorgnis.

Eine von 1998 bis 1999 in Uppsala, Schweden, durchgeführte Studie [4] ergab, dass 68% der lebensmittelbedingten Erkrankungen Einzelfälle waren und nur 32% Ausbrüchen zugerechnet werden konnten. Die Häufigkeit der Erkrankungen wurde auf 38 Fälle je 1000 Bewohner und Jahr geschätzt. Die jährlich in Schweden durch lebensmittelassoziierte Krankheiten verursachten Kosten wurden mit 123 Millionen \$ beziffert. In einer umfangreichen US-Studie aus dem Jahr 1999 [3] wurden epidemiologische Daten aller durch Lebensmittel übertragenen Krankheitserreger, die eine akute Gastroenteritis verursachen können, ausgewertet. Dabei stellte sich u. a. heraus, dass nur bei 38 Millionen (rd. 18%) der geschätzten 211 Millionen Gastroenteritisfälle pro Jahr ein Virus, Bakterium oder Parasit als Erreger identifiziert werden konnte. In Tabelle 1 sind die durch diese Erreger verursachten Gastroenteritiden, bezogen auf die Anteile, die auf eine Lebensmittelübertragung entfallen, dargestellt. Von den 38 Millionen durch diagnostizierte Erreger verursachten Gastroenteritiserkrankungen wurden etwa 5,2 Millionen (13%) durch Bakterien, 2,5 Millionen (7%) durch Parasiten und 30,9 Millionen (80%) durch Viren verursacht, wobei mit 60% der größte Anteil allein den Norwalk-like-

© Springer-Verlag 2002

Priv.-Doz. Dr. Eckart Schreier  
Robert Koch-Institut,  
Nordufer 20, 13353 Berlin

U. Künkel · E. Schreier

## Caliciviruses. A viral cause of acute gastroenteritis

### Abstract

Human caliciviruses are highly infectious and co-circulate worldwide. They are responsible for many individual cases and extensive outbreaks of acute gastroenteritis. The ability of the viruses to survive in the environment facilitates the fecal-oral spread through water, food, aerosols, and person-to-person contact. Therefore, they are an important global public health problem. Despite the lack of a cell culture or animal model system to grow caliciviruses, great advances in our understanding of these pathogens, especially of the NLVs, have been made by using molecular methods. More and more information about the viral genome is being accumulated in data bases. This information will be used to develop sensitive molecular methods for the better understanding of the viral biology and epidemiology and will assist in developing strategies to prevent and control infections.

### Keywords

Human caliciviruses · Norwalk-like viruses (NLVs) · Sapporo-like viruses (SLVs) · Viral gastroenteritis · Foodborne disease

Viren, einer Gruppe der humanen Caliciviren, zuzurechnen ist. Inzwischen schätzt man sogar, dass bis zu 95% aller nichtbakteriellen Gastroenteritisausbrüche durch Norwalk-like-Viren verursacht sein könnten [5].

### Die Familie der *Caliciviridae*

Caliciviren sind humane und animale Pathogene (Tabelle 2), wobei die Norwalk-like-Viren (NLVs) derzeit als häufigste Erregergruppe virusbedingter Gastroenteritiden des Menschen gelten. Die humanen Caliciviren, die der Familie der *Caliciviridae* zugeordnet werden, wurden aufgrund ihrer Morphologie anfänglich in „kleine, runde, strukturierte Viren“ („small round structured viruses“, SRSVs) und klassische humane Caliciviren unterteilt. Gemäß einer Festsetzung des „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) werden jetzt die beiden Genera „Norwalk-like-Viruses“ (NLVs) und „Sapporo-like-Viruses“ (SLVs) [6] unterschieden. Diese Viren verursachen sowohl vereinzelte Infektionen als auch Gastroenteritisausbrüche, die alle Altersgruppen betreffen können. Zur Familie der *Caliciviridae* gehören auch zwei tierpathogene Genera.

Der Prototyp der hochinfektiösen NLVs, das Norwalk-Virus, wurde 1972 immunoelektronenmikroskopisch entdeckt [7], vier Jahre nach einem Gastroenteritisausbruch in Norwalk, Ohio, USA. Das Sapporovirus, welches das klassische humane Calicivirus repräsentiert, wurde 1977 als Ursache eines Gastroenteritisausbruches in Sapporo, Japan, identifiziert [8]. In den Folgejahren wurde zunehmend deutlich, dass neben Rota-, Astro- und enteropathogenen Adenoviren auch Caliciviren häufig Auslöser nichtbakteriell oder nichtparasitologisch verursachter akuter menschlicher Gastroenteritiden sind (s. Tabelle 1). Die relativ späte Erkennung der medizinischen Bedeutung (Häufigkeit und Pathogenität) der humanen Caliciviren hängt zum Teil auch damit zusammen, dass es schwierig ist, mit diesen Viren zu arbeiten. Ihre Anzucht in der Zellkultur ist bisher noch nicht gelungen. Es stehen daher nur sehr geringe Virusmengen für Untersuchungszwecke zur Verfügung. Erst seit etwa 1990 wurde es mit der Anwendung molekular-diagnostischer Methoden, die die Analyse des Virusgenoms erlauben, offensichtlich,

dass verschiedene Genera, Genogruppen und Genotypen humaner Caliciviren weltweit ko-zirkulieren und es sehr viel mehr humane Calicivirusinfektionen gibt, als bislang angenommen.

### Struktur der Caliciviren

Ihren Namen erhielten die Caliciviren aufgrund einer tassenförmigen Einbuchtung, die bei den klassischen humanen Viruspartikeln (SLVs) mitunter im Elektronenmikroskop (EM) sichtbar ist. Er leitet sich vom lateinischen Wort „calix“ (dt. Tasse, Becher, Kelch) ab. Einige SLV-Partikel zeigen auch eine dem Davidstern sehr ähnliche Oberflächenstruktur (Abb. 1b). Die NLVs besitzen diese charakteristischen Oberflächengestaltungen nicht (s. Abb. 1a). Die Viruspartikel haben kein Hüllprotein, und ihr Durchmesser schwankt zwischen 27 und 40 nm. Caliciviren sind einzelsträngige RNA-Viren. Je nach Virusspezies besteht das Genom aus 7.400 bis 8.300 Nukleotidbausteinen (7,4–8,3 kb), das bei den vier Genera der *Caliciviridae* unterschiedlich organisiert ist [9]. Das virale Genom wird von einem Kapsid aus 180 Kapsidproteinen eingeschlossen, die als Dimere 90 Kapsomere bilden.

Das NLV-Genom enthält (ähnlich den animalen Vesiviren) drei offene Leserahmen (ORFs) [9]. Der erste ORF (ORF1) kodiert die Nichtstrukturproteine. Mittels Sequenzanalyse konnten, ausgehend vom N-Terminus (5'-Ende) des Genoms, in Abfolge die Gene für die Nichtstrukturproteine Helikase, Protease und RNA-abhängige RNA-Polymerase lokalisiert werden. Der zweite ORF (ORF2) kodiert ausschließlich das bereits erwähnte Kapsidprotein, ein Strukturprotein. Der am C-Terminus (3'-Ende) des Genoms liegende dritte ORF (ORF3) kodiert ein weiteres kleines basisches Strukturprotein, über dessen Funktion jedoch noch Unklarheit besteht [10].

Das Genom der SLVs besteht wie das Genom der animalen Lagoviren aus nur zwei ORFs (ORF1 und ORF2), wobei das Kapsidprotein im ORF1 im Anschluss an die Nichtstrukturproteine lokalisiert ist (Abb. 2). Das Gen, das für das Kapsidprotein kodiert, ist von ganz besonderem Interesse, weil seine Sequenzvariabilität sowohl die genetischen als auch antigenen Unterschiede zwischen den Viren begründet. Eine an der Au-

Tabelle 1

**Durch Viren, Bakterien oder Parasiten in den USA verursachte Gastroenteritisfälle. (Nach Mead et al. 1999 [3])**

Erreger		Geschätzte Fälle Insgesamt	Davon durch Lebensmittelübertragung		Anteil an Gesamtlebens- mittelübertragung	
				In %	In %	
<b>Viren</b>	Teilsumme	30.883.391	9.282.170	30	67,2	
darunter						
Norwalk-like-Viren		23.000.000	9.200.000	40	66,6	
Rotaviren		3.900.000	39.000	1	0,3	
Astroviren		3.900.000	39.000	1	0,3	
Hepatitis-A-Virus		83.391	4.170	5	~0	
<b>Bakterien</b>	Teilsumme	5.204.934	4.175.565	80	30,2	
davon						
Campylobacter spp		2.453.926	1.963.141	80	14,2	
Salmonella, nontyphoidal		1.412.498	1.341.873	95	9,7	
Shigella spp		448.240	89.648	20	0,6	
<b>Parasiten</b>	Teilsumme	2.541.316	357.190	14	2,6	
davon						
Cryptosporidium parvum		300.000	30.000	10	0,2	
Giardia lamblia		2.000.000	200.000	10	1,4	
<b>Gesamtsumme</b>		<b>38.629.641</b>	<b>13.814.925</b>	<b>36</b>	<b>100,0</b>	

benseite des Viruskapsids lokalisierte Domäne weist z. B. bei den NLVs die größten Sequenzvariationen auf und enthält mit großer Wahrscheinlichkeit die entscheidenden Determinanten für die Stammspezifität und Zellbindung [11]. Aufgrund der genetischen Unterschiede, die auch innerhalb der Genera NLV und SLV bestehen, wird jede Spezies noch in verschiedene genetische Gruppen, auch Genogruppen genannt, unterteilt. Bei den NLVs werden derzeit die zwei Genogruppen GI (repräsentiert durch den Prototyp Norwalk/68/US) und GII (repräsentiert durch Snow Mountain/76/US) unterschieden, die sich zudem noch in verschiedene genetische Cluster, die Genotypen, differenzieren lassen. Die SLVs umfassen bisher mindestens drei genetische Gruppen, die nach den SLV-Referenzstämmen Sapporo/1982/JP, London/1992/UK oder Parkville/1994/US benannt sind (Abb. 3). Nach dem gegenwärtigen Stand der Feincharakterisierung liegen innerhalb der NLV-Genogruppen I sieben und in der Gruppe GII acht verschiedene Genotypen vor. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 4 dargestellt. Die Abbildung zeigt die phylogenetische Analyse, d. h. den Stammbaum, der Aminosäuresequen-

zen des Kapsidproteins (ORF2) einer weltweiten NLV-Auswahl.

**Krankheitsbild**

Eine durch humane Caliciviren verursachte akute Gastroenteritis äußert sich zumeist durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen, schweren Durchfall und ausgeprägte abdominale Krämpfe. Im Allgemeinen treten diese Symptome nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden auf und dauern dann etwa zwölf bis 60 Stunden an [12]. Es wird

auch noch über zusätzliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerz und Schüttelfrost berichtet. Es müssen aber nicht immer alle diese Symptome gemeinsam auftreten. So kam es vor, dass Patienten nur unter starkem Erbrechen litten, sodass dann lediglich von einer „winter vomiting disease“ die Rede war [13]. Fatale Folgen einer akuten Calicivirusinfektion sind wegen der damit verbundenen mitunter recht schweren Dehydratation vor allem für Menschen mit bereits geschwächtem Gesundheitszustand zu befürchten. Therapeutisch ist deshalb eine

Tabelle 2

**Die vier Genera der Familie *Caliciviridae***

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

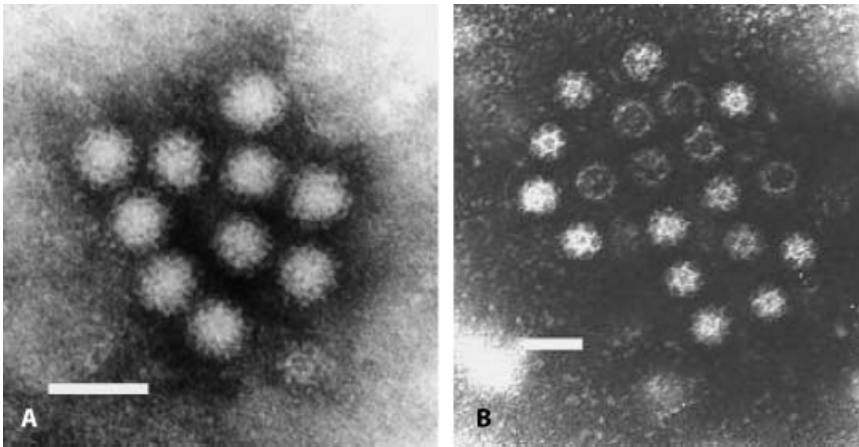


Abb. 1a,b ▲ Elektronenmikroskopische Aufnahme humaner Caliciviruspartikel: (a) „Norwalk-like-Viren“ (NLVs) als kleine, runde, strukturierte Viren und (b) „Sapporo-like-Viren“ (SLVs) mit charakteristischen Oberflächeneinbuchtungen oder „Davidstern-Strukturen“. Maßstabbalken=50 nm. Fotos (Negative-stain Transmission EM) von F.P. Williams, Environmental Protection Agency Microbiology, Internet: <http://www.epa.gov>

Substitutionstherapie mit Elektrolyt- und Glukosezusätzen durchzuführen. Weiterhin sind Entgleisungen von Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus und Kreislaufstörungen bis hin zu Schock möglich. Die Infektionen sind selbstlimitierend und in der Regel moderat verlaufend [14].

### Vorkommen und Verbreitung

Humane Caliciviren sind weltweit verbreitet und recht stabil gegenüber Umwelteinflüssen. So sollen sie Temperaturen bis zu 60°C überleben können [15]. Am häufigsten dokumentiert sind derzeit die durch NLVs ausgelösten Gastroenteritiserkrankungen. Sie traten bisher in Familien, Krankenhäusern, Altenheimen, Militäreinheiten, Hotels, Schulen und Universitäten sowie auf Kreuzfahrtschiffen und Flugzeugträgern auf.

Die Viren werden mit dem Stuhl und dem Erbrochenen erkrankter Personen ausgeschieden. Wenn dann sanitäre und hygienische Verhältnisse mangelhaft sind, können sie Nahrungsmittel und Wasser kontaminieren. Als Folge können wiederum lebensmittelbedingte („foodborne“) Virusinfektionen auftreten. Eine Kontamination von Lebensmitteln kann z. B. durch mit Fäkalien verschmutztes Wasser erfolgen, das für die Bewässerung landwirtschaftlicher Kulturen oder zum Waschen von Feldfrüchten benutzt wird. Aber auch im Lebensmittelbereich beschäftigte Personen sind mehrfach als Infektionsquelle ausgemacht worden. So

konnten NLVs in kalten Speisen wie Eis, grünen Salaten, Obst- und Kartoffelsalat, Sandwiches, Melonen, Gebäck und gekochtem Schinken nachgewiesen werden.

Bestimmte Lebensmittel wurden besonders häufig als Ursache für eine durch NLVs ausgelöste Gastroenteritis ausgemacht. Hierzu zählen z. B. Muscheln, die die Viren über das Wasser, in dem sie leben, aufnehmen und in ihrem Gewebe anreichern [16, 17]. Vor allem der rohe Verzehr der kontaminierten Muscheln kann eine Infektion bewirken. So wurde einer der größten durch NLVs verursachten Ausbrüche im Juni/Juli 1978 in Australien durch den Verzehr kontaminierter Austern ausgelöst und betraf mehr als 2000 Personen [18]. Grundsätzlich besteht bei allen ungekocht konsumierten Nahrungsmitteln einschließlich

Wasser ein erhöhtes Infektionsrisiko, wenn die hygienischen Verhältnisse bei der Herstellung und/oder Verarbeitung unzureichend sind.

Die infektiöse Dosis ist für Caliciviren äußerst gering und liegt bei weniger als 100 Viruspartikel [15]. Dies ermöglicht eine sehr effektive Verbreitung der Viren durch direkte Kontakte von Person zu Person. Die häufig sehr rasche Ausbreitung einer Infektion in Gemeinschaftseinrichtungen lässt darauf schließen, dass neben der fäkal-oralen Übertragung auch die aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole während des Erbrechens eine Rolle spielt. Auch die lang anhaltende Virusausscheidung über den Stuhl, die durchaus zwei Wochen umfassen kann (länger ist eher die Ausnahme), kann zusätzlich zur Verbreitung beitragen. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn erkrankte Personen Kontakt zu vielen anderen Menschen haben (z. B. in Gemeinschaftsunterkünften) oder aber im Lebensmittel- und Gaststättengewerbe bzw. in Ausbildungsstätten tätig sind. Aufgrund der ausgeprägten Variabilität der NLVs, aber wohl auch wegen des Fehlens einer umfassenden protektiven Immunität ist die mehrmalige Infektion von Personen möglich.

Es wurde beobachtet, dass NLV-induzierte Gastroenteritiden auf der nördlichen Erdhalbkugel besonders häufig in den Monaten Oktober bis Mai auftreten [19, 20, 21]. Für ein gehäuftes Auftreten in den kälteren Monaten des Jahres sprechen auch die Berichte über die „winter vomiting disease“ [13, 22, 23].

Da, wie bereits erwähnt, bis zu 95% aller nichtbakteriellen Gastroenteritisausbrüche durch NLVs verursacht sein

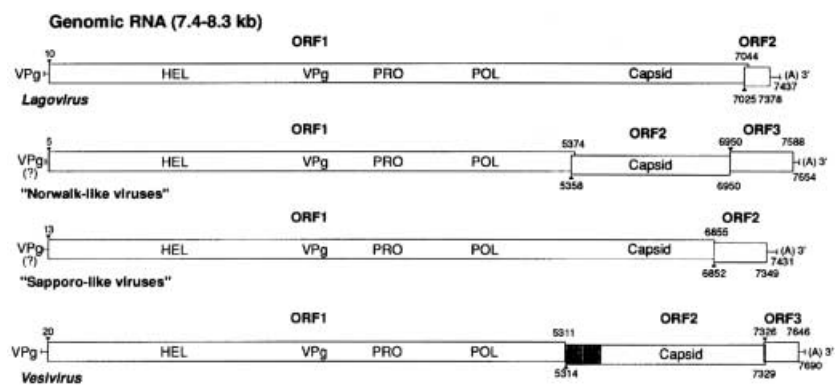


Abb. 2 ▲ Genomorganisation der Caliciviren nach [9]. Die Pfeile markieren die Position des 1. Startkodons des jeweiligen offenen Leserasters (ORF). Die kodierten Enzyme sind HEL (RNA-Helikase), PRO (Protease) und POL (Polymerase); VPg Virusprotein

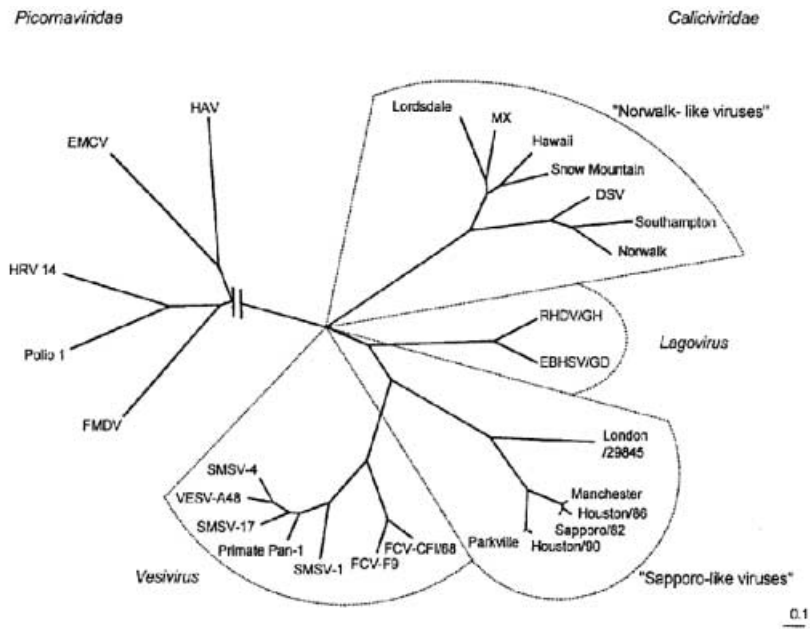


Abb. 3 ▲ Übersichtsstammbaum zur Familie *Caliciviridae* aus [9], erstellt auf der Basis der Sequenzen der Kapsidproteingene. Die Aufspaltung in genetische Gruppen innerhalb der Zweige „Norwalk-like-Viruses“ und „Sapporo-like-Viruses“ ist hier bereits gut erkennbar

könnten [5], sind diese Viren eine außerordentliche Herausforderung für das öffentliche Gesundheitswesen. Um dieser beträchtlichen Belastung besser begegnen zu können, wurde im Jahr 2000 durch die EU im Rahmen des Netzwerkes „Virale Gastroenteritiden“ das Forschungsprojekt „Epidemiology of Foodborne Viruses in Europe“ ins Leben gerufen, das die Kapazitäten medizinischer und gesundheitsdienstlicher Einrichtungen der Teilnehmerländer vereint [24].

### Diagnostik und Charakterisierung

Mittels Elektronenmikroskopie (EM) und Immunelektronenmikroskopie (IEM) lassen sich Caliciviren im Stuhl von Patienten nachweisen (s. Abb. 1a, b). Allerdings werden zur Durchführung einer EM in der Regel  $10^5$ – $10^7$  Viruspartikel/ml benötigt, zudem verlangt sie sehr anspruchsvolle Techniken, sodass ihr Einsatz für umfangreiche epidemiologische Studien weniger geeignet ist. Auch Enzym-Immunoassays (EIAs) für den Antigenachweis im Stuhl unter Verwendung von z. B. rekombinanten Virusproteinen haben sich aufgrund der ausgeprägten antigenen Variabilität der humanen Caliciviren sowie der begrenzten Nachweisempfindlichkeit bisher nicht durchgesetzt ( $>10^5$  Viruspartikel/ml).

Die Methode der Wahl zur Diagnostik humaner Caliciviren ist gegenwärtig die RT-PCR, die zum Nachweis der viralen RNA eingesetzt wird. Sie besitzt eine hohe Nachweisempfindlichkeit ( $10^2$  Viruspartikel/ml) [19, 25, 26, 27]. Mit dieser Methode kann die RNA nicht nur in Stuhlproben, sondern auch in Nahrungsmitteln und Wasser nachgewiesen werden [28, 29, 30]. Hinzu kommt, dass die Sequenzierung der PCR-Produkte zusätzlich Informationen zur genetischen Vielfalt der Caliciviren liefert. Die molekulare Feinanalyse (Sequenzvergleiche und Stammbäume) erlaubt die Differenzierung der Viren und ihre Zuordnung zu Genera, Genogruppen, Genotypen und eventuell sogar zu Subtypen auf Nukleotid- oder Aminosäureebene (s. Abb. 3 und 4) [26, 31], was für die Aufklärung von Infektketten und Übertragungswegen von großer Bedeutung ist. Abbildung 5 zeigt eine solche phylogenetische Analyse einer Auswahl der in den Jahren 1998–2001 in Deutschland zirkulierenden NLVs der gegenwärtig auch global dominierenden Genogruppe II (GII). Auch dieser Stammbaum wurde auf der Grundlage der durch die Kapsidgene kodierten Aminosäuren (aa) der Kapsidproteine der NLVs unter Einbeziehung der Referenzviren Lordsdale/93/UK, Mexico/89/MX, und Hawaii/71/US erstellt. Im genannten Zeitraum wurden in Deutschland nur selten NLVs der GI gefunden.

### Intertypische Virusrekombinanten

Ob intertypische Rekombinationsereignisse zur Variabilität der Viren beitragen, lässt sich noch nicht abschließend beantworten. Prinzipiell aber müssen sie berücksichtigt werden, zumal sie für RNA-Viren, wie z. B. Polioviren, durchaus bekannt sind [32]. Doppelinfektionen mit NLVs unterschiedlicher Genotypen als Voraussetzung für intertypische Rekombinationsereignisse sind bereits beobachtet worden [33]. Kürzlich wurde ein argentinisches Isolat (Arg320/95/AR) als ein potenzielles rekombinantes Virus eingeordnet. Seine Polymerase weist eine 95%ige aa-Identität mit dem Stamm Lordsdale/93/UK auf, während beim Kapsidprotein zu 95% aa-Identitäten mit dem Stamm Mexico/89/MX bestehen [34].

Erste Hinweise auf intertypische Rekombinationsereignisse ergaben sich 1997/98 aus der Sequenzanalyse von zwei differenten Genomregionen (z. B. ORF1 und ORF3) auch für deutsche Virusisolate [19]. Im Jahr 2001 wurden dann bei Untersuchungen von Gastroenteritisausbrüchen, die im Rahmen des EU-Projekts „Epidemiology of Foodborne Viruses in Europe“ [24] durchgeführt wurden, in Frankreich, den Niederlanden und in Deutschland weitere rekombinante NLVs nachgewiesen. In allen diesen Fällen wurde als Rekombinationsort der Übergang des ORF1 zum ORF2 identifiziert. Ob Rekombinationsorte auch in anderen Genomregionen vorliegen können, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Erste eigene Befunde weisen auf einen zusätzlichen Rekombinationsort im ORF3.

### Sapporo-like-Viren

Auch die SLVs sind weltweit in den unterschiedlichsten Populationen nachzuweisen. Die durch diese Viren verursachten Gastroenteritiden betreffen vorwiegend Säuglinge und Kleinkinder, jedoch wird kaum über schwere Verläufe mit Klinikeinweisungen berichtet. Zudem wurden SLVs bisher nur selten im Zusammenhang mit lebensmittelbedingten Gastroenteritisausbrüchen nachgewiesen. In der Literatur wird über SLV-Nachweisraten von 0,9 bis 6,6% bei Untersuchungen sporadischer Durchfallerkrankungen mit einer Häufung der Fäl-

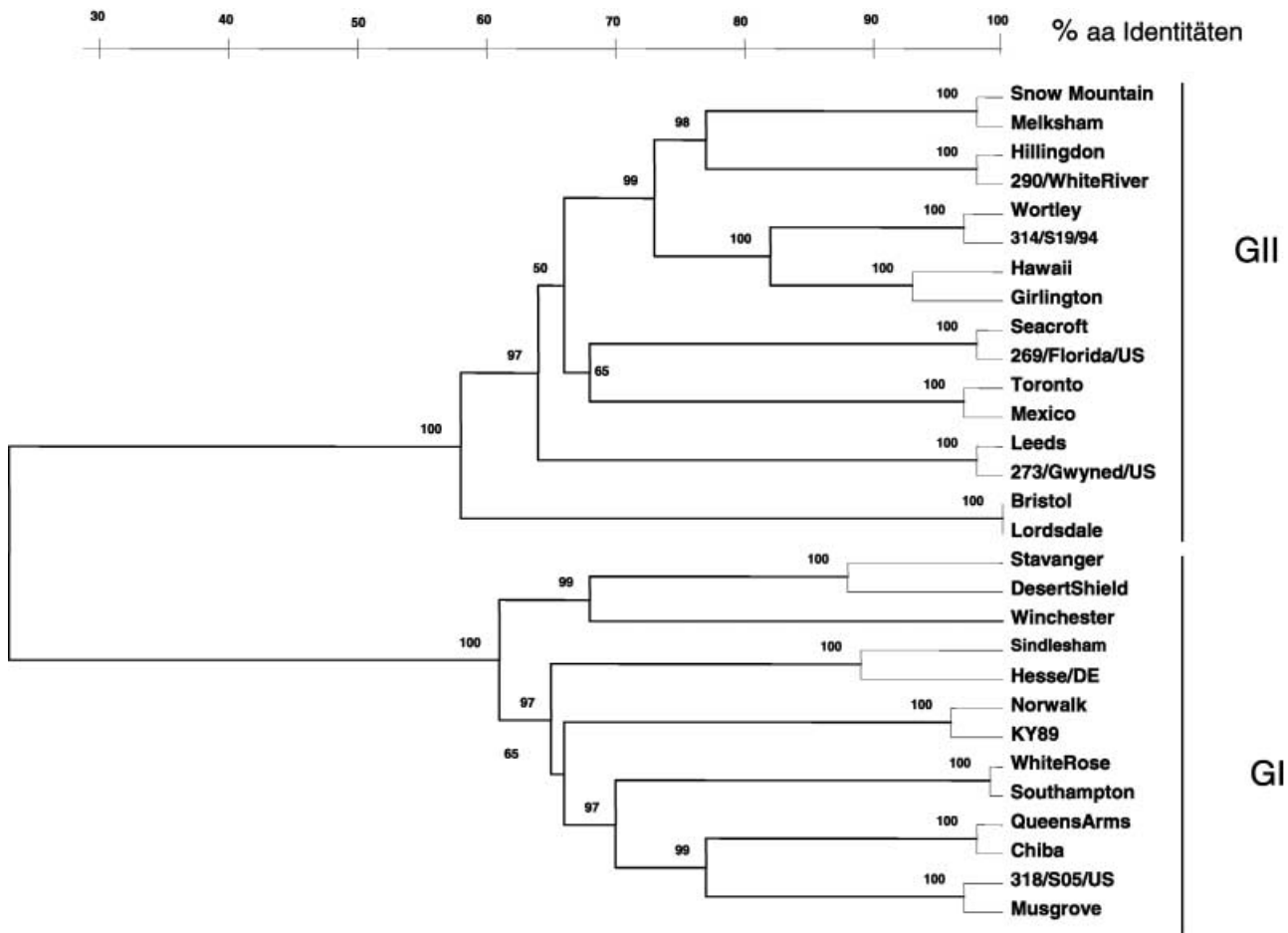


Abb. 4 ▲ Genetische Verwandtschaft zwischen GI- und GII-NLVs auf der Grundlage der ORF2-aa-Sequenzen nach Jan Vinjé, University of North Carolina at Chapel Hill (persönliche Mitteilung). GI Genogruppe I, GII Genogruppe II, NLVs Norwalk-like-Viruses, ORF offener Leserahmen („open reading frame“), aa-Sequenz Aminosäuresequenz

le bei Kindern im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren berichtet [35, 36, 37, 38]. Es wurden auch mit SLV-Infektionen assoziierte Ausbrüche beschrieben, von denen sowohl Kinder als auch Erwachsene betroffen waren [39, 40].

Inzwischen konnte die SLV-Nachweisrate im Stuhl durch den Einsatz sensitiver molekularer Techniken (wie z. B. RT-PCR) verbessert werden, sodass bald mehr über die klinische Bedeutung der SLV-Infektionen bekannt sein wird [41]. In verschiedenen Ländern besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen der hohen Prävalenz an Antikörpern gegen SLVs und der relativ geringen Virusnachweisrate [42, 43, 44, 45]. Ursache hierfür könnten asymptomatische Infektionsverläufe oder eine fehlende Diagnostik aufgrund nicht zur Verfügung stehender adäquater Nachweismethoden sein [46]. Auch wenn bisher in

Deutschland noch nicht gezielt auf SLVs untersucht wird, so konnten in den Jahren 2000 und 2001 erste Isolate (Potsdam/00/DE und Koblenz/01/DE) am Robert Koch-Institut molekulargenetisch charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet werden (Abb. 6).

In Finnland wurde zwischen 1993 und 1995 eine größere epidemiologische Studie zur Untersuchung der Rolle der humanen Caliciviren vom Typ SLV bei akuter Gastroenteritis von Kindern im Alter <2 Jahren (832 Fälle) mittels molekularer Techniken durchgeführt. Ein positiver Virusnachweis gelang in 60% der Fälle. Humane Caliciviren und Rotaviren fanden sich bei jeweils 29% der erkrankten Kinder. Der Anteil der SLVs betrug dabei nur 9%, und das klinische Bild stellte sich vorwiegend als milde Durchfallerkrankung dar. Die NLVs bewirkten zumeist schwerere Erkrankun-

gen als die SLVs. Astroviren wurden in 10% und enteropathogene Adenoviren in 6% der virusbedingten Episoden gefunden [47]. Eine in Japan über die Jahre 1976–1995 durchgeführte Studie [48] an Kindern (<2 Jahre) eines Heimes zeigte, dass humane Caliciviren bei 15 (42%) von insgesamt 36 Ausbrüchen die Hauptverursacher akuter nichtbakterieller Gastroenteritiden waren. Rotaviren der Gruppe A konnten hingegen nur bei zehn (28%) Ausbrüchen als Auslöser der akuten Gastroenteritis identifiziert werden. Diese Studie zeigte eine hohe Prävalenz (19%) sowohl für SLVs der Genogruppe Sapporo 82 als auch für NLVs der Genogruppe GII.

### Norwalk-like-Viren in Haustieren

Lange Zeit galt der Mensch als alleiniger Wirt für NLVs. Kürzlich wurden jedoch in Großbritannien und Japan im Kot von Kälbern und Schweinen Calicivirus-ähnliche Partikel elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Auch das 1976 in Newbury, Großbritannien, gefundene

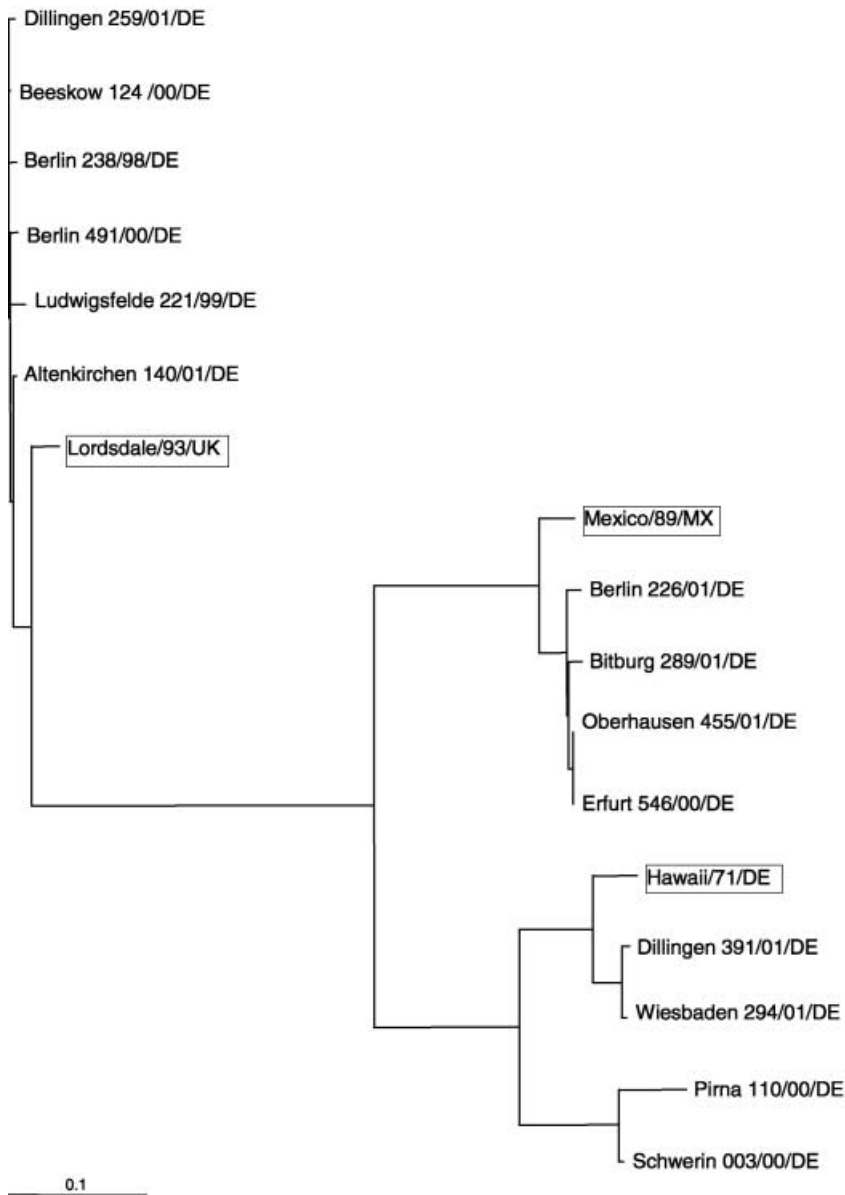


Abb. 5 ▲ Phylogenetischer Baum der Aminosäuresequenzen der Kapsidproteine einiger im Zeitraum von 1998 bis 2001 in Deutschland zirkulierender NLVs der GI. Das Phylogramm wurde unter Verwendung des Programmpakets Phylip [31] erstellt. GI/ Genogruppe II, NLVs Norwalk-like-Viren

„Newbury Agent-2“ und das 1980 in Jena nachgewiesene „Jena-Virus“, beides Rinderviren, erwiesen sich nach molekularer Charakterisierung als Caliciviren. Ihrer Genomorganisation entspricht der Genomorganisation der NLVs [49, 50]. Die phylogenetische Analyse dieser animalen Caliciviren zeigte eine relativ enge genetische Verwandtschaft zu den NLVs der GI. Es wurde daher kürzlich vorgeschlagen, das genetische Klassifikationsschema (s. Tabelle 2) dieser Viren um eine dritte Genogruppe (GIII) zu erweitern [51]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ein tierisches Reservoir für

die humane Infektion bestehen könnte. Der Beweis für das Vorliegen einer Übertragung vom Tier auf den Menschen steht allerdings noch aus [52].

### Immunantwort und Immunität

Untersuchungen zur NLV-Immunität werden dadurch erschwert, dass sich die Viren bislang nicht in Zelllinien kultivieren lassen und deshalb auch kein In-vitro-Neutralisationstest zur Verfügung steht. Ältere Studien zeigen, dass nur etwa 50% der NLV-exponierten Personen erkranken und eine Kurzzeitimmu-

nität gegen das Virus erwerben, die mit dem gemessenen Serumantikörperriveau korreliert. Diese Immunität soll von der lokalen intestinalen Immunabwehr abhängen [53]. Paradoxiere Weise zeigen aber andere Studien, dass auch Personen mit hohem Niveau an präexistierenden NLV-Antikörpern erkranken können, wenn sie demselben Virus erneut ausgesetzt werden [54]. Das Vorhandensein von Serumantikörpern korreliert also nicht unbedingt mit dem Vorliegen einer protektiven Immunität. Unlängst zeigten Studien, dass gerade Personen mit relativ hohem Niveau an präexistierenden Antikörpern nach erneuter Exposition eher erkranken [55].

Gemäß einer Studie zur Durchseuchung der britischen Bevölkerung [56] leben in Städten prozentual mehr Personen mit spezifischen Antikörpern gegen NLVs als auf dem Lande. Die Studie zeigt, dass bei Kleinkindern im Alter zwischen sechs und elf Monaten ein deutlicher Abfall der IgG-Antikörper von 70,8 auf 21,7% zu beobachten ist, der sich mit dem Wegfall der maternalen IgG-Antikörper erklären lässt. Der beobachtete signifikante Anstieg des Anteils von Kindern mit Antikörpern im Lebensalter von zwölf bis 23 Monaten (44%) könnte mit der erhöhten Mobilität der Kinder und dem vermehrten Kontakt zu Gegenständen und Personen assoziiert sein. Bis zum fünften Lebensjahr wurden 55% Antikörperträger ermittelt. Im Lebensabschnitt zwischen fünf und neun Jahren ist ein Anstieg der Antikörper-positiven Kinder auf 69% zu beobachten, der sich aus dem Eintritt in die Schule und aus vermehrtem Kontakt zu anderen Kindern erklärt. Der dritte signifikante Anstieg in der Zahl Antikörper-positiver Personen im Alter von 20 bis 29 Jahren (79%) lässt sich mit einer möglichen Veränderung der sozialen Situation durch Eintritt in das Berufsleben und durch Familiengründung begründen. In den nachfolgenden Altersgruppen unterliegt der Anteil der Träger NLV-spezifischer Immunglobuline (85–92%) keinen größeren Schwankungen mehr.

Obwohl es in den letzten drei Jahrzehnten nicht an Bemühungen gefehlt hat, sich mit Fragen zur Immunität nach Calicivirusinfektion zu beschäftigen, ist unser diesbezügliches Verständnis nach wie vor völlig unzureichend. Die Anwendung molekularer Klonierungstechni-

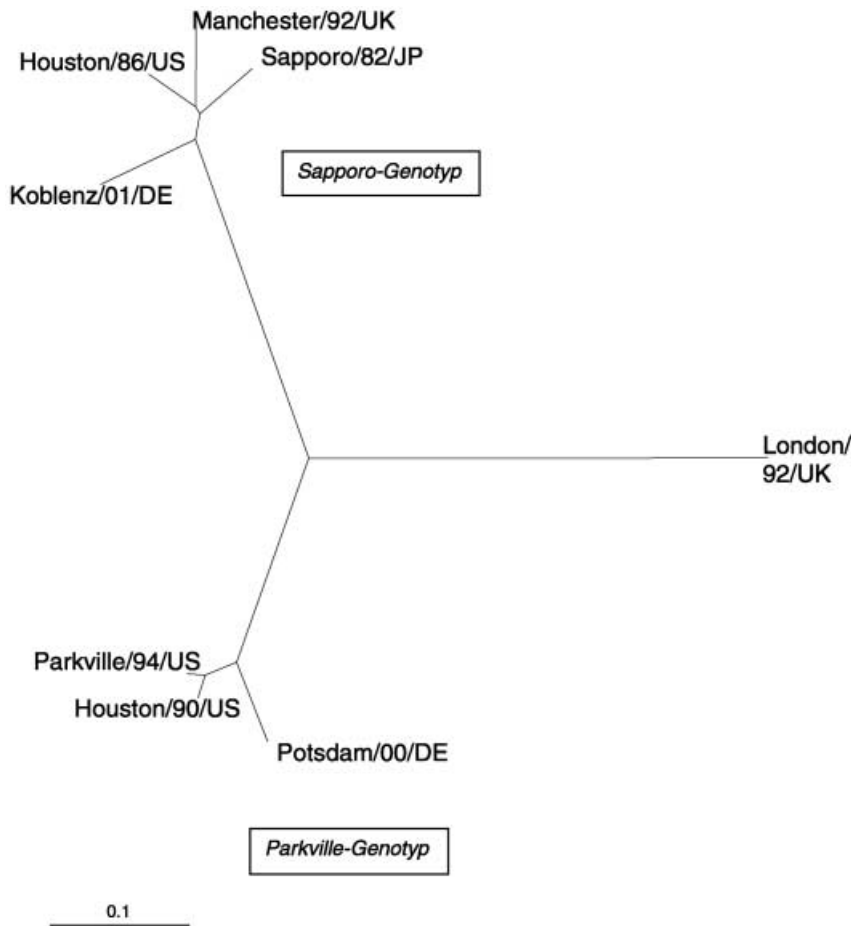


Abb.6 ▲ Phylogenetische Einordnung der beiden in Deutschland identifizierten SLVs. Das Phylogramm wurde unter Verwendung des Programmpakets Phylip [31] auf der Basis von Nukleotidsequenzen des Polymerasegens erstellt. Die Sequenzen der SLVs wurden der GenBank entnommen (X86560, S77903, U95643, AF412339, U95645, U73124, U67859, AF294739). SLVs Sapporo-like-Viruses

ken und die damit verbundene Bereitstellung von z. B. rekombinanten Viruslike-Partikeln (VLPs), die sich sowohl antigenetisch als auch morphologisch kaum von den nativen Viren unterscheiden, dürfte jedoch in Zukunft unser diesbezügliches Wissen schnell erweitern.

## Literatur

- Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI (1992) The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull WHO* 70:705–714
- Murray CJ, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 349:1269–1276
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V et al. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625
- Lindqvist R, Andersson Y, Lindback J et al. (2001) A one-year study of foodborne illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerg Infect Dis* 7 [3 Suppl]:588–592
- Green KY (2000) Summary of First International Workshop on Human Caliciviruses. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S252–S253
- Green KY, Ando T, Balayan S et al. (2000) Caliciviridae. In: van Regenmortel M, Fauquet CM, Bishop DHL et al. (eds) *Virus taxonomy; 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, Orlando, Fla, pp 725–735
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075–1081
- Chiba S, Sakuma Y, Kogasa R et al. (1979) An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 4:249–254
- Green KY, Ando T, Balayan S et al. (2000) Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S322–S330
- Glass PJ, White LJ, Ball JM et al. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74:6581–6591
- Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science* 286:287–290
- Hardy ME (1999) Norwalk und „Norwalk-like viruses“ in epidemic Gastroenteritis. *Foodborne Dis* 19:675–690
- Adler JL, Zickl R (1969) Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 119:668–673
- Caul EO (1996) Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. *J Clin Pathol* 49:874–880
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM (1996) Norwalk group of viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howly PM (eds) *Fields virology*, 3th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp 783–810
- Shieh Y, Monroe SS, Frankhauser RL et al. (2000) Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S360–S366
- Burkhardt W, Calci KR (2000) Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol* 66:1375–1378
- Murphy AM, Grohmann GS, Christopher PJ et al. (1979) An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Med J Aust* 2:329–333
- Schreiber E, Döring F, Künkel U (2000) Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol* 145:443–453
- Hedberg CW, Osterholm MT (1993) Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 6:199–210
- Kaplan JE, Gary W, Baron RC et al. (1982) Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 96:756–761
- Ando T, Jin Q, Gentsch JR et al. (1995) Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *Med Virol* 47:145–152



23. Lew JF, Glass RI, Gangranosa RE et al. (1991) Diarrheal deaths in the United States, 1979 through 1987. A special problem for the elderly. *JAMA* 265:3280–3284
24. Künkel U, Schreier E (2001) Das EU-Netzwerk Virale Gastroenteritiden, EU-Projekt: Epidemiology of Foodborne Viruses in Europe. *Bundesgesundheitsblatt* 44:1217–1218
25. Atmar RL, Estes MK (2001) Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14:15–37
26. Vinjé J, Green J, Lewis DC et al. (2000) Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of „Norwalk-like viruses“. *Arch Virol* 145:223–241
27. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S et al. (2002) Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 100:107–114
28. Lodder WJ, Vinjé J, Van De Heide R et al. (1999) Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in Sewage. *Appl Environ Microbiol* 65:5624–5627
29. Wyn-Jones AP, Pallin R, Dedoussis C, Shore J, Sellwood J (2000) The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Methods* 87:99–107
30. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus L (2002) Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Methods* 100:57–69
31. Felsenstein J (1997) Phylip (Phylogeny inference package) version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. Distributed by author
32. Driesel G, Diedrich S, Künkel U, Schreier E (1995) Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in East Germany. *Europ J Epidem* 11:647–654
33. Gray JJ, Green J, Cunliffe C et al. (1997) Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. *J Med Virol* 52:425–429
34. Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO (1999) Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol* 144:2377–2387
35. Suzuki H, Konno T, Kutzawa T et al. (1979) The occurrence of calicivirus in infants with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 4:321–326
36. Cubitt WD, McSwiggan DA (1981) Calicivirus gastroenteritis in North West London. *Lancet* 2 (8253):975–977
37. Payne CM, Ray CG, Borduin V, Minnich LL, Lebowitz MD (1986) An eight-year study of the viral agents of acute gastroenteritis in humans: ultrastructural observations and seasonal distribution with a major emphasis on coronavirus-like particles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 5:39–54
38. Cubitt WD (1989) Diagnosis, occurrence and clinical significance of the human „candidate“ caliciviruses. *Prog Med Virol* 36:103–119
39. Grohmann G, Glass RI, Gold J et al. (1991) Outbreak of human calicivirus gastroenteritis in a day-care center in Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 29:544–550
40. Gray JJ, Wreghitt TG, Cubitt WD, Elliot PR (1987) An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J Med Virol* 23:377–381
41. Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S (2000) Sapporo virus: History and recent findings. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S303–S308
42. Nakata S, Honma S, Numata K et al. (1998) Prevalence of human calicivirus infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol* 36:3160–3163
43. Honma S, Nakata S, Numata K et al. (1998) Epidemiological study of prevalence of genogroup II human calicivirus (Mexico virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 36:2481–2484
44. Cubitt WD, Jiang X (1996) Study on occurrence of human calicivirus (Mexico strain) as cause of sporadic cases and outbreaks of calicivirus-associated diarrhoea in the United Kingdom. *J Med Virol* 48:273–277
45. Kogawa K, Nakata S, Ukae S et al. (1996) Dot blot hybridization with a cDNA probe derived from the human calicivirus Sapporo 1982 strain. *Arch Virol* 141:1949–1959
46. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK (1994) Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 170:34–43
47. Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T (2000) Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S288–S294
48. Nakata S, Honma S, Numata K et al. (2000) Members of the family Caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* 181:2029–2032
49. Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DWG, Bridger CJ (1999) The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 254:1–5
50. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN (1999) Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73:819–825
51. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL (2000) Genetic classification of „Norwalk-like viruses“. *J Infect Dis* 181 [Suppl 2]:S336–348
52. Van der Poel WHM, Vinjé J, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG (2000) Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 6:36–41
53. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR (1977) Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297:86–89
54. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB (1990) Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 161:18–21
55. Parashar DU, Quiroz ES, Mounts AW et al. (2001) „Norwalk-like viruses“: public health consequence and outbreak management. *MMWR Recommendations and Reports* 50 (No RR-9):1–18
56. Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desselberger U, Estes MK (1993) Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk-virus capsid antigen. *Clin Microbiol* 31:1022–1025