

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher

an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Prävalenz von Norovirusinfektionen bei Reiserückkehrern
mit und ohne Durchfallserkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nadja Apelt
aus Berlin

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Anja Ehrhardt
Prof. Dr. Peter Stingl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Das Norovirus – historischer Überblick
- 1.2 Morphologie und Genom
- 1.3 Taxonomie
- 1.4 Infektionsquellen, Übertragungswege und Erregerreservoir
- 1.5 Immunantwort und Immunität
- 1.6 Erkrankungsverlauf
- 1.7 Die Noroviruserkrankung in comorbidien Patienten
- 1.8 Therapie
- 1.9 Epidemiologie
- 1.10 Norovirus-Enteritis bei Reisenden

2. Problemstellung und Zielsetzung

3. Material & Methoden

- 3.1 Einschlusskriterien und Probenauswahl
- 3.2 Probenaufbereitung
- 3.3 RT-PCR Testung
- 3.4 Erhobene Daten und Statistische Auswertung

4. Ergebnisse

5. Diskussion

- 5.1 Mögliche Risikofaktoren für eine Infektion mit Noroviren
- 5.2 Diskussion des Studienaufbaus und der beobachteten Ergebnisse
- 5.3 Schlussfolgerungen

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Danksagung

9. Lebenslauf

Wesentliche Teile dieser Dissertationsarbeit wurden bereits publiziert:

Apelt N, Hartberger C, Campe H, Loscher T: The Prevalence of Norovirus in returning international Travelers with Diarrhea. BMC Infect Dis. 2010; 10:131

1 Einleitung

Die akute Diarrhö gilt mit etwa 4,6 Milliarden Fällen pro Jahr als die häufigste Erkrankung des Menschen.⁽¹⁾ 2004 verstarben weltweit 2,2 Millionen Menschen an Durchfalls-erkrankungen. Somit kann diese Gruppe von Erkrankungen als weltweit fünft häufigste und bei Kindern unter fünf Jahren als häufigste Todesursache gelten.⁽¹⁾

Weltweit mit zu den häufigsten Erregern akuter Durchfallserkrankungen zählen Noroviren, was sowohl für sporadische Gastroenteritiden⁽²⁾, für lebensmittel-assoziierte Gastroenteritiden^(3,4) als auch für akute virale Gastroenteritiden^(2,3,5-9) gilt. In Europa werden ca. 85% aller Ausbrüche von Gastroenteritiden viraler Genese durch Noroviren verursacht.⁽⁸⁾ Noroviren gelten, nach den Rotaviren, als zweitwichtigster Erreger der akuten Gastroenteritis des Kindes. Es wird geschätzt, dass diese in den Entwicklungsländern pro Jahr für 218.000 Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren verantwortlich sind.⁽¹⁰⁾ Selbst in Industrienationen wie den USA wird vermutet, dass Noroviren für bis zu 7% der durch Diarrhöen verursachten Todesfälle verantwortlich sind.⁽¹¹⁾ Zur Bedeutung von Noroviren als Ursache einer Reisediarrhoe und zur epidemiologischen Bedeutung von Reisenden für die Verbreitung von Noroviren liegen jedoch bislang nur wenige Daten vor.

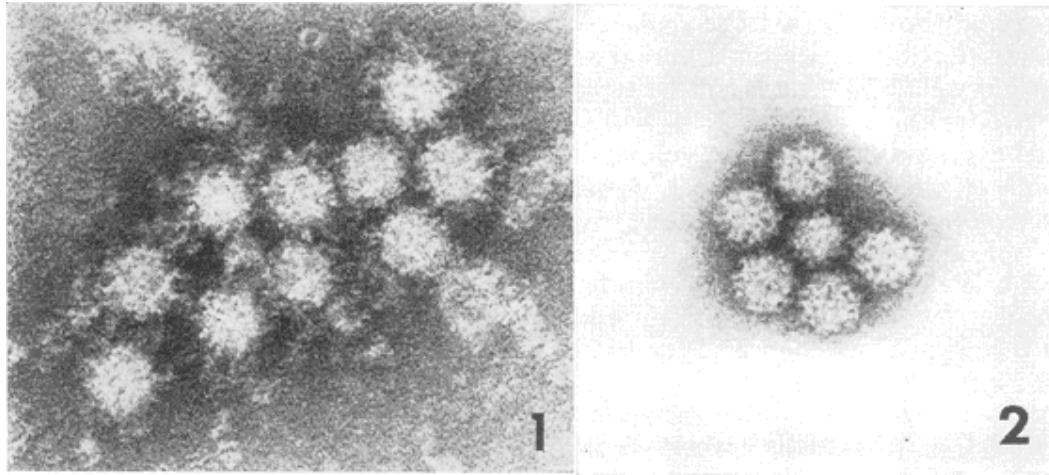
1.1 Das Norovirus – historischer Überblick

Der klassische Krankheitsverlauf der Norovirusgastroenteritis und ihre saisonale Ausprägung wurden bereits 1929 von Zahorsky beschrieben, der dieser Krankheit den immer noch gebräuchlichen Namen „winter vomiting disease“ verlieh.⁽⁴⁶⁾ Nachdem ein bakterieller Erreger für diese neu beschriebene Erkrankung nicht isoliert werden konnte, wurde ab den 1960er Jahren vermutet, dass es sich bei der „winter vomiting disease“ und bei anderen akuten Gastroenteritiden um Erkrankungen viraler Genese handeln könnte.⁽⁴⁷⁾

1972 gelang es Kapikian et al. mittels Immun-Elektronenmikroskopie in Stuhlfiltraten eines Gastroenteritisausbruchs der sich 1968 an einer Grundschule in Norwalk im US Bundesstaat Ohio ereignet hatte ein Konglomerat aus 27 nm großen Viruspartikeln darzustellen und zu beweisen, dass es sich hierbei um den Erreger der fortan als „Norwalk Gastroenteritis“ bekannten Erkrankung handelte.⁽⁵⁵⁾ (Abbildung 1). Noroviren dieses 1968 in Norwalk dokumentierten Ausbruchs gelten auch heute noch als Referenzgenotyp der Noroviren der Genogruppe I.^(36,47,56) Durch die gelungene Klonierung des Virusgenoms 1990

⁽⁶⁰⁾ konnten die Norwalk-like Virender Familie der *Caliciviridae* zugeordnet werden. 2002 erfolgte schließlich die Umbenennung der Norwalk-like Viren in “Noroviren”.⁽⁶¹⁾

Abbildung 1: Originale Photographie der von Albert Kapikian 1972 entdeckten Norwalk Viren.⁽⁵⁵⁾



Heutzutage wird den Caliciviren, inklusive der Noroviren, eine solche Wichtigkeit beigemessen, dass sie das amerikanische „National Institute of Allergy and Infectious Diseases“ als Biowaffen der Klasse B eingestuft hat.⁽⁶²⁾ Dies wird vor allem durch ihre hohe Prävalenz in der Bevölkerung, die hohe Infektiosität, die Resistenz gegenüber gängigen Desinfektionstechniken und die ausgeprägte Umweltresistenz begründet.⁽⁶²⁾

1.2 Morphologie und Genom

Die Familie der *Caliciviridae* ist nach dem lateinischen Wort ‘calix’ benannt, was soviel wie ‚Kelch‘ oder ‚Becher‘ bedeutet. So sind 32 kelchförmige, symmetrisch angeordnete Vertiefungen an der Oberfläche ein gemeinsames morphologisches Merkmal aller Caliciviren inklusive der Noroviren.⁽⁵⁷⁾ Noroviren besitzen ein kleines rundes, im Durchmesser etwa 27-35 nm großes Virion⁽⁵⁵⁾ und eine etwa 7.400 bis 7.700 Nukleotide umfassende, nicht-segmentierte Einzelstrang-RNA positiver Polarität.^(41,60,63-65) Ihre RNA ist am 3' Ende polyadenyliert und am 5' Ende proteingebunden. Das mit dem 5' Ende der RNA kovalent verbundene Protein, auch als “virus-coded protein” oder VPg bekannt, ersetzt das methylierte 5' Kopfende der RNA anderer viraler Spezies und ist, ebenso wie die 32 „calices“, ein Merkmal der *Caliciviridae*. Es wurde als essentiell für die Infektiosität der Gattung beschrieben.^(66,67)

Das Norovirusgenom besitzt drei “open reading frames” (ORFs) von denen ORF1 der größte und ORF3 der kleinste ist, sowie zwei “untranslated regions” (UTR) am 5’ und am 3’ Ende des Genoms.^(63,65,68,69) Genogruppenabhängig kann sich ORF2 mit dem 3’ Ende von ORF1 um 17 bis 20 Basenpaare überschneiden, was als ORF1/ORF2 overlap bezeichnet wird.⁽⁷⁰⁾ Die Region zwischen dem C-terminalen Ende von ORF1 und dem N-terminalen Ende von ORF2 ist die am höchsten konservierte Region der Spezies.⁽⁷¹⁾

ORF1 (etwa 5100 bis 5300 Nukleotide lang) kodiert für ein 1789 Aminosäuren langes Polyprotein welches von der 3C-like Protease (3CLpro) in für die Replikation wichtige nicht-Strukturproteine aufgespalten wird.⁽⁶³⁾

Die absolute Anzahl der auf ORF1 kodierten nicht-Strukturproteine und ihrer Vorläufer ist nicht bekannt.⁽⁷²⁾ Es werden jedoch in aktuellen Studien, in Analogie zu Virusproteinen anderer RNA Viren wie den Picornaviren, sechs nicht-Strukturproteine, inklusive der 3CLpro, vermutet.^(56,72) Der Beweis, dass vier dieser sechs vermuteten Proteine tatsächlich in ORF1 kodiert werden, wurde bereits erbracht. Diese Proteine sind die NTPase (p41), die 3CLpro, die RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) und das VPg.⁽⁷³⁻⁷⁷⁾ Es wird angenommen, dass die genannten Proteine im ORF1 in folgender Reihenfolge, N- nach C-terminal, kodiert sind: p48, NTPase (p41), p22, VPg, „3C-Like protease“(3CLpro) and „RNA-dependent RNA polymerase“(RdRp).^(56,72)

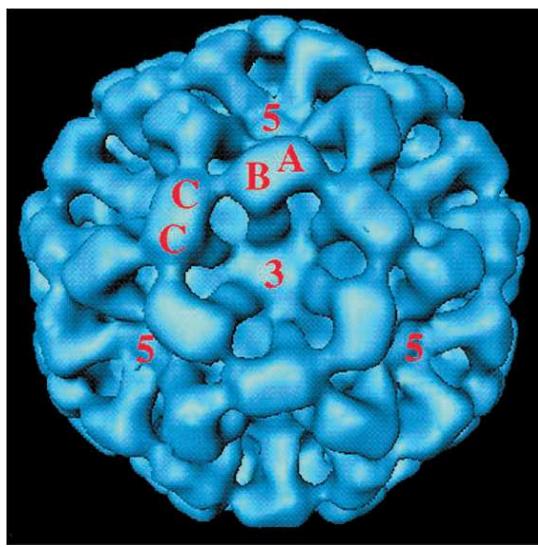
ORF2 (in etwa 1600 Nukleotide lang) und ORF3 (630-800 Nukleotide lang) kodieren für Strukturproteine der Virushülle: ORF2 für das „major capsid protein“ oder Vp1 (530-555 Aminosäuren lang, 58-60kDa Molekulargewicht) und ORF3 für das “minor capsid protein” oder Vp2 von 22-29 kDa Molekulargewicht.^(72,78-80) Beide Kapsidproteine werden aus einer einzigen proteingebundenen subgenomischen RNA synthetisiert, die die Transkriptionsprodukte der ORF2 und 3 sowie die 3’ UTR enthält.⁽⁷⁹⁾ Die Existenz eines einzigen Haupstrukturproteins Vp1 ist zwar ein Merkmal aller Caliciviren⁽⁵⁷⁾, dennoch ist sie: “[...] unique among animal viruses and more closely resembles the capsid composition of plant viruses [...]”⁽⁷²⁾

90 Dimere (180 Kopien) des Kapsidproteins Vp1 und ein bis zwei Kopien Vp2 bilden die Virushülle der Noroviren.^(81,82) (Abbildung 2). Wird die subgenomische RNA experimentell *in vitro* exprimiert, lässt sich die Bildung von antigenetisch authentischen aber RNA-losen „Virus-Like-Particles“ (VLP) beobachten.⁽⁸³⁾ Auch die *in vitro* Expression des ORF2 führt zur Bildung von VLPs, jedoch in bis zu zwölf mal geringeren Konzentrationen als dies durch eine Expression der gesamten subgenomischen RNA, ORF3 inklusive, zu beobachten ist. Diese

Versuche zeigten, dass die Präsenz von Vp2 die Syntheserate von Vp1 signifikant erhöht und dem Kapsid größere Stabilität gegenüber Proteasen verleiht.⁽⁷⁹⁾

Studien beweisen die Existenz von Vp2 in zwei unterschiedlichen Formen: einer dephosphorylierten Form in VLPs und einer phosphorylierten Form in RNA-haltigen Viruspartikeln.^(78,84) Das Vp2 Protein ist stark basisch, was zu der Vermutung führte, dass es in seiner phosphorylierten Form RNA bindet und für die Verpackung der viralen RNA in das Kapsid verantwortlich ist.⁽⁷⁹⁾

Abbildung 2: Von Prasad et al. 1999 veröffentlichte Oberflächenstruktur der Noroviren⁽⁸¹⁾



Das Kapsidprotein Vp1 besteht aus zwei Domänen: der sogenannten „shell“ oder „S“ Domäne und der „protruding“ oder „P“ Domäne.⁽⁸¹⁾

225 N-terminal lokalisierte, hochkonservierte Aminosäurereste des Kapsidproteins Vp1 bilden die S Domäne, welche die zusammenhängende Virushülle bildet. Die P Domäne bildet Vorsprünge, die von der Virushülle abstehen und im Elektronenmikroskop deutlich sichtbar sind. Sie besteht ihrerseits aus zwei voneinander abzugrenzenden Regionen oder Subdomänen, P1 und P2. Die P2 Region befindet sich innerhalb der P1 Region und teilt diese in P1-1 und P1-2.^(72,85-87) P2 weist die wohl variabelste Aminosäuresequenz des Noroviruskapsids auf und wird für die Virus-Zell-Bindung und somit für die antigenetischen Eigenschaften einzelner Norovirusstämme verantwortlich gemacht.⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾ Sowohl Mutationen in der S- als auch in der P2 Domäne des Kapsidproteins Vp1 führen zum Auftreten neuer Virusstämme. Finden Mutationen jedoch in der P2 Domäne statt, sind die daraus resultierenden neuen Virusstämme oftmals mit großen Epidemien verbunden und somit epidemiologisch bedeutsamer.⁽⁸⁵⁾

Innerhalb der P2 Subdomäne des Vp1 Kapsids konnten zwei kleine Regionen identifiziert werden, jede nur drei Aminosäuren lang, die als ‚Mutationshotspots‘ der Noroviren gelten.⁽⁸⁵⁾ Sie sind an einer exponierten Stelle des Noroviruskapsids lokalisiert und werden aller Wahrscheinlichkeit nach von Antikörpern des menschlichen Körpers als Epitop erkannt.⁽⁸⁵⁾ Es wird spekuliert, dass eine Mutation in einer dieser Sequenzen ausreichend ist um neue virulente Virusstämme zu erschaffen, die eine in der Bevölkerung bereits vorhandene Immunantwort umgehen.⁽⁸⁵⁾ Zellkulturexperimente an murinen Noroviren stützen diese These, da die Substitution eines einzigen Aminosäurerestes in der P2 Region ausreichte um die Virusneutralisation mittels monoklonaler Antikörper zu verhindern.⁽⁸⁶⁾

1.3 Taxonomie

Noroviren, aufgrund ihrer Morphologie international auch unter dem Namen ‚small round structured viruses‘ bekannt, gehören einer eigenen Gattung innerhalb der Familie der *Caliciviridae* an.⁽⁸⁹⁾ Dieser Virusfamilie sind drei weitere Gattungen zuzuordnen: Sapoviren, Lagoviren und Vesiviren.⁽⁸⁹⁾ Noroviren und Sapoviren werden aufgrund ihrer Humanpathogenität häufig auch unter der Bezeichnung „Human Caliciviruses“ oder kurz HuCV zusammengefasst.^(57,90-92)

Die ausgeprägte genetische Vielfalt der Noroviren ist in der internationalen Literatur vielfach dokumentiert worden.^(70,86,93-97) Leider gibt es für diese genetisch diverse Virusspezies bislang kein allgemeingültiges internationales Klassifikationssystem^(94,98) welches eine Übersicht über vorhandene Untergruppen erleichtern würde. Das ambitionierteste Projekt eine solche Klassifikation zu erschaffen wurde 2006 von Zheng et al. publiziert.⁽⁹⁴⁾ Dabei wurde das vollständige Genom von 164 verschiedenen Noroviren sequenziert und auf der Grundlage von genetischen Distanzanalysen drei Kategorien gebildet denen sich jeder neu entdeckte Stamm zuordnen lässt. Diese sind der Virusstamm, oder ‚strain‘ (S) als kleinste Einheit, das genetische Cluster (C) und die Genogruppe (G) als übergeordnete Einheit.⁽⁹⁴⁾ Viele Autoren verwenden die Bezeichnung ‚Genotyp‘ synonym mit dem von Zheng et al. benutzten Begriff ‚genetisches Cluster‘. Einige Autoren scheinen damit jedoch einzelne Virusstämme zu bezeichnen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Bezeichnung Genotyp synonym für den Begriff ‚genetisches Cluster‘ verwendet.

Die Aminosäuresequenz der Kapsidregion unterscheidet sich laut Zheng et al. zwischen zwei Genogruppen um bis zu 60%, was mit den Ergebnissen anderer Autoren vereinbar ist.^(94,99,100) Diese Differenz in der Kapsidregion ist so groß, dass Zheng et al. die Vermutung

äußerten, dass es sich bei den heute dem Genus *Norovirus* zugeordneten Genogruppen um eigene Spezies innerhalb der Caliciviren handeln könnte. Wie bereits frühere Arbeiten vermuten ließen,^(40,100-103) existieren innerhalb des Genus *Norovirus* fünf Genogruppen, deren Existenz Zheng et al. belegen konnten.⁽⁹⁴⁾ Die 164 untersuchten Virusstämme konnten 29 genetischen Clustern zugeordnet werden, von denen acht in die Genogruppe I, 17 in die Genogruppe II, zwei in die Genogruppe III und jeweils einer in die Genogruppen IV und V gehörten.⁽⁹⁴⁾ Studien der Jahre 2007 und 2008 ordneten der Genogruppe IV ein weiteres genetisches Cluster, GIV.2 zu.^(104,105) Die Aminosäuresequenz des Vp1 Kapsidproteins sollte innerhalb desselben genetischen Clusters um mindestens 80% übereinstimmen.⁽⁹⁴⁾

Die Einordnung neu entdeckter Noroviren in das von Zheng et al. vorgeschlagene Klassifikationsschema erfolgt gemeinhin über die Sequenzanalyse einzelner Genomregionen, trotz der eindeutig belegten Nachteile dieser Methode.⁽⁹⁴⁾ Neuere Studien verwenden dazu meist eine Sequenzanalyse des in ORF2 kodierten Kapsidproteins, vor allem der Regionen C (5' Ende des ORF2) und D (3' Ende des ORF2). Ältere Studien vergleichen hochkonservierte Bereiche des ORF1, zumeist die für das RdRp-Protein kodierende Region (Region A), aber auch das 3' Ende des ORF1 (Region B).^(70,85,94,95,99,106,107)

Nach aktuellem Wissensstand, enthalten nur die Genogruppen I, II und IV humanpathogene Genotypen.^(70,85,92,94,95,106-108) Die Genogruppe III (GGIII), auch bekannt unter dem Namen Jenavirus (JV), umfasst bovine Virusstämme und besitzt Ähnlichkeit mit Viren der GGI.^(102,109,110) Viren der Genogruppe V (GGV), die murinen Noroviren (MV), sind die bisher einzigen Vertreter ihrer Spezies, die in Zellkultur gezüchtet werden können und für die es ein Kleintiermodell gibt.^(103,111) Die Genogruppe II beinhaltet neben den 16 humanpathogenen Genotypen auch einen porcinen Genotyp (GII.11) und ist weltweit am häufigsten vertreten.^(7,9,94,112) 2007 konnten GIV.2 Noroviren auch erstmals in Löwen und 2008 in Hunden nachgewiesen werden.^(104,105)

Rekombinanten Noroviren wurde in den letzten Jahren aufgrund ihrer Prävalenz und vor allem aufgrund der Vermutung einer möglicherweise erhöhten Virulenz international sehr viel Aufmerksamkeit gewidmet.^(70,106) Wie alle RNA-Viren positiver Polarität, sind auch die Noroviren anfällig für einen „genetic shift“ durch intra- und intertypische Rekombinationsvorgänge, sowie für einen „genetic drift“ bedingt durch die fehlende Korrekturlese-Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp).⁽⁷⁰⁾ 20 Norovirusrekombinanten, einige von ihnen global zirkulierend, konnten bis jetzt in den Genogruppen I bis III identifiziert werden.^(70,113-115) Bei 19 dieser 20 rekombinanten

Virusstämme lag der so genannte “recombinant breakpoint” im ORF1/ORF2 overlap.⁽⁷⁰⁾ Da, wie bereits erwähnt, die Genotypisierung der Noroviren zumeist über eine Sequenzanalyse von Teilen des ORF1, beziehungsweise des ORF2, erfolgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass viele rekombinante Viren mit einem “recombinant breakpoint” am ORF1/ORF2 overlap schlachtweg übersehen werden.⁽⁷⁰⁾ Es kann nur gehofft werden, dass die Bemühungen um eine einheitliche Klassifikation der rekombinanten Noroviren in kürze Erfolg zeigen, damit Mehrfachmeldungen eines neu entdeckten rekombinanten Virusstammes vermieden werden können.⁽⁷⁰⁾

1.4 Infektionsquellen, Übertragungswege und Erregerreservoir

Noroviren sind hochinfektiöse, äußerst umweltstabile Erreger und die Infektionsquellen sind vielfältig. Der Großteil der Norovirusinfektionen wird fäkal-oral und somit zumeist über Lebensmittel übertragen.^(36,93,97,116-122) Menschen sind folglich das wichtigste Erregerreservoir. Allerdings kann das Virus auch als Schmierinfektion, direkt von Mensch-zu-Mensch, oder über den Luftweg mittels Aerosolen - entstanden bei dem vom Virus ausgelösten Erbrechen - übertragen werden.^(17,36,93,97,116,119,121-123) Das Schwimmen in kontaminierten Gewässern führt mitunter ebenfalls zur Infektion.^(124,125) Auch auf kontaminierten Einrichtungsgegenständen und Lebensmitteln ist das Virus durch seine hohe Umweltresistenz selbst 7 – 10 Tage nach der eigentlichen Kontamination noch nachweisbar und eine Infektion ist weiterhin möglich.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾

Viren werden in hohen Konzentrationen in Erbrochenem ausgeschieden. Im Stuhl wird die Viruslast jedoch auf lediglich 10^4 - 10^6 Partikel pro Gramm geschätzt,^(86,129) was so niedrig ist, dass es bis heute noch nicht möglich war Lebendvirus aus Stuhlproben zu extrahieren.⁽¹³⁰⁾ Die Erregerkonzentration im Stuhl scheint für eine Weiterverbreitung des Virus dennoch ausreichend hoch zu sein, was die Häufigkeit der fäkal-oralen Übertragung zeigt. Die infektiöse Dosis liegt bei 10-100 Erregern.⁽¹³¹⁻¹³³⁾ Die Infektionswahrscheinlichkeit bei Kontakt mit Noroviren ist hoch. Studien an Freiwilligen zeigen, dass 82% der exponierten Personen infiziert werden und 68% aller Versuchspersonen Symptome entwickeln.⁽¹²¹⁾

Asymptomatisch infizierte Norovirusausscheider sind eine wichtige Infektionsquelle und ein wichtiges Erregerreservoir des Virus. Standard RT-PCRs zur Detektion von Noroviren im Stuhl weisen eine Virusausscheidung in nicht komorbiden Patienten noch bis zu 14 Tagen nach Ende der Symptome nach.^(36,121,134) Sensitivere RT-PCR Methoden haben gezeigt, dass die Virusausscheidung im Durchschnitt sogar bis zu 28 Tage lang anhält.⁽¹³⁵⁾ Vor allem

diese lange Ausscheidungsphase der Viren nach Ende aller Symptome wird als Grund für die hohe Rate an fäkal-oral übertragenen Norovirusgastroenteritiden angesehen.⁽⁸⁶⁾ Von nach überstandener Erkrankung asymptomatischen Patienten abzugrenzen sind jene, die nie eine symptomatische Erkrankung erlitten. Ihr Anteil wird auf bis zu 30% der Infizierten geschätzt.^(121,136) Somit kann die Zahl der asymptomatischen "Virusverbreiter" bei epidemisch auftretenden Norovirusgastroenteritiden beachtlich sein.

Wie bereits erwähnt enthalten nur die Genogruppen I, II und IV humanpathogene Genotypen, wobei die Genotypen GII.11 und GIV.2 nach aktuellem Wissensstand nicht humanpathogen sind.^(70,85,92,94,95,106-108) Älteren Theorien zum Trotz, konnten Noroviren aller fünf Genogruppen mittlerweile in einer Reihe von Säugetieren, unter ihnen Mäuse, Kühle, Schweine, Hunde, Löwen und Menschenaffen, nachgewiesen werden.^(104,105,137-139) Die Infektion einiger dieser Spezies mit bisher als ausschließlich humanpathogen geltenden Viren lässt die Frage nach einem tierischen Erregerreservoir auftreten.^(70,139) Rekombinante Ereignisse zwischen menschlichen Noroviren und denen in Primaten vorkommenden Varianten wurden bereits beobachtet.⁽¹³⁹⁾ Des Weiteren gibt es deutliche Hinweise auf eine zoonotische Übertragung von bovinen Noroviren der Genogruppe III, gemeinhin als nicht-humanpathogen bekannt, auf Menschen.⁽¹³⁸⁾ Gerade in Anbetracht des hohen Rekombinationspotentials von RNA Viren wie den Noroviren sollte diesen Ergebnissen Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die Gefahr die von Interspezies-Rekombinanten einer anderen Gruppe von RNA Viren - den Influenzaviren - ausgeht ist längst Teil des allgemeinen medizinischen Bewusstseins.⁽¹⁴⁰⁾ Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten nachzuweisen ob eine Interspezies-Rekombination der Noroviren ein ähnlich hohes Gefährdungspotential für die öffentliche Gesundheit bergen könnte.

Eine zoonotische Übertragung von Noroviren findet nicht nur durch Kontakt mit infizierten Säugetieren, sondern auch durch das Verspeisen von rohen Austern und anderen Schalentieren statt. Dieser besondere Infektionsweg ist meiner Meinung nach von durch kontaminierte Lebensmittel übertragenen Norovirusinfektionen abzugrenzen, da die Austern nicht im Rahmen der Zubereitung kontaminiert werden. Stattdessen filtrieren Austern Meerwasser durch ihren Schlund und konzentrieren so Darmviren wie Polio-, Hepatitis A- und Noroviren in ihrem Verdauungstrakt.⁽¹⁴¹⁾ Die Darmviren entstammen dabei zumeist Abwässern die ungeklärt ins Meer geleitet wurden. Die Zellen der Darmmukosa der Austern sind mit Histo-Blutgruppen-Antigenen (HBGA) der Gruppe A ausgestattet, die auch im Menschen als Rezeptoren für das Norovirus fungieren (genauere Diskussion folgt). Auf diese Weise bindet die Darmmukosa der Austern Noroviren der verschiedensten Genotypen

kovalent.⁽¹⁴¹⁾ Dies führt zu einem besonderen, weltweit beobachteten, Phänomen: alle bisher untersuchten Austern trugen mehr als nur einen Norovirusstamm⁽⁹³⁾ und bei allen von Austern verursachten und untersuchten Norovirusgastroenteritiden lagen Mehrfachinfektionen mit den diversesten Noroviren vor.⁽⁹³⁾ Dies lässt vermuten, dass Austern und ähnliche Schalentiere nicht nur ein wichtiges tierisches Erregerreservoir für Noroviren sind, sondern auch als ein regelrechtes „Rekombinationslabor“ fungieren.

1.5 Immunantwort und Immunität

Die Prävalenz von Antikörpern gegen Noroviren ist in der Bevölkerung hoch. Die Vermutung ein Großteil der deutschen Bevölkerung wäre immun gegen Noroviren wäre somit naheliegend, würde das Virus nicht Infektionen in allen Altersgruppen und Bevölkerungsschichten auslösen. Studien zeigen, dass eine Einfachinfektionen mit Noroviren eines spezifischen Typen zu einer etwa ein bis sechs Monate andauernden Immunität führt,⁽¹⁷³⁻¹⁷⁷⁾ während eine Mehrfachexposition zu einer länger anhaltenden Immunität gegen ein spezifisches Norovirus führen kann.^(175,178) Eine Langzeitimmunität gegen Noroviren konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.⁽¹⁷³⁻¹⁷⁷⁾

Neben der durch häufige Exposition erworbenen Immunität gegen Noroviren gibt es klare Indizien für eine durch genetische Faktoren beeinflusste Suszeptibilität einzelner Individuen.^(93,96,179) Studien mit Freiwilligen konnten zeigen, dass zwischen 12,5% und 40% der Teilnehmer resistent gegen spezifische Genotypen waren.^(96,173,177,180) Zudem gehörten resistente Personen oftmals derselben Familie an.⁽¹²⁵⁾ Der Fund besonders hoher Antikörpertiter in für Infektionen besonders anfälligen Personen deutete ebenfalls auf einen genetischen Faktor hin, der die Infektion dieser Personen zu erleichtern schien.⁽¹⁷³⁾

Studien aus jüngerer Zeit konnten zeigen dass es sich bei diesem genetischen Faktor mit großer Wahrscheinlichkeit um vom Menschlichen Dünndarmepithel exprimierte Histoblutgruppenantigene handelt, welche als Rezeptoren für Noroviren dienen können.^(179,181-183) Wie jedoch das Fehlen eines funktionierenden Zellkulturmodells für Noroviren zeigt, scheinen die HBGA Antigene nicht die einzigen Norovirusrezeptoren zu sein, die für eine Infektion nötig sind. So exprimieren Caco-2 Zellen das H-Antigen, konnten aber dennoch nicht mit Noroviren infiziert werden, was auf das Vorhandensein eines noch nicht identifizierten Korezeptors hindeuten könnte.^(103,130,184)

Die HBGA lassen sich in drei große Untergruppen aufgliedern, zu denen die ABO-, Lewis und Sekretorantigene gehören. Es konnte gezeigt werden, dass Noroviren eine Virus-Rezeptorbindung mit allen drei Antigengruppen eingehen, wobei acht unterschiedliche, genotypspezifische, Bindungsmuster angenommen werden.^(86,130,183,185,186) Noroviren der GII.4 scheinen neuesten Erkenntnissen zufolge alle HBGA Typen binden zu können.^(96,130,179,182,186,192) Es wurde vermutet, dass dies der Grund für die hohe Prävalenz und den großen Erfolg des Genotypen GII.4 sein könnte.^(96,130)

Auf Seiten des Virus scheint die Kopplungsstelle mit den HBGA der Darmmukosa in der P2 Domäne des Kapsids lokalisiert zu sein. Es konnten zwei nebeneinander liegende Bindungsstellen gefunden werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach dieser Kopplungsstelle angehören.^(87,187-189) Wie bereits unter Punkt 1.2. erwähnt, führen Mutationen in der P2 Domäne zu neuen und epidemiologisch bedeutsamen Norovirus Stämmen.⁽⁸⁵⁾ Somit ist die P2-HBGA Kopplung von herausragender epidemiologischer Bedeutung. Es könnte in Zukunft möglich sein, Informationen über das epidemiologische Potential eines neuen Norovirusstamms zu gewinnen, in dem *in vitro* seine Bindungskapazität an HBGA getestet wird und die genetische Verteilung dieses Merkmals in der Bevölkerung in Betracht gezogen wird. Des Weiteren scheint die P2-HBGA Kopplungsstelle, wie bereits von Tan et al. bemerkt,⁽¹⁸³⁾ eine äußerst viel versprechende Lokalisation für eine medikamentöse Hemmung des Infektionsprozesses.

HBGA sind im menschlichen Körper weit verbreitet und können nicht nur von Zellen der Darmschleimhaut und von Erythrozyten exprimiert werden, sondern werden auch im Speichel gefunden.^(193,194) Studien legen nahe, dass die Sekretion eines genotypspezifischen IgAs im Speichel nach Kontakt mit dem Virus möglicherweise zu geringer ausgeprägten Symptomen der Erkrankung führt.⁽¹⁸²⁾ Dies, sowie die verlängerte Immunität bei Mehrfachkontakt, lässt eine Norovirusschutzimpfung mit starker Schleimhautimmunogenität als ein durchaus sinnvolles und praktikables Konzept erscheinen.⁽¹⁸³⁾ Auch Oligosaccharide der menschlichen Milch weisen ähnliche Epitope auf wie die HBGA Antigene des Darms. So konnte in Mutter-Kind Kohortenstudien ein schützender Effekt für den gestillten Säugling nachgewiesen werden, da die betreffenden Epitope in der Milch Viruspartikel binden bevor diese die Zellen der Darmschleimhaut des Säuglings infizieren können.^(183,195) Es wäre somit denkbar, erkrankten Säuglingen oder anderen durch Dehydrierung besonders gefährdeten Patientengruppen diese Oligosaccharide in purifizierter Form zuzuführen um die Infektionsdauer und -schwere zu senken.

1.6 Erkrankungsverlauf

Der Verlauf einer klassischen Noroviruserkrankung ist seit den ersten Studien an Freiwilligen nach der Entdeckung des Norwalk-Erregers gut dokumentiert.⁽¹⁷⁶⁾ Die Erkrankung zeichnet sich durch das Auftreten einer heftigen, im Mittel 12-60 Stunden andauernden Gastroenteritis aus. Die Ausheilung verläuft in der Regel folgenlos.^(36,130,196) Plötzliches, gelegentlich schwallartiges Erbrechen, gefolgt von einer wässrigen, unblutigen Diarröhö sind die Hauptmerkmale der Erkrankung,^(36,116,163) ihre Ausprägung ist vermutlich altersabhängig. So scheint Erbrechen häufiger ein Symptom des Kindes und Diarröhö häufiger ein Symptom des Erwachsenen zu sein.⁽¹⁹⁷⁾ Häufige Begleitsymptome sind ein schweres Krankheitsgefühl, Übelkeit, Muskel- und Gliederschmerz sowie Bauchkrämpfe. Im Differentialblutbild kann in der Regel ein Leukozytenanstieg beobachtet werden.^(36,116) Fieber kann auftreten, ist jedoch in einigen Studien zufolge kein häufiges Symptom der Erkrankung.^(116,163) Unterschiede in der beobachteten Symptomatik konnten für die verschiedenen Genotypen zu diesem Zeitpunkt noch nicht belegt werden, auch wenn für Viren der Untergruppe GII.4 eine etwas längere Krankheitsdauer von im Mittel 69 h beobachtet wurde.⁽¹⁹⁸⁾

Die Virusausscheidung erfolgt über den Stuhl und das Erbrochene der Infizierten.⁽³⁶⁾ Neueste RT-PCR Studien zeigen, dass die Virusausscheidung im Stuhl im Mittel 36 Stunden, frühestens jedoch 18 und spätestens 110 Stunden nach Kontakt mit dem Erreger beginnt. Symptome treten 3-14 Stunden nach Erscheinen des Virus im Stuhl auf.⁽¹³⁵⁾ Dies entspricht einer Inkubationszeit von in etwa 20-50 Stunden, was sich mit den Angaben anderer Autoren vereinbaren lässt.^(130,196)

Die Erregerausscheidung hält im Mittel für 28 Tage (Minimum 13 Tage, Maximum 56 Tage) an.⁽¹³⁵⁾ Mehr als die Hälfte der von Atmar et al. untersuchten Patienten schieden nach 28 Tagen noch Viruspartikel aus.⁽¹³⁵⁾ Diese Ausscheidungsdauer erscheint überraschend lang, wurde doch noch 2006 von Koch et al. eine mittlere Ausscheidungsdauer von 7-14 Tagen angegeben.⁽³⁶⁾ Sie scheint sich aber mit früheren Studien zu decken, bei denen Noroviren in mehr als einem Viertel aller Fälle noch drei Wochen nach Infektion bei Erwachsenen,⁽²⁾ beziehungsweise bis zu sechs Wochen nach Infektion bei Säuglingen nachgewiesen werden konnten.⁽¹⁹⁹⁾

Im Unterschied zu anderen durch Caliciviren verursachten Infektionen, deuten alle bisherige Daten darauf hin, dass die Norovirusinfektion als eine lokale Infektion des Magen-Darm-Traktes angesehen werden kann.^(17,123,130,168) So konnten Noroviren bis zum jetzigen

Zeitpunkt nicht im Serum Infizierter nachgewiesen werden.⁽¹³⁰⁾ In Anbetracht der Tatsache, dass in *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, dass Norovirus VLPs die auf der Erythrozytenoberfläche exprimierten H Typ 2 Sekretor und Lewis HBGA Antigene binden können, rufen einige Autoren wie Hutson et al.⁽¹³⁰⁾ jedoch dazu auf, die Möglichkeit einer systemischen Norovirusinfektion genauer zu untersuchen.

1.7 Die Noroviruserkrankung in comorbidien Patienten

Lopman et al. stellten 2003 die Annahme in Frage die Norovirusinfektion sei eine triviale Erkrankung.⁽²⁰⁰⁾ Tatsächlich gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Norovirusinfektionen in bereits geschwächten Patienten, so zum Beispiel Patienten in stationärer klinischer Behandlung, einen ernsthafteren klinischen Verlauf nehmen können als dies in der Normalpopulation der Fall ist. Besonders für immunsupprimierte Patienten konnten eine Dauerausscheidung des Virus begleitet von einer chronischen Diarröh festgestellt werden. Es wurde eine Dauer der Symptome von mehr als zwei Jahren beschrieben und eine Besserung trat erst unter Zurücknahme der Immunsuppression ein.^(201,202)

Bei alten, kardiovaskulär erkrankten, immunsupprimierten und transplantierten Patienten findet sich das höchste Risiko eines adversen klinischen Verlaufs.⁽²⁰³⁾ Kinder und Senioren können durch den starken Flüssigkeits- und Elektrolytverlust lebensbedrohlich gefährdet werden.⁽³⁶⁾ Patienten über dem 65. Lebensjahr leiden zudem signifikant länger an Diarröen, was die Problematik des Flüssigkeits- und Elektrolytverlusts verschärft.⁽²⁰³⁾ Bei Kleinkindern und pflegebedürftigen Menschen kann es durch die Induktion von Erbrechen beim Essen zu schwerwiegenden Aspirationspneumonien kommen.⁽³⁶⁾ Für Patienten die unter einer schweren Mukositis nach Chemotherapie leiden wurden Komplikationen einer Norovirusinfektion bis hin zum akuten Abdomen beschrieben.⁽³⁶⁾

Ein Anstieg des Kreatininwertes um bis zu 35%, sowie erhöhte CRP Werte (im Mittel 6,85 mg/dl) wurden bei nephrologisch und kardiologisch erkrankten Noroviruspatienten beobachtet. Die Gabe von Immunsuppressiva wurde in beiden Fällen als Risikofaktor für gestiegene Werte identifiziert.⁽²⁰³⁾ Bei etwa einem Zehntel der Patienten nahmen die Serumkaliumwerte um mehr als 20% ab. Ein besonderes Risiko hierfür bestand bei kardiovaskulär erkrankten und nierentransplantierten Patienten. Bei einem Patienten wurde dadurch eine Kardioversion nötig.⁽²⁰³⁾

Besonders interessant ist, dass bei knapp 17% der Patienten einer Studie ein Rezidiv der Noroviruserkrankung nach mehr als 48 Stunden Symptomfreiheit beobachtet werden

konnte.⁽²⁰³⁾ Weitere Fälle in denen solch ein Rezidiv beobachtet werden konnte existieren in der Literatur nicht.

Auch psychische und körperliche Stresssituationen wurden mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht. So führte eine Norovirusinfektion bei in Afghanistan stationierten Soldaten zu solch ungewöhnlichen Symptomen wie Nackensteifigkeit, Lichtempfindlichkeit, Verwirrung und sogar zu disseminierter intravasaler Koagulation.⁽²⁰⁴⁾

1.8 Therapie

Die Therapie der Norovirusgastroenteritis erfolgt vor allem symptomatisch und konzentriert sich auf eine ausreichende Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution. Der Einsatz von Antiemetika scheint klinisch nicht von Nutzen. Eine spezifische virostatiche Therapie existiert zu diesem Zeitpunkt ebenso wenig wie eine Impfung.

Bei immunsupprimierten Patienten ist eine Verminderung der Immunsuppression zu überdenken. Bei Patienten die an einer schweren Mukositis, zum Beispiel im Verlauf einer Chemotherapie, leiden, ist zur Vermeidung eines akuten Abdomens eine konservative Therapie mit Nahrungskarenz bei parenteraler Ernährung und unter Flüssigkeitssubstitution zu empfehlen.^(36,130)

So ist die beste Therapie die Infektionsprävention, welche vor allem durch häufiges und gründliches Händewaschen sowie das Desinfizieren von Oberflächen mit einer 5-10% chlorhaltigen Lösung erreicht werden kann. Auch sollten infizierte Personen in Anbetracht der lang anhaltenden Erregerausscheidung bis zu drei Wochen nach Ausklingen der Symptome keine Speisen für Andere zubereiten.^(116,130)

1.9 Epidemiologie

Wie neuere epidemiologische Studien zeigen, ist das Norovirus der wichtigste Erreger akuter viraler Gastroenteritiden weltweit.^(2,3,5-9) Die Anzahl der Norovirusinfektionen hat in den letzten Jahren stark zugenommen,^(23,142-148) Dies scheint nicht nur auf einer Intensivierung und Verbesserung der Diagnostik zu beruhen, sondern vor allem auf einer global erhöhten Prävalenz von Noroviren der Genogruppe II, vor allem der Stämme des Genotyps GII.4.^(23,142,146-149) Ein weiterer Anstieg der Erkrankungsfälle wird vorausgesagt.⁽¹⁵⁰⁾ Bereits bei Kindern von bis zu fünf Jahren konnte durch Seroprävalenzstudien gezeigt

werden, dass 70-80% mit Noroviren in Kontakt gekommen sind.⁽¹⁵¹⁾ Bis zum 15. Lebensjahr erhöht sich der Anteil auf fast 100%.⁽¹⁵²⁾ Es wird davon ausgegangen, dass dies weltweit zutrifft.⁽¹⁰⁾

Detektionsmethoden für Noroviren variieren zwischen einzelnen Laboratorien stark. Oftmals sind neuere Detektionsmethoden nur in staatlichen Referenzlaboratorien vorhanden und selbst diese sind aufgrund der genetischen Vielfalt der Noroviren nicht in der Lage alle vorhandenen Stämme zu detektieren. Zudem beruhen viele Daten auf Schätzungen und Hochrechnungen kleinerer Studien. Dies erschwert den Vergleich und die Auswertung epidemiologischer Daten zur Prävalenz der Noroviren.

Es kann davon ausgegangen werden, dass viele kleinere Studien die tatsächliche Prävalenz der Noroviren unterschätzen. Besonders die geringe Viruslast in fäkalen Ausscheidungen, das Vorhandensein von Reverse Transkriptase-Inhibitoren im Stuhl, sowie eine wenig effiziente RNA-Extraktion dürften zu einem hohen Anteil an falsch-negativen Testergebnissen führen.^(10,153)

Das CDC veröffentlichte 2008 einen Übersichtsartikel, der 235 RT-PCR Studien zur Prävalenz von Noroviren auswertete und somit die besten derzeit erhältlichen Daten zur globalen Prävalenz von Noroviruserkrankungen liefert.⁽¹⁰⁾ Diesem Artikel zufolge werden rund 12% aller leichten und mittelstarken Durchfallerkrankungen weltweit und in allen Altersgruppen durch Noroviren verursacht.

Es wird angenommen dass Durchfallerkrankungen weltweit bei Kindern zu etwa 1,8 Millionen Todesfällen jährlich führen.⁽¹⁵⁴⁾ In dieser Altersgruppe sind etwa 12% der Gastroenteritiden mit schwerem Verlauf von Noroviren verursacht. Interessanterweise ist dieser Anteil sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern gleich bleibend. Dies macht Noroviren, nach den Rotaviren, zum zweitwichtigsten Erreger der akuten Gastroenteritis des Kindes.⁽¹⁰⁾

Aufgrund der derzeitigen Studienlage wird geschätzt, dass Noroviren in Entwicklungsländern jährlich etwa 1,1 Millionen Krankenhausaufenthalte und 218.000 Todesfälle von Kindern unter 5 Jahren verursachen, wohingegen in Industrieländern etwa 64.000 Krankenhausaufenthalte und 900.000 Arztbesuche pro Jahr auf den Erreger zurückzuführen sind.⁽¹⁰⁾

Im Bereich der Erwachsenenmedizin schätzte das CDC auf der Grundlage einer Studie von Mead et al. aus dem Jahre 1999, dass in den USA allein jährlich im Mittel etwa 23 Millionen Menschen an Noroviren erkranken.^(11,72) Die selbe Studie zitierte Zahlen, nach denen 67% aller akuten Gastroenteritiden bekannter Ursache, 50 000 dadurch bedingte

Krankenhausaufenthalte pro Jahr und 7% aller durch Diarrhö verursachten Todesfälle auf Noroviren zurückzuführen sind.⁽¹¹⁾

Die Zahl der sporadischen, nicht mit einem Ausbruch in Verbindung zu bringenden akuten Gastroenteritiden, die durch Noroviren ausgelöst werden, wird in der Schweiz auf 17,9%,⁽¹²²⁾ in England auf 13%⁽¹⁵⁵⁾ und in den Niederlanden auf 17%⁽¹⁵⁶⁾ geschätzt. Dies macht die Noroviren zum häufigsten Erreger sporadischer Gastroenteritiden.⁽²⁾

Stark von diesen Zahlen abzugrenzen sind solche epidemiologischen Daten, die sich auf epidemische Gastroenteritiden beziehen. Je nach Patientenkollektiv steigt hier der Anteil der Noroviren auf bis zu über 90% bei nicht bakteriell verursachten Gastroenteritisausbrüchen. Werden alle Erregergruppen einbezogen, sind etwa 50% der epidemisch auftretenden Gastroenteritiden weltweit, sowie etwa 50% der durch Lebensmittelkontamination übertragenen epidemischen Gastroenteritiden in den USA durch Noroviren verursacht.^(10,11,40,150)

Wie diese Zahlen deutlich machen, sind Noroviren die wohl wichtigsten viralen Erreger von durch Lebensmittel übertragenen Gastroenteritiden weltweit.^(3,4) Schätzungen zufolge sind in etwa 32-42% aller Norovirusinfektionen in den USA auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen.⁽¹¹⁾ Die Anzahl der Norovirusinfektionen, die über Kontakt mit Infizierten übertragen werden, wird allgemeinhin auf etwa 12% geschätzt. Etwa 3% werden durch kontaminiertes Trinkwasser übertragen.^(17,18,123,157-159) Neuere, zwischen 2001 und 2006 erhobene Zahlen aus Europa, weichen jedoch stark von diesen Werten ab. So waren nur etwa 10% der Gastroenteritisausbrüche von kontaminierten Lebensmitteln ausgegangen, während 88% auf direkten Kontakt mit Infizierten und etwa 2% auf verunreinigtes Wasser zurückzuführen waren.⁽¹⁴⁵⁾

Für diese Diskrepanz könnten zwei Gründe verantwortlich sein: Zum Einen betrachten die erstgenannten Zahlen alle Norovirusinfektionen, eingeschlossen der sporadischen, während die europäische Studie nur Daten aus Ausbrüchen analysierte. Zum Zweiten stammen die europäischen Daten aus dem Zeitraum 2001-2006, während die erstgenannten Zahlen Datensätzen entstammen, die vor dem Jahr 2000 gesammelt wurden. Dieser Unterschied ist bedeutsam, zeigen doch neueste Untersuchungen, dass die seit 2000 pandemisch aufgetretenen GII.4 Virusstämme signifikant häufiger von Mensch-zu-Mensch übertragen werden, während dies bei Virusstämme der Genogruppe I vorzugsweise über kontaminierte Lebensmittel geschieht. Weitere Daten zeigen, dass der hohe Anteil der GII.4 Viren an der viralen Gesamtpopulation ein relativ neues Phänomen ist.⁽¹⁴⁵⁾ In anbetracht dieser Datenlage kann die These aufgestellt werden, dass die Mensch-zu-Mensch Übertragung der Noroviren

in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen haben könnte. Träfe dies zu, wäre dies für die vorliegende Studie relevant, da die Bedeutung die Infizierten Reiserückkehrern bei der Weiterverbreitung des Virus zukommt in den letzten Jahren zugenommen haben könnte.

Bei genauerer Betrachtung von Lebensmittelinfektionen stellt sich auch die Frage nach dem Anteil der Koinfektionen, sowohl mit bakteriellen als auch viralen Erregern und Noroviren verschiedenen Typs. So fand eine koreanische Studie, dass 35% der Noroviruserkrankten auch an einer Rotavirusinfektion litten, 7% litten an einer Koinfektion mit Adenoviren und 2% an einer Koinfektion mit Salmonellen. Insgesamt waren 41% aller Norovirusinfizierten Träger eines zweiten oder dritten enteropathogenen Keimes.⁽¹⁶⁰⁾ Auch eine Studie an Reisenden nach Mexiko stellte bei 32% der Erkrankten eine Koinfektion mit enterotoxischen *Escherichia Coli* fest.⁽⁴⁵⁾ Erst kürzlich wurde über Koinfektionen von Noroviren und humanen Bocaviren berichtet.^(161,162) In Europa scheint die Rate der Koinfektionen jedoch bedeutend niedriger zu liegen. So zeigte eine Analyse der Noroviruserkrankungen der Jahre 2001-2006 aus 13 europäischen Ländern, dass nur in etwa 2% aller Fälle einer Norovirusinfektion eine Koinfektion mit einem anderen Pathogen vorlag.⁽¹⁴⁵⁾ Im Vergleich hierzu sind Koinfektionen mit Noroviren verschiedener Genotypen häufig und, wie bereits erwähnt, mit dem Konsum von Austern assoziiert.⁽¹⁶³⁾ In den meisten epidemischen Norovirusausbrüchen kann jedoch in der Regel nur ein dominanter Genotyp nachgewiesen werden.⁽⁹³⁾

Interessant ist die jahreszeitliche Häufung der Noroviruserkrankungen.

Norovirusgastroenteritiden treten vor allem in den Wintermonaten vermehrt auf,^(36,97,164) eine Tatsache, die Anlass zum historischen Namen der Erkrankung, erstmals beschrieben als „winter vomiting disease“, gab.⁽¹⁶⁵⁾ Es konnte jedoch in einem 2008 erschienenen Artikel gezeigt werden, dass dieser „Wintergipfel“ fast ausschließlich von einer Zunahme der Ausbrüche durch Viren des Stammes GII.4 verursacht wird.⁽¹⁴⁵⁾ Noroviren des Stammes GII.4 treten überdurchschnittlich vermehrt in den Wintermonaten auf. Andere Stämme der Genogruppe II zeigen diese jahreszeitlichen Schwankungen wesentlich weniger stark ausgeprägt. Noroviren der Genogruppe I treten ganzjährlich ohne saisonale Häufung der Ausbrüche auf.⁽¹⁴⁵⁾

Viren des Typs GII.4 zeigen auch andere epidemiologische Auffälligkeiten. So werden Ausbrüche in Krankenhäusern bis zu neunmal häufiger von GII.4 Viren ausgelöst als von Viren der Genogruppe I, welche dafür häufiger als GGII Viren in Kindertagesstätten und Schulen nachgewiesen werden können.⁽¹⁴⁵⁾ Wie bereits erwähnt, werden GII.4 Viren signifikant häufiger durch Mensch-zu-Mensch Übertragung verbreitet als Viren der Genogruppe I und es konnte gezeigt werden dass ein Gastroenteritisausbruch, der mittels

Personenkontakt übertragen wird, fast doppelt so häufig von GII.4 Viren ausgelöst wird wie von Viren der Genogruppe I.⁽¹⁴⁵⁾

Auch die globale Verteilung einzelner Virusstämme ist bei einer epidemiologischen Betrachtung von Interesse. So könnte bei genetisch so diversen und mutationsbereiten Erregern wie den Noroviren angenommen werden, dass die beobachteten Virusstämme von Land zu Land variieren sollten. Einigen neueren Studien zufolge trifft dies nicht zu. Die hohe Infektiosität einiger Genotypen führt allem Anschein nach zu einer pandemischen Ausbreitung, was besonders auf die Viren des Genotyps GII.4 zuzutreffen scheint. So waren Viren dieses Genotyps in den letzten Jahren die global und in Europa dominantesten.^(40,57,85,145,166-168) Der erste global auftretende GII.4 Stamm wurde 1995 in den USA nachgewiesen und war dort für 55% der Gastroenteritisausbrüche in der Saison 1995/96 verantwortlich.⁽¹¹⁹⁾ Später wurde er unter anderem in Brasilien, Kanada, China, Deutschland, den Niederlanden, Großbritannien und Australien nachgewiesen.⁽¹⁶⁹⁾ Im Durchschnitt erscheint seit 2002 alle zwei Jahre ein neuer GII.4 Stamm⁽¹⁴⁵⁾, womit die Evolutionsrate der Noroviren diejenige der Influenzaviren übersteigt.⁽¹⁷⁰⁾

Bull et al. schrieb 2006: "While Australia is geographically isolated in the world, phylogenetic analysis revealed that the same strains are circulating in Asia, Europe, and the Americas. [...] the majority of the NoV GII outbreak strains isolated in Australia mirror the strains causing outbreaks during similar time frames in the Northern Hemisphere."⁽¹⁰⁶⁾ Auch eine Arbeit aus Japan, die Ausbrüche in den Jahren 1997-2002 untersuchte kommt zu einem ähnlichen Schluss: „Saitama Prefecture is only 3,800 km² and ≈1% of the total area of Japan. It is surprising that this small region contained such a diversity of genotypes, including ones found in North and South America, Europe, Oceania, and Asia ."⁽⁹³⁾ Diese Daten stützen uns in unserer Annahme, dass Reisende die Weiterverbreitung von Noroviren maßgeblich fördern, indem sie Noroviren einführen die dann lokal weiterverbreitet werden. Dennoch gibt es auch solche Daten die zu belegen scheinen, dass es einige lokal dominante Genotypen gibt, die keiner globalen Verteilung unterliegen. So war der Genotyp GII.b 2001-2006 nach den GII.4, GII.2 und GII.7 Viren einer der europaweit dominierenden.⁽¹⁴⁵⁾ Beim Genotypen GII.b handelt es sich um einen eigenständigen, erst vorläufig benannten Genotypen, dessen Polymerasesequenz weltweit einzigartig ist.⁽¹⁴⁵⁾ Die Gründe für das Ausbleiben einer prompten globalen Weiterverbreitung des Genotyps GII.b sind meines Wissens nach nicht bekannt. Es bleibt zu untersuchen ob hierbei auch genetische Faktoren, wie zum Beispiel der in Europa vorherrschende HBGA Typus, eine Rolle spielen könnten.

Für Deutschland gilt, wie für andere europäische Länder auch, dass in den letzten Jahren Noroviren der Untergruppe GII.4 dominierten. Infektionen traten ganzjährlich und im Besonderen in den Wintermonaten auf. Seit der Einführung der Meldepflicht nach §7 Abs.1 Nr.34 IfSG im Jahr 2001 ist eine steigende Inzidenz zu beobachten. 2004 war die Norovirusgastroenteritis erstmals mit knapp 65.000 Erkrankungen/Jahr die häufigste nach IfSG übermittelte Erkrankung. In rund 72% der nach IfSG übermittelten Fälle erfolgte die Infektion im Rahmen eines größeren, das heißt mehr als fünf Fälle betreffenden Ausbruchs.

⁽³⁶⁾ Im Kindesalter konnte in Deutschland eine erhöhte Infektionsinzidenz bei Jungen festgestellt werden, während im Erwachsenenalter Frauen deutlich häufiger von Noroviren betroffen zu sein scheinen. ⁽³⁶⁾

Der in den Wintermonaten 2002/03 und 2004/05 beobachtete starke Anstieg der Infektionszahlen sowie der dafür verantwortliche Genotyp stimmten mit Beobachtungen aus anderen europäischen Staaten sowie Nordamerika und Australien überein. ⁽³⁶⁾ Somit ist davon auszugehen, dass die zu einem determinierten Zeitpunkt in Deutschland zirkulierenden Virusstämme den weltweit dominierenden Stämmen entsprechen.

1.10 Norovirus-Enteritis bei Reisenden

Die weltweite Präsenz des Erregers und die rasante Weiterverbreitung neuer Stämme, im Besonderen der Untergruppe GII.4, sind ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung, die Reisenden bei der Verbreitung des Virus zukommen könnte. Dennoch gibt es derzeit lediglich zwei Studien aus den Jahren 2003 und 2008, die die Weiterverbreitung von Noroviren durch Reisende untersuchten.⁽¹²⁾ Im Jahr 2002 erkrankten 450 Pflegeheimbewohner aus 29 schweizerischen Pflegeheimen während einer Pilgerfahrt nach Lourdes an einer Norovirusenteritis, mit der sich ein Teil der Gruppe im dortigen städtischen Krankenhaus infizierte. Nach ihrer Rückkehr ereigneten sich in elf der 29 Pflegeheime Norovirusausbrüche mit über 380 Sekundärfällen und einem Todesfall, die mittels Gensequenzierung allesamt auf das in Lourdes detektierte Virus zurückzuführen waren.⁽¹²⁾ Der 2008 erschienene Artikel von Verhoef et al.⁽¹³⁾ beschrieb mindestens neun weitere Norovirusausbrüche mit 130 Sekundärerkrankungen und 4 Todesfällen in Frankreich, den Niederlanden und Irland die von aus Lourdes heimgekehrten Pilgern verursacht wurden.

Wie diese Daten zeigen scheint das Potential der Weiterverbreitung von Noroviren durch Reisende und Reiserückkehrer beträchtlich. Führt man sich die globale Bedeutung der Noroviren als häufigster Erreger der aktuell häufigsten Erkrankung der Menschheit vor Augen, überrascht die schlechte Studienlage zu diesem Thema umso mehr. Während von

Noroviren verursachte Gastroenteritisausbrüche in von Reisenden besuchten Institutionen wie Hotels⁽¹⁴⁻²⁰⁾ und auf Kreuzfahrtschiffen⁽²¹⁻³²⁾ in der internationalen Literatur hinreichend gut dokumentiert sind, gibt es kaum verlässliche Daten zur Prävalenz von Noroviren bei Reisenden und keine Daten zur Prävalenz bei Reiserückkehrern. Es existiert keine umfassende Evaluation des möglichen Gefährdungspotentials der öffentlichen Gesundheit durch diese Population. Drei der lediglich vier verfügbaren Studien zur Prävalenz von Noroviren bei Reisenden wurden in den späten 1970er und 80er Jahren durchgeführt und siedelten mittels Radioimmunoassay die Prävalenz der Viren bei Reisenden zwischen 5 und 15% an.^{(33) (34) (35)} Heutzutage gilt jedoch die RT-PCR als Goldstandard der Norovirusdiagnostik⁽³⁶⁾, was sich bereits seit Beginn der neunziger Jahre abzeichnete.^(37,38) Es konnte in zahlreichen neueren Studien belegt werden, dass Sensitivität und Spezifität der RT-PCR weit über der der Radioimmunoassays anzusiedeln sind.⁽³⁹⁻⁴⁴⁾ Umso überraschender ist es, dass bis heute lediglich eine Studie aus dem Jahr 2005 die Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei Reisenden mittels eines RT-PCR-Nachweises erfasst hat.⁽⁴⁵⁾ Sie konnte bei den 34 untersuchten Patienten mit Reisediarrhoe einen Norovirusanteil von 65% belegen.⁽⁴⁵⁾ Allerdings wurden in dieser Studie ausschließlich US-amerikanische Studenten untersucht, die sich zu Kursen (Sprachkurse, summer schools) in Mexiko und Guatemala aufhielten. Dennoch legen diese Daten eine außerordentlich hohe Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei Reisenden nahe und deuten darauf hin, dass möglicherweise ein hoher und für die öffentliche Gesundheit relevanter Anteil an Reiserückkehrern mit Diarröhö unter einer Norovirusgastroenteritis leidet.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Risiko an einer Diarröh zu erkranken ist bei Reisenden gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöht⁽²¹¹⁾, insbesondere bei Reisen in Länder mit niedrigem Hygienestandard⁽²¹²⁻²¹⁶⁾. Mehr als 20% der Reisenden nach Südasien, dem Mittleren Osten, Lateinamerika, Nordafrika und ins tropische Afrika erkranken an einer Reisediarröh. Bei Reisenden nach Russland, Südafrika oder Zentralasien liegt der Anteil immer noch bei 15-20%. Reisen nach Europa, Nordamerika, Japan oder Australien bergen das geringste Risiko an einer Reisediarröh zu erkranken.⁽²¹²⁻²¹⁶⁾ In mehr als der Hälfte aller Fälle bleibt die Ursache einer solchen Diarröh trotz mikrobiologischer Stuhldiagnostik ungeklärt,⁽²¹⁷⁾ was einen hohen Anteil an nicht routinemäßig detektierten Erregern wie Noroviren nahe legt. Erste Daten zur Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei Reisenden nach Mexiko⁽⁴⁵⁾ deuten in diese Richtung. Bislang liegen jedoch nur wenige Daten zur Bedeutung von Noroviren als Ursache einer Reisediarröh und zur epidemiologischen Bedeutung von Reisenden für die Verbreitung von Noroviren vor.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher die Prävalenz von Norovirus-Infektionen bei verschiedenen Gruppen von Reisenden mit und ohne Durchfallerkrankungen zu untersuchen mit dem Ziel Aussagen zu folgenden Fragen zu treffen:

1. Wie häufig sind Norovirusinfektionen bei an Diarröh leidenden Reiserückkehrern?
2. Wie häufig sind Norovirusinfektionen bei einer Kontrollgruppe von nicht an Diarröh leidenden Reiserückkehrern?
3. Wie ist die Verteilung verschiedener Genogruppen?
4. Wie ist die Häufigkeit von Norovirusinfektionen in Abhängigkeit von den Reisedestinationen, wie ist das Krankheitbild, wie der Verlauf?
5. Ist gegebenenfalls mit einer Gefährdung der öffentlichen Gesundheit durch mit Noroviren infizierte Reiserückkehrer zu rechnen?

Hierzu sollten zunächst eine Norovirus-PCR sowie Frage- und Dokumentationsbögen zur Erfassung von anamnestischen und klinischen Daten bei erkrankten Reiserückkehrern etabliert werden. Hiermit sollten mindesten 100 Reiserückkehrer mit Durchfallerkrankungen während und/oder nach der Reise untersucht werden, sowie eine Kontrollgruppe von mindestens 50 Reiserückkehrern ohne Durchfallerkrankung.

3 Methoden

3.1 *Einschlusskriterien und Probenauswahl*

Alle Stuhlproben und Daten stammten von Rückkehrern von Auslandsreisen, die als Patienten die poliklinische Ambulanz der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin des Klinikums der Universität München aufsuchten. Es wurde nur Proben- und Datenmaterial von Patienten verwendet, die ihr schriftliches Einverständnis hierzu erklärt hatten bzw. von Minderjährigen, bei denen dies durch die Erziehungsberechtigten erfolgte. Der Wortlaut der schriftlichen Information und der Einverständniserklärung war der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München vorgelegt und von dieser so genehmigt worden.

Stuhlproben für eine Studiengruppe und eine Kontrollgruppe wurden in drei Phasen gesammelt. In der ersten Phase von Anfang August 2006 bis Ende Januar 2007 wurden 113 Stuhlproben gesammelt, die der Studiengruppe zugeordnet wurden. Gesammelt wurden nur solche Proben, die ‚ungeformt‘ waren, wobei gemeint ist, dass es sich um Proben handelte, die die Form des Probengefäßes angenommen hatten. Am Tag der Probenasservierung war dem Untersucher weder der Reise- bzw. Aufenthaltsort noch die weitere Symptomatik oder Anamnese des Patienten bekannt. Lediglich Patientename, Alter, Geschlecht, sowie eine zugeordnete Labornummer wurden zur späteren Datenauswertung notiert. Es wurden jeweils alle der Definition gemäßen Proben eines Tages asserviert. Die Probenasservierung erfolgte jeweils nach Ende des regulären Arbeitsbetriebes von Montag bis Donnerstag jeder untersuchten Woche. Stuhlproben des Routineelabors wurden Freitags nach Ende des Dienstschlusses entsorgt, womit eine Asservierung in der Regel nicht möglich war.

Alle Stuhlproben die während der zweiten und dritten Asservierungsphase gesammelt wurden, sind der Kontrollgruppe dieser Studie zugeordnet. Es handelte sich dabei um insgesamt 73 Proben. 39 Proben wurden von September 2006 bis Juni 2007 gesammelt, weitere 34 Proben zwischen Januar und Mai 2008. Auch diese Proben entstammten dem Routineelabor der Abt. für Infektions- und Tropenmedizin, die Asservierung erfolgte wie beschrieben. Es wurden nur Proben von solchen Patienten gesammelt, die im Anamnesegespräch mit dem Arzt angegeben hatten seit mindestens zwei Wochen nicht bzw. nicht mehr unter gastrointestinalen Symptomen, einschließlich einer Diarröh, gelitten zu haben. Des Weiteren durften die Patienten vor nicht mehr als 14 Tagen von ihrer letzten Reise zurückgekehrt sein.

Anhand der Labornummer wurden die im Computersystem protokollierten klinischen Daten den jeweiligen Patienten zugeordnet. Dabei wurden all jene Patienten von der statistischen Auswertung ausgeschlossen für die es keinen validen Dateneintrag im Computersystem der Tropenmedizinischen Ambulanz gab. Dies betraf acht Proben der Studiengruppe die zur Testung von Hausarztpraxen zugesendet worden waren. 19 der 39 zwischen September 2006 und Juni 2007 gesammelten Proben von Patienten der Kontrollgruppe wurden nach erfolgter Zuordnung der klinischen Daten ebenfalls von der statistischen Testung ausgeschlossen, da sich nach Auswertung der Computerdaten herausstellte, dass sie die Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe (Rückkehr von der letzten Reise nicht mehr als 14 Tage vor Besuch der Tropenmedizinischen Ambulanz sowie keine gastrointestinale Symptomatik für mindestens zwei Wochen vor besagtem Arzttermin) nicht oder nur teilweise erfüllten. In einer zweiten Phase wurden weitere 34 Proben für eine Kontrollgruppe gesammelt. Von dieser erfüllten auch nach Zuordnung elektronisch erfasster Patientendaten alle die Einschlusskriterien.

Somit verblieben zur statistischen Auswertung 105 Proben in der Studiengruppe und 47 Proben in der Kontrollgruppe. Die Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung nach Zuordnung der im Computersystem erfassten Patientendaten in zwei Kollektive unterteilt. Der Studiengruppe 1 wurden all jene Patienten zugeordnet die sich zum Zeitpunkt des Aufsuchens der Tropenmedizinischen Ambulanz (protokolliert durch die Vergabe der Patientenkennung) seit weniger als 14 Tagen nach erfolgter Reise wieder in Deutschland befanden. Alle restlichen Patienten der Studiengruppe wurden dem Kollektiv „Studiengruppe 2“ zugeordnet.

Ziel dieses Verfahrens war es zwei vergleichbare Kollektive zu erhalten, deren Daten während des gleichen Zeitraumes und zu gleichen Konditionen gesammelt wurden. Die Studiengruppe 1 sollte zum Zweck einer sinnvollen statistischen Auswertung Patienten umfassen, deren symptomatische Durchfallerkrankung im Falle eines Norovirus positiven Testergebnisses mit der Reise in Verbindung zu bringen war. Grundlage für die Wahl eines 14 tägigen Zeitraumes nach Rückkehr aus dem Urlaubsland als Einschlusskriterium war eine Studie die zeigte, dass die Inkubationszeit einer Norovirusgastroenteritis im Maximalfall 110 Stunden beträgt, zu welchem Zeitpunkt die Virusausscheidung im Stuhl beginnt, und maximal weitere 20 Stunden vergehen können bevor Symptome einsetzen.⁽¹³⁵⁾ Somit sind die ersten Symptome einer Norovirusgastroenteritis bei einigen Patienten erst fünf einhalb Tage nach dem Infektionszeitpunkt erfassbar. Für die häufigen GII.4 Infektionen wurde die Symptombauer mit im Mittel 69 Stunden angegeben, deutlich längere Verläufe wurden jedoch beschrieben.⁽¹⁹⁸⁾ Somit können Patienten mehr als acht Tage nach Reiserückkehr an

einer symptomatischen Norovirusinfektion leiden die während der Reise erworben wurde. Da die Virusausscheidung im Stuhl nach Ende der Symptome noch für mindestens sieben bis vierzehn Tage erfolgt⁽³⁶⁾ und Symptome nicht immer abrupt enden, erschien es uns sinnvoll den Zeitraum in dem wir ein norovirus positives Testergebnis bei einem nach unserer Definition (ungeformter Stuhl) symptomatischen Patienten als unter Umständen mit der Reise in Verbindung stehend betrachten auf 14 Tage auszuweiten. Somit umfasste Studiengruppe 1 solche Patienten deren symptomatische Noroviruserkrankung unter Umständen mit einer Reise in Verbindung zu bringen war. Studiengruppe 2 umfasste solche Patienten bei denen es äußerst unwahrscheinlich war, dass eine symptomatische Noroviruserkrankung mit ihrer letzten Reise in Verbindung zu bringen war.

Bei der statistischen Auswertung konnten somit drei Patientengruppen unterschieden werden: eine Studiengruppe 1 mit 57 Patienten deren symptomatische Noroviruserkrankungen aller Wahrscheinlichkeit nach mit ihrer letzten Reise in Verbindung stehen, eine Studiengruppe 2 mit 48 Patienten deren symptomatische Noroviruserkrankungen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mit ihrer letzten Reise in Verbindung stehen, sowie eine Kontrollgruppe von 47 Patienten, deren asymptomatische Noroviruserkrankungen möglicherweise mit ihrer letzten Reise in Verbindung stehen.

3.2 Probenaufbereitung

Stuhlproben wurden nach einer in der Literatur belegten Methode^(43,71,205-210) als 20% Suspension in am Routinelabor der Tropenmedizinischen Ambulanz standardmäßig eingesetztem Nuklease-freiem Wasser bei -80°C asserviert.

Die Extraktion der viralen RNA erfolgte am Tag der RT-PCR Testung im Routinelabor für Norovirusdiagnostik des „Landesamtes für Gesundheitsschutz und Lebensmittelsicherheit Oberbayern“. Für die Extraktion wurde die 20%ige Stuhlsuspension mit Nuklease-freiem Wasser auf 10% verdünnt und zehn Minuten bei 3500g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die RNA Extraktion mit Hilfe des „MicrolabStar“ Extraktionsroboters der Firma Hamilton (Bonaduz, Schweiz) genutzt. Die hierzu verwendeten Reagenzien waren im QiAmp biorobot kit der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) enthalten und wurden den Angaben des Herstellers folgend verwendet.

3.3 RT-PCR Testung

Die Proben wurden mittels einer qRT-PCR auf Noroviren der Genogruppen I und II getestet. Dabei wurde das Protokoll der am Landesamt für Gesundheitsschutz und Lebensmittelsicherheit Oberbayern etablierten Standardmethode zur Norovirusdetektion befolgt.

Der Mastermix wurde mit den im Qiagen One Step RT-PCR Kit enthaltenen Reagenzien erstellt. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt. Die benutzten Primer waren: NV 192, NV 193 sowie Probe TM8 für die Detektion der Noroviren der Genogruppe I; und NV 107a, NV 117 und Probe TM3 für die Detektion der Noroviren der Genogruppe II (siehe Tabelle 1 für die verwendeten Primersequenzen). Die benutzten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Zwei separate qRT-PCR-Tests wurden je Probe durchgeführt, eine Testung erfolgte für den Nachweis der Viren der Genogruppe I ein zweiter für den Nachweis der Viren der Genogruppe II. Der Referenzfarbstoff der real-time RT-PCR war „ROX“ von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Je 5µl Probe wurde mit 20µl Mastermix gemischt, um ein Gesamtreaktionsvolumen von 25µl zu erreichen.

Tabelle 1: In der qRT-PCR verwendete Primersequenzen:

NV 192	5'- gC (CT) ATg TTC CgC Tgg ATg C-3'
NV 193	5'- CgT CCT TAg ACg CCA TCA TCA -3'
TM8 Probe	5'- FAM - Tgg ACA gg(Ag) gAT CgC (Ag)AT CTC CTg C- 3' - TMR
NV 107a	5'- AgC CAA TgT TCA gAT ggA Tg -3'
NV 117	5'- TCg ACg CCA TCT TCA TTC AC -3'
TM3 Probe	5' - FAM - Tgg gAg ggC gAT CgC AAT CTg gC - 3' - TMR

Die rtRT-PCR verwendete folgendes Thermoprofil:

Gesamtzahl der Zyklen: 45

Phase 1: 30 Sekunden bei 50°C

Phase 2: 15 Sekunden bei 95°C

Phase 3: 15 Sekunden bei 94°C

Im letzten Durchlauf der Reaktion wurde die Phase 3 durch 60 Sekunden bei 56°C ersetzt.

Die Reaktionszeit betrugt insgesamt 2 Stunden und 31 Minuten

3.4 Erhobene Daten und Statistische Auswertung

Die folgenden Daten wurden zur weiteren statistische Auswertung im Moment der Probenasservierung erhoben:

- Labornummer der Probe
- Geschlecht des Patienten
- Geburtsdatum
- Datum der Registrierung in der Tropenmedizinischen Ambulanz
- Datum der Probenasservierung

Wie bereits beschrieben wurden nach erfolgter PCR-Testung jeder Probe die klinischen Daten des Patienten zugeordnet. Die so registrierten Daten umfassten:

- Datum der Rückkehr von der letzten Reise des Patienten
- Dauer der Reise
- Reiseart
- Reiseziel
- Die Dauer der Durchfallsymptomatik
- Medikation
- Diagnose
- Das Vorhandensein und die Dauer anderer erfasster Symptome darunter:
 - o Erbrechen
 - o Übelkeit
 - o Bauchkrämpfe
 - o Flatulenz oder Blähungen
 - o Müdigkeit
 - o Kopfschmerz
 - o Muskel- und Gliederschmerz
 - o Neurologische Symptome
 - o Atemnot
 - o Kardiovaskuläre Symptome

Daten zur Symptomatik und der Diagnose wurden dabei nur bei Patienten der Studiengruppe gesammelt.

Basierend auf diesen Daten wurden folgende Variablen für eine weitere statistische Auswertung berechnet:

- Alter im Moment der Untersuchung

- Die Zeitspanne zwischen der Reiserückkehr und der Registrierung in der Tropenmedizinischen Ambulanz in Tagen.

Daten zum Reiseziel, der Reiseart und der Dauer der Reise wurden für die Studiengruppe 2 zwar gesammelt, aber nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen, da Norovirusinfektionen dieser Patientengruppe wie später ausgeführt, nicht mit einer Reise in Verbindung stehen konnten.

Die für diese Studie verwendeten Stuhlproben wurden entsprechend dem Routineprotokoll des Labors der Tropenmedizinischen Ambulanz und der medizinischen Notwendigkeit auf weitere Erreger untersucht. Dies geschah unabhängig von dieser Studie. Die so erhaltenen Daten wurden nicht in eine statistische Auswertung mit einbezogen, da sie nicht im Rahmen eines zu Zwecken der Studie ausgearbeiteten Protokolls erhoben wurden.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 13.0 für Windows "student version", sowie Standardanwendungen des Microsoft Office Programm Excel Version 2003.

4 Ergebnisse

Diese Studie untersuchte ein Patientenkollektiv von 152 Personen, von denen 83 männlichen Geschlechts waren. 105 dieser Versuchspersonen litten an Diarröh und wurden je nach Reiseanamnese der Studiengruppe 1 oder der Studiengruppe 2 zugeteilt.

Die Studiengruppe 1 zählte 57 Patienten, die nicht länger als 14 Tage vor ihrem Besuch in der Tropenmedizinischen Ambulanz von einer Reise zurückgekehrt waren.

Die Studiengruppe 2 umfasste 48 Patienten, die sich am Tag ihrer Vorstellung in der Tropenmedizinischen Ambulanz bereits seit mehr als zwei Wochen wieder in Deutschland befanden.

Es existierte eine Kontrollgruppe von 47 Patienten, die während mindestens den letzten 14 Tagen nicht an Diarröh gelitten hatten und deren Reiserückkehrdatum nicht länger als 14 Tage zurück lag.

Patienten zwischen vier und 80 Jahren wurden untersucht. Der Altersdurchschnitt lag bei $39,66 \pm 15,056$ Jahren. Das Durchschnittsalter unterschied sich nicht signifikant zwischen den Studiengruppen ($p=0,056$; one-way Anova Test) und betrug in den Studiengruppen 1 und 2, sowie der Kontrollgruppe je $38,70 \pm 15,697$, $43,77 \pm 15,225$ und $36,62 \pm 13,382$ Jahre. Der Geschlechteranteil war in allen drei Gruppen vergleichbar ($p= 0,741$; chi-quadrat Test). Die mittlere Reisedauer war in der Studiengruppe 1 und der Kontrollgruppe vergleichbar ($p= 0,949$ one-way Anova Test), und betrug $68,51 \pm 166,192$, respektive $71,24 \pm 266,104$ Tage.

Von 152 Patienten litten 17 (11,84%) an einer chronischen Krankheit, von denen wiederum drei an mehr als einer chronischen Krankheit litten, 123 (80,92%) gaben an unter keiner ihnen bekannten chronischen Krankheit zu leiden und 12 (7,89%) machten keine Angaben zu dieser Frage. Zwölf der chronisch kranken Patienten befanden sich in der Studiengruppe 2, unter ihnen alle an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leidenden Patienten (vier an der Zahl) und alle Fälle von Zöliakie (zwei). In der Studiengruppe 1 fanden sich hingegen nur zwei chronisch erkrankte Patienten, in der Kontrollgruppe waren dies drei. So überrascht es nicht, dass die Zahl der chronisch erkrankten Patienten sich in der Studiengruppe 1 und 2 signifikant ($p=0,001$, chi-Quadrat Test) unterschied.

Noroviren konnten bei elf der 152 (5,9%) Patienten dieser Studie nachgewiesen werden, zehn Fälle bei an Diarröh erkrankten Patienten, ein Fall in der Kontrollgruppe. Somit waren von den an Diarröh leidenden Patienten 9,5% an einer Norovirusinfektion erkrankt. Acht der

zehn positiv auf Noroviren getesteten Stuhlproben stammen von Patienten, die innerhalb der ersten fünf Tage nach Reiserückkehr bei uns vorstellig wurden. Eine weitere positive Stuhlprobe wurde neun Tage nach Reiserückkehr abgegeben. Die letzte positiv auf Noroviren getestete Stuhlprobe in der Gruppe der an Diarrhöe Erkrankten wurde von einem Patienten eingereicht, der angab nicht verreist gewesen zu sein und seit etwa sechs Monaten an Durchfall zu leiden. In der Kontrollgruppe konnte eine Norovirusinfektion detektiert werden.

In der Studiengruppe 1, also bei jenen Patienten die seit nicht mehr als 14 Tagen wieder in Deutschland waren, lag die Rate der Noroviruserkrankungen bei 15,7%. In der Studiengruppe 2 lag sie hingegen nur bei 2,1%, was dem Anteil der Kontrollgruppe entsprach.

Insgesamt wurden sieben Fälle von GGII Infektion in der Studiengruppe 1, je einer in der Studiengruppe 2 und der Kontrollgruppe, sowie eine GGI/GGII Koinfektion in der Studiengruppe 1 und eine GGI Infektion, ebenfalls in der Studiengruppe 1, detektiert.

Die Zahl der Norovirusinfektionen war in der Studiengruppe 1 signifikant höher als in der Studiengruppe 2 ($p=0,017$, chi-Quadrat Test) und der Kontrollgruppe ($p=0,019$, chi-Quadrat Test). Wie zu erwarten, war kein signifikanter Unterschied in der Infektionshäufigkeit zwischen der Studiengruppe 2 und der Kontrollgruppe nachzuweisen ($p=0,988$, chi-Quadrat Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Infektionsrate bei Frauen und der bei Männern festgestellt werden ($p=0,210$, chi-Quadrat Test). Die Wahrscheinlichkeit bei Diarrhö an einer Noroviruserkrankung zu leiden war in der Studiengruppe 1 signifikant höher als in der Studiengruppe 2 ($OR=8,813$).

Die bei Durchfallerkrankten am häufigsten gestellte Diagnose in dieser Studie war „Enteritis ohne Erregernachweis“. Sie wurde in 59 Fällen gestellt, was mehr als der Hälfte aller untersuchten Diarrhöen entsprach (56,19%). Bei 29 an Durchfall erkrankten Patienten der Studiengruppen 1 und 2 (27,62%) wurden andere Enteropathogene diagnostiziert (Tabelle 2). In der Studiengruppe 1 war dies bei 14 Patienten (24,56%) und in der Studiengruppe 2 bei 15 Patienten (31,25%) der Fall.

Weitere Diagnosen waren: unspezifischer Virusinfekt (4), Divertikulose (1), Fieber unbekannter Ursache (1), Colitis ulcerosa (1), Hepatitis (2), Polyneuritis (1) und Tumor Verdacht (1). Ein Patient wurde als gesund deklariert, bei drei weiteren Patienten wurde keine Diagnose gestellt.

Tabelle 2: Diagnostizierte Enteropathogene

Erreger	Studiengruppe 1: n=57	Studiengruppe 2: n=48
Blastocystis hominis	7 (12,28%)	5 (10,42%)
Cryptosporidium sp.	1 (1,75%)	1 (2,08%)
Shigella dysenteriae	1 (1,75%)	-
Campylobacter jejuni	2 (3,51%)	-
Giardia Lamblia	3 (5,26%)	7 (14,58%)
Cyclospora cayetanensis	1 (1,75%)	-
Ascaris lumbricoides	-	1 (2,08%)
Enterobius vermicularis	-	1 (2,08%)
Strongyloides stercoralis	-	1 (2,08%)
Koinfektion mit NV	1 (1,75%) (blastocystis hominis)	-

Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Häufung der Diagnose „Enteritis ohne Erreger“ in den beiden Studiengruppen ($p<0,001$, chi-Quadrat Test). Während sie in der Studiengruppe 1 in über 70% der Fälle gestellt wurde (42 mal, 73,68%), wurde sie in der Studiengruppe 2 nur in 17 Fällen (35,42%) gestellt. Der Anteil der bakteriellen und parasitären Erreger war in beiden Studiengruppen vergleichbar hoch ($p=0,179$ chi-Quadrat; Studiengruppe 1: 12 x Diagnose bakterieller/parasitärer Erreger; Studiengruppe 2: 15x Diagnose bakterieller/parasitärer Erreger). Jedoch bestand ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit mit der eine nicht infektiöse Ursache als Diagnose und somit als Grund für die Diarrhö angegeben wurde ($p=0,005$ chi-Quadrat Test). War dies in der Studiengruppe 2 sechsmal der Fall, kam es in der Studiengruppe 1 nicht ein einziges Mal vor. Bezieht man auch die chronischen, mit Diarrhö assoziierten Erkrankungen der Patienten als mögliche Ursache für eine aktuelle Diarrhö mit ein, so ist in der Studiengruppe 2 in knapp einem Fünftel aller Patienten (in zehn von 48 Fällen, 20,83%) eine nicht-infektiöse Genese der Diarrhö wahrscheinlich, während dies in der Studiengruppe 1 nur bei einem der Patienten der Fall ist, was einen signifikanten ($p=0,001$, chi-Quadrat Test) Unterschied darstellt.

Von den 104 Patienten, die eine aktuelle Reiseanamnese aufzuweisen hatten (Studiengruppe 1 und Kontrollgruppe), wurden 50 verschiedene Reiseziele besucht. Indien war dabei mit 21 von 104 Besuchern (20,19%) das häufigste Ziel. Acht Patienten (7,69%) waren nach Thailand gereist. Südafrika, Indonesien, China und Kenia waren mit je vier Besuchern die nächsthäufig aufgesuchten Reiseziele. Ghana und der Irak wurden von je drei Patienten besucht. Zwei Patienten machten keine Angaben zu ihrem Reiseziel.

Die meistbesuchten Regionen waren der mittlere Osten (Indien, Irak, Pakistan, Dubai und Goa), gefolgt von Südostasien (Thailand, Sri Lanka, Indonesien, die Malediven, Myanmar, Singapur, Indochina, Hong Kong/ Macao, Laos, Bangladesch) und Schwarzafrika (Kenia, Tansania, Mozambique, Südafrika, Benin, Ghana, Kamerun, Ostafrika, Sansibar, Namibia, Komoren). Jeweils 27 (25,96%), 25 (24,04%) und 20 (19,23%) Patienten hatten diese Regionen besucht. Weitere acht Patienten (7,69%) besuchten Nordafrika, sieben (6,73%) Südamerika, fünf (4,80%) Mittelamerika, vier (3,58%) reisten nach Fernost und weitere vier Patienten blieben in Europa. Zentralasien war mit nur zwei Besuchern die am wenigsten frequentierte Region dieses Patientenkollektivs.

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs dieser Studie lässt sich keine statistisch valide Aussage über das mit der Reise in ein bestimmtes Land oder eine Region assoziierte Risiko einer Norovirusinfektion treffen. Die Mehrzahl der Norovirusinfektionen dieser Studie wurde bei Reiserückkehrern aus Indien diagnostiziert. Vier der neun in Studiengruppe 1 detektierten Norovirusinfektionen traten bei Reiserückkehrern aus Indien auf, zwei traten bei Reiserückkehrern aus Kenia auf, je eine weitere Infektion trat bei Reiserückkehrern aus China, Griechenland und Nepal auf. Damit waren vier von 13 an Diarröh leidenden Reiserückkehrern aus Indien Norovirus-positiv getestet worden, was einem Anteil von 30,77% entspricht. Auch der Norovirus-positive Patient der Kontrollgruppe war nach Indien gereist.

Alle Patienten der Studiengruppe 1 sowie 20 Patienten der Kontrollgruppe machten Angaben zu ihren Reisemodealitäten. 28 (36,36%) von ihnen gaben an eine Rucksack- oder Abenteuerreise gemacht zu haben, 19 (24,68%) nahmen an einer Pauschalreise teil, 13 Patienten (16,88%) waren geschäftlich unterwegs und acht (10,39%) besuchten Freunde und Familie. Die restlichen Patienten waren entweder als Missionar oder als Austauschstudent verreist. Ein Patient der Kontrollgruppe gab an in das betreffende Land emigriert zu sein. Die Rucksackreise war dabei mit dem bei Weitem höchsten Risiko einer Norovirusinfektion bei Reiserückkehr assoziiert (OR=4,923 im Vergleich zu anderen

Reisemodalitäten). Ihr nach folgte die Geschäftsreise (OR=1,429). Die Pauschalreise war mit dem geringsten Norovirusrisiko bei Reiserückkehr assoziiert (OR=0,304), obwohl sie die zweithäufigste Reiseart war. Man könnte aufgrund des genannten odds ratios von 0,304 sogar von einem protektiven Effekt im Vergleich zu anderen Reisemodalitäten sprechen.

Die Länder Indien, Kenia, China, Griechenland und Nepal, die mit einem besonders hohen Risiko der Norovirusdiarröh bei Reiserückkehr assoziiert waren, wurden signifikant weniger von Patienten der Kontrollgruppe aufgesucht ($p=0,020$ chi-Quadrat Test, 23 Patienten in Studiengruppe 1 und neun Patienten in Studiengruppe 2 besuchten die genannten Länder). Die Häufigkeit eines mit hohem Norovirusrisiko assoziiertem Reisemodus (Geschäfts- und Rucksackreise) unterschied sich bei den Patienten die Angaben machten nicht signifikant ($p=0,906$, chi-Quadrat Test) zwischen der Studiengruppe 1 und den nicht an Diarröh erkrankten Patienten der Kontrollgruppe.

Die zehn positiv auf Noroviren getesteten symptomatischen Patienten litten alle an Diarröh, was ein Einschlusskriterium für die Studie war. Bei zwei Patienten wurde Blut im Stuhl nachgewiesen, zwei Patienten hatten Reiswasserstühle, drei hatten Schleim im Stuhl, zwei litten an Fieber, ein Patient gab an unter Blähungen zu leiden, drei litten an Bauchkrämpfen, vier litten unter Übelkeit, zwei Patienten gaben an zu erbrechen, ein Patient gab Muskel- und Gliederschmerzen an, drei weitere Patienten beklagten Kopfschmerzen.

Die Begleitsymptome einer Diarröh, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Norovirusdiagnose einhergingen waren: Erbrechen (OR=4,500)>Hämatozechie (OR=3,708)> Kopfschmerz (OR=3,273)> Schleim in den Ausscheidungen (OR=2,964)> Bauchkrämpfe (OR=2,703)> Reiswasserstuhl (OR=1,867)> Übelkeit (OR=1,444) und Muskel- und Gliederschmerz (OR=1,062). Bei Patienten die unter Fieber (OR=0,740), Blähungen (OR=0,348) oder Müdigkeit (OR=0,153) als Begleitsymptom litten war eine negative Norovirusdiagnostik wahrscheinlicher als eine positive. Diese Daten sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, zeigten doch vier der zehn positiv auf Noroviren getesteten Patienten nicht eines der nach dieser Auswertung aussagekräftigsten Begleitsymptome. So lag denn auch der positive Vorhersagewert (positive predictive value) des Begleitsymptoms Erbrechen für eine vorhandene Noroviruserkrankung bei lediglich 28,57%.

Jene Patienten mit einer aktuellen Reiseanamnese (Studiengruppe 1 und Kontrollgruppe) besuchten die Tropenmedizinische Ambulanz im Durchschnitt $5,00 \pm 3,426$ Tage nach ihrer Rückkehr zum ersten Mal. (Minimum 0, Maximum 14 Tage; 95% Intervall: 4,37-5,63 Tage). Dies entsprach im Mittel $4,72 \pm 3,004$ Tagen nach Reiserückkehr in der Studiengruppe 1 (Minimum 0, Maximum 13; 95% Konfidenzintervall 3,92-5,52 Tage), und $5,34 \pm 3,472$ Tagen

nach Reiserückkehr in der Kontrollgruppe (Minimum 0, Maximum 14; 95% Konfidenzintervall 4,32-6,36 Tage). Beide Werte waren vergleichbar ($p=0,330$ One-way Anova Test). Acht der neun positiv auf Noroviren getesteten Durchfallpatienten der Studiengruppe 1 hatten die Tropenmedizinische Ambulanz innerhalb der ersten fünf Tage nach Reiserückkehr aufgesucht. Auch der positiv getestete Patient der Kontrollgruppe stellte sich in diesem Zeitfenster (Tag 3 nach Reiserückkehr) in der Ambulanz vor. Dies führte mit 21,2% (7 von 33 Patienten) zu einem Höhepunkt des prozentualen Anteils der positiv auf Noroviren getesteten Durchfallpatienten an allen Patienten der Studiengruppe 1 an Tag 4 nach Reiserückkehr. Bis zum Tag 14 nach Reiserückkehr sank dieser Anteil in der Studiengruppe 1 auf die bereits genannten 15,8%.

Trotz der größeren Streuung bei der angegebenen Durchfalldauer in Studiengruppe 2 (die Angaben variierten zwischen einem Symptombeginn am Tag der Vorstellung und einer Durchfalldauer seit bereits einem Jahr), war die mittlere Symptomdauer in den Studiengruppen 1 und 2 mit einem $p=0,773$ (one-way Anova Test) vergleichbar ($6,30\pm8,036$ Tage in der Studiengruppe 1, und $5,75\pm10,193$ Tage in der Studiengruppe 2). Zwei der Patienten, die in der Studiengruppe 1 positiv auf Noroviren getestet wurden, gaben an seit mehr als einer Woche an einer Durchfallerkrankung zu leiden. Dabei handelte es sich in einem Fall um einen Patienten der angab bereits seit Reisebeginn vor einem halben Jahr an Durchfall zu leiden. Der zweite Patient litt seit 17 Tagen unter Durchfällen. Unter Ausschluss dieser beiden Patienten ergab sich eine mittlere Symptomdauer von $3,00\pm2,828$ Tagen bei den noroviruserkrankten Patienten der Studiengruppe 1. Fünf der neun an einer Norovirusinfektion erkrankten Patienten der Studiengruppe 1 gaben an, bereits während der Reise erkrankt zu sein. Die übrigen vier Patienten gaben an, innerhalb der ersten 4 Tage nach ihrer Rückkehr erkrankt zu sein.

Eine statistisch relevante Relation zwischen Reisedauer und Infektionshäufigkeit konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Studie war es, Daten über die Prävalenz von Noroviren bei an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern zu erhalten. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt zeigte eine kleine, von Chapin et al.⁽⁴⁵⁾ 2005 publizierte Studie eine außergewöhnlich hohe Prävalenz (65%) von Noroviren bei an Diarrhö erkrankten Reisenden. Aufgrund dieser Daten war zu vermuten, dass bei unter Diarrhö leidenden Reiserückkehrern mit einer erhöhten Prävalenz von Noroviruserkrankungen zu rechnen ist.

Merkmal der Norovirusinfektion ist eine außergewöhnlich lange Ausscheidung des Virus von im Mittel 28 Tagen⁽¹³⁵⁾ nach Ende aller Symptome. Dies, in Verbindung mit einer vermuteten hohen Durchseuchungsrate bei an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern könnte potentiell zu einer signifikanten Gefährdung der öffentlichen Gesundheit durch die beschriebene Population beitragen. Zwei 2003 und 2008 erschienene Studien^(12,13) unterstützen diese These.

Somit erörterte die hier beschriebene Studie zusammenfassend vier Fragen:

- a) Wie hoch ist die absolute Prävalenz von Norovirusinfektionen bei an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern?
- b) Ist die Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern signifikant höher als bei einer an Diarrhö leidenden Kontrollgruppe deren symptomatische Norovirusinfektion nicht mit ihrer letzten Reise in Verbindung gebracht werden kann?
- c) Ist mit einer Gefährdung der öffentlichen Gesundheit durch die hohe Rate an mit Norovirus infizierten Reiserückkehrern zu rechnen?
- d) Könnte dieser Gefährdung durch eine Routinetestung von an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern und freiwilliger Isolierung dieser Patienten im Falle eines positiven Testergebnisses vorgebeugt werden?

5.1 Mögliche Risikofaktoren für eine Infektion mit Noroviren

Das Risiko an einer Diarrhö zu erkranken ist bei Reisenden gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöht.⁽²¹¹⁾ Mehr als 20% der Reisenden nach Südasien, dem Mittleren Osten, Lateinamerika, Nordafrika und ins tropische Afrika erkranken an einer Reisediarrhö. Bei Reisenden nach Russland, Südafrika oder Zentralasien liegt der Anteil immer noch bei 15-20%. Reisen nach Europa, Nordamerika, Japan oder Australien bergen

das geringste Risiko an einer Reisediarrhöe zu erkranken.⁽²¹²⁻²¹⁶⁾ In bis zur Hälfte aller Fälle bleibt die Ursache einer solchen Diarrhöe jedoch ungeklärt,⁽²¹⁷⁾ was einen hohen Anteil an nicht routinemäßig detektierten Erregern wie den Noroviren nahe legt. Erste Daten zur Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei Reisenden nach Mexiko⁽⁴⁵⁾ weisen auf die Richtigkeit dieser Annahme hin.

Es existieren wenige Studien die sich mit den Risikofaktoren für eine Norovirusinfektion beschäftigen, was viel Raum für Spekulationen lässt. So ist aufgrund der guten Datenlage zur Häufung von Norovirusepidemien in Krankenhäusern, Schulen, Hotels, Altenheimen, Kindertagesstätten und Kreuzfahrtschiffen^(17-19,23,168,218-224) davon auszugehen, dass jene Aufenthaltsorte ein erhöhtes Infektionsrisiko bergen in denen der Mensch-zu-Mensch Kontakt besonders eng ist und in denen Räumlichkeiten und Lebensmittel von Vielen geteilt werden. Diese Gegebenheiten sind auf Reisen besonders häufig anzutreffen.

Der Hygienestandard in Hotels und auf Kreuzfahrtschiffen ist für das Infektionsrisiko entscheidend. So konnte gezeigt werden, dass Norovirusepidemien vor allem auf Kreuzfahrtschiffen mit schlechten Hygienestandards auftraten.^(218,225) Besonders gefährdet scheinen solche Betriebe zu sein, bei denen Zimmer nur für kurze Zeit vermietet oder gar geteilt werden, so zum Beispiel Jugendherbergen. Tritt hier bei einem der Gäste eine Norovirusinfektion auf, so ist belegt, dass Viruspartikel sich auf direkt oder indirekt kontaminierten Oberflächen (inklusive der Wände) festsetzen und bei einem Neubezug des Zimmers zu weiteren Infektionsfällen führen können.⁽¹⁸⁾ Wie Studien zur Umweltstabilität der Noroviren zeigen, sind sie noch nach 7-10 Tagen auf kontaminierten Oberflächen nachweisbar und aller Wahrscheinlichkeit nach auch noch infektiös.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ Dies führt dazu, dass Norovirusepidemien in Hotels die normale Dauer von ein bis zwei Wochen bei weitem überschreiten können, wobei es zum wiederholten Aufflammen der Epidemie kommen kann.⁽¹⁸⁾ Auf Kreuzfahrtschiffen lässt sich ein ähnliches Phänomen beobachten. Die Schwierigkeiten bei der Dekontamination der Schiffe nach erfolgtem Norovirusausbruch sind in der Literatur belegt.⁽²²⁶⁾ Es überrascht nicht, dass einer der am besten belegten Risikofaktoren für eine Infektion mit Noroviren das Teilen eines Hotelzimmers oder einer Kabine auf einem Kreuzfahrtschiff mit einer an einer Norovirusinfektion erkrankten Person ist.^(21,24,227,228) Auch der Bezug eines Zimmers in dem vorher eine infizierte Person lebte, konnte auf Kreuzfahrtschiffen als Risikofaktor für eine Norovirusinfektion erkannt werden.^(24,229)

Ein weiterer gut dokumentierter Risikofaktor für eine Infektion mit Noroviren ist die Benutzung einer Gemeinschafts- oder einer öffentlichen Toilette.^(21,179,227,230) Dabei korrelierte das Risiko einer Norovirusinfektion bei Benutzung einer Gemeinschaftstoilette

positiv mit der Anzahl der Personen die sie nutzten.⁽²²⁷⁾ Einer der wenigen nachgewiesenen protektiven Faktoren zur Prävention einer Infektion mit Noroviren ist häufiges Händewaschen, besonders nach der Benutzung einer Toilette. Dies ist der effektivste Weg die Viruslast der Hände zu reduzieren. Das alleinige Desinfizieren der Hände war in Studien, wenn auch hilfreich, weniger effektiv als simples Händewaschen.^(21,32,196,231,232)

Hygienestandards bei der Lebensmittelzubereitung variieren von Land zu Land und von Küche zu Küche stark. Es konnte gezeigt werden, dass die schlechte Körperhygiene von symptomatisch und asymptomatisch infizierten Personen in der Lebensmittelproduktion die wohl wichtigste Ursache für lebensmittelassoziierte Norovirusepidemien ist.⁽²³³⁾ Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Fehlen von effektiven Hygienevorschriften und vor allem von Kontrollmaßnahmen in vielen der von unseren Patienten besuchten Ländern, das Risiko einer lebensmittelassoziierten Norovirusinfektion erhöhen. Dies gilt aller Wahrscheinlichkeit nach besonders in Fällen, in denen sich Reisende, außerhalb von Hotelanlagen mit entsprechenden Hygienestandards, von landestypischer Kost ernähren wie sie Straßenstände oftmals anbieten.

Wie die bereits genannten Daten zur Häufigkeit der Reisediarrhö je Land und Region vermuten lassen, sind Hygienestandards weltweit keinesfalls gleich und beeinflussen das Risiko einer Reisediarrhö signifikant. Dies hat auch auf das Risiko einer Norovirusinfektion Einfluss. Mehr als 4/5 (80,77 %) aller Patienten dieser Studie, die sich seit weniger als 14 Tagen wieder in Deutschland befanden, waren in Regionen gereist, für die ein besonders hohes Risiko an einer Reisediarrhö zu erkranken belegt ist.⁽²¹²⁻²¹⁶⁾ Es ist davon auszugehen, dass in vielen dieser Regionen die Trinkwassersicherheit nicht ausreichend gewährleistet ist. Durch fäkal kontaminiertes Trinkwasser übertragene Norovirusinfektionen sind mit einem Anteil an der Gesamtzahl der Infektionen von etwa 2-3% selten.^(17,18,123,145,157-159) Größere Ausbrüche wurden jedoch dokumentiert.⁽¹¹⁶⁾ Trotz der Tatsache, dass Reisenden im Allgemeinen empfohlen wird Trinkwasser in Flaschen zu kaufen oder abzukochen und mit Leitungswasser gewaschenes rohes Gemüse zu meiden, ist die Compliance mit diesen Empfehlungen nicht immer gut. Auch das Schwimmen in fäkal kontaminierten Gewässern kann nachgewiesenermaßen zu einer Infektion mit Noroviren führen,^(124,125) was vermuten lässt, dass Ähnliches auch für das Duschen oder das Wannenbad gilt, sollte die lokale Trinkwasserversorgung verunreinigt sein. Trifft dies zu, ist es ein auf Reisen schwer zu meidender Risikofaktor für eine Infektion mit Noroviren.

Das zoonotische Potential der Noroviren bleibt, trotz deutlicher Hinweise auf eine zoonotische Übertragung vom Rind auf den Menschen,⁽¹³⁸⁾ weitestgehend ungeklärt.

Während der Tierkontakt in unseren Breiten zumeist gering ist, ist er - ob beabsichtig oder nicht - bei Reisen in tropische und subtropische Gebiete vielfach häufiger. Ob dies das Risiko einer Norovirusinfektion erhöhen könnte ist rein spekulativ, die Möglichkeit lässt sich aber nicht ausschließen.

So sind Reisende einer ganzen Reihe möglicher Risikofaktoren für eine Infektion mit Noroviren ausgesetzt, seien dies nun kontaminiertes Wasser, kontaminierte Lebensmittel, die Benutzung einer Gemeinschaftstoilette, die höhere Wahrscheinlichkeit einer Mensch-zu-Mensch Übertragung in einem Hotel, kontaminierte Räumlichkeiten oder auch ein mögliches Infektionsrisiko durch engeren Kontakt zu Nagetieren, Rindern oder Schweinen. Dies mag auch die von Chapin et al.⁽⁴⁵⁾ publizierte hohe Infektionsrate von 65% bei an Diarrhö leidenden Reisenden erklären, sowie das mit der Reisedauer steigende Infektionsrisiko. Chapin et al. stellten jedoch in ihrem Artikel einige interessante Spekulationen über einen weiteren möglichen Risikofaktor, die Immunität der Reisenden, an. So waren in der zitierten Studie alle positiv getesteten Patienten an Noroviren der Genogruppe I erkrankt, was den Autoren zufolge nicht auf Fehler in der Detektionsmethode zurückzuführen war. Es wurde spekuliert, dass die untersuchten Reisenden eine Immunität gegen die global, also auch in den USA vorkommenden, GII Virusstämme entwickelt hatten, während sie gegen die nur in Mexiko vorkommenden GI Stämme nicht immun waren.⁽⁴⁵⁾

Interessante Daten lieferte auch eine Studie, die eine durch einen Norovirus der Genogruppe I ausgelöste Epidemie an Bord eines Kreuzfahrtschiffes untersuchte. Reisende, die aus den USA oder Kanada stammten, hatten ein deutlich erhöhtes Risiko an einer Norovirusinfektion zu erkranken als Reisende anderer Heimatländer. Besonders interessant ist, dass während ein und derselben Epidemie und trotz vergleichbaren Risikoverhaltens in den betroffenen Gruppen kein einziger Reisender aus Asien erkrankte.⁽²¹⁾ Die Autoren führten diese Diskrepanz vor allem auf eine höhere Prävalenz der HBGA Typ B und H Antigene in der asiatischen Bevölkerung zurück.⁽²¹⁾ Eine weitere Studie stellte bei britischen Reisenden im Vergleich zu Reisenden aus anderen europäischen Ländern, trotz vergleichbaren Risikoverhaltens, ein erhöhtes Risiko an einer Reisdiarrhö zu erkranken fest.⁽²³⁴⁾ Von Sonnenburg et al. vermuteten, dass ein genetischer Faktor für dieses erhöhte Krankheitsrisiko verantwortlich sein könnte. Die Autoren wiesen jedoch explizit darauf hin, dass die Verteilung der HBGA Antigene in Großbritannien sich nicht signifikant von der in Europa und Nordamerika unterscheidet, und es sich somit bei dem vermuteten genetischen Faktor nicht um die HBGA Antigene handeln kann.

So ergibt sich ein interessantes Bild, bei dem bei Reisenden aus Großbritannien, den USA und Kanada ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Reisediarrhöen und im Besonderen für Noroviren festgestellt werden kann. Das zu einem großen Teil gemeinsame genetische Erbe der Menschen aus diesen drei Ländern weist darauf hin, dass bei der festgestellten erhöhten Anfälligkeit für Noroviren ein noch nicht identifizierter genetischer Faktor eine Rolle spielen könnte und es sich nicht um bloße Zufallsbefunde handelt. Bei diesem genetischen Faktor könnte es sich um den von Atmar et al. 2003⁽¹⁸⁴⁾ vermuteten zellulären Co-Rezeptor für Noroviren handeln. Caco-2 Zellen exprimieren zwar das H-Antigen, eine Infektion mit Noroviren ist dennoch nicht möglich. Dies werteten die Autoren als Indiz für das Vorhandensein eines auf der Zelloberfläche der Caco-2 Zellen nicht exprimierten Co-Rezeptors.⁽¹⁸⁴⁾

Sollte der Co-Rezeptor existieren und sollte er der Grund für die erhöhte Suszeptibilität Menschen Britischer Herkunft sein, könnte dies auch bedeuten, dass die von Chapin et al. festgestellte außergewöhnlich hohe Inzidenz von Noroviruserkrankungen bei US amerikanischen Reisenden nach Mexiko diesem Phänomen unterliegt.

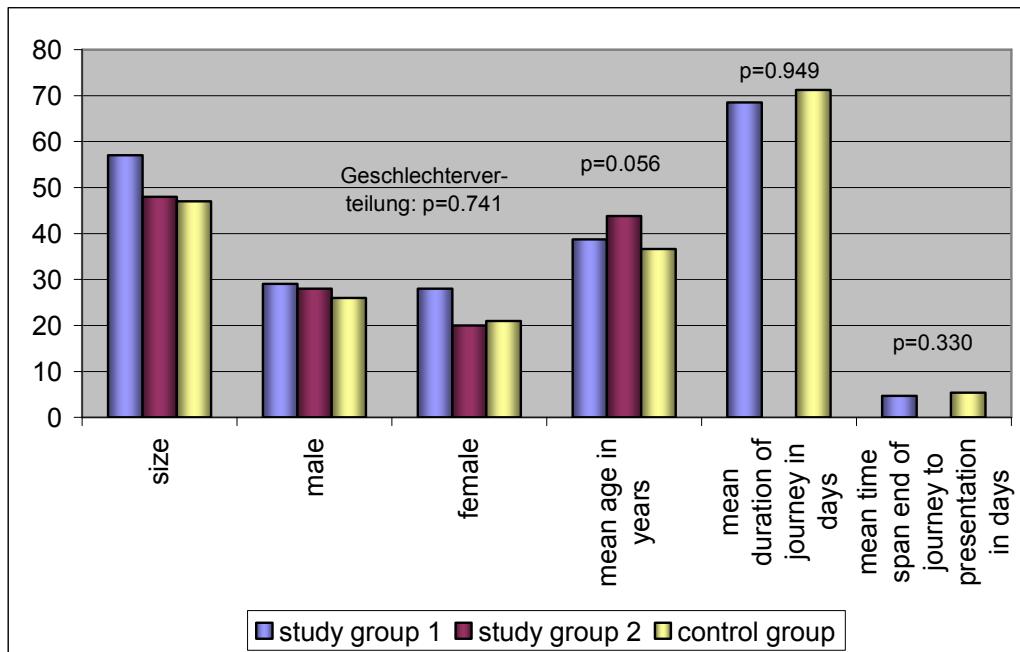
Internationale Studien belegen zwar, dass Noroviren des Genotyps GII.4 global dominieren,^(23,142,146-149) dies schließt jedoch nicht aus, dass sich die Zusammensetzung der Noroviruspopulation in verschiedenen Regionen der Erde unterscheidet. Wie gezeigt wurde, binden Viren des Genotyps GII.4 an HBGA Antigene jeden Typs.^(96,130,179,182,186,192) Dies trifft für Noroviren anderer Genotypen nicht zu.^(179,185,186) Führt man sich vor Augen, dass sich die Frequenz einzelner HBGA-Antigene in der Bevölkerung je Region stark unterscheiden kann, ist von einem regional unterschiedlichen Spektrum der nicht-GII.4 Genotypen auszugehen. Es ist nicht zu vermuten, dass einzelne Genotypen gar nicht vertreten sind, aber eine unterschiedliche Häufigkeit der nicht-GII.4 Genotypen je Land ist plausibel. Somit wäre es möglich, dass sich Reisende vermehrt solchen Noroviren aussetzen, die in ihrem Heimatland selten sind und gegen die sie keine durch Mehrfachexposition erworbene Immunität besitzen. Dieser Gedanke spiegelt die von Chapin et al. formulierte Theorie zur Erklärung der hohen Rate mit Viren der Genogruppe I in ihrer Studie wieder.⁽⁴⁵⁾

5.2 Diskussion des Studienaufbaus und der beobachteten Ergebnisse

Diese Studie umfasste drei untersuchte Patientenkollektive. Eine Kontrollgruppe von 47 Patienten deren Rückkehr von ihrer letzten Auslandsreise nicht mehr als 14 Tage zurücklag und die angegeben hatten in eben diesem Zeitraum an keinerlei gastrointestinalen Symptomen gelitten zu haben. Des weiteren eine Studiengruppe 1 der all jene an Diarröh erkrankten Patienten zugeordnet wurden, die sich innerhalb der ersten 14 Tage nach

Reiserückkehr am Tropenmedizinischen Institut der Universität München vorstellten, sowie eine Studiengruppe 2, der alle Diarrhö Patienten zugeordnet wurden deren Rückkehrdatum von ihrer letzten Auslandsreise zum Zeitpunkt der Vorstellung in unserer Ambulanz mehr als 14 Tage zurücklag. Diese Unterteilung führte zu drei, in Größe, Altersdurchschnitt und in der Geschlechterverteilung vergleichbaren Gruppen. (siehe: Graphik 1).

Graphik 1: Statistische Vergleichbarkeit der Studiengruppen 1 und 2 sowie der Kontrollgruppe:



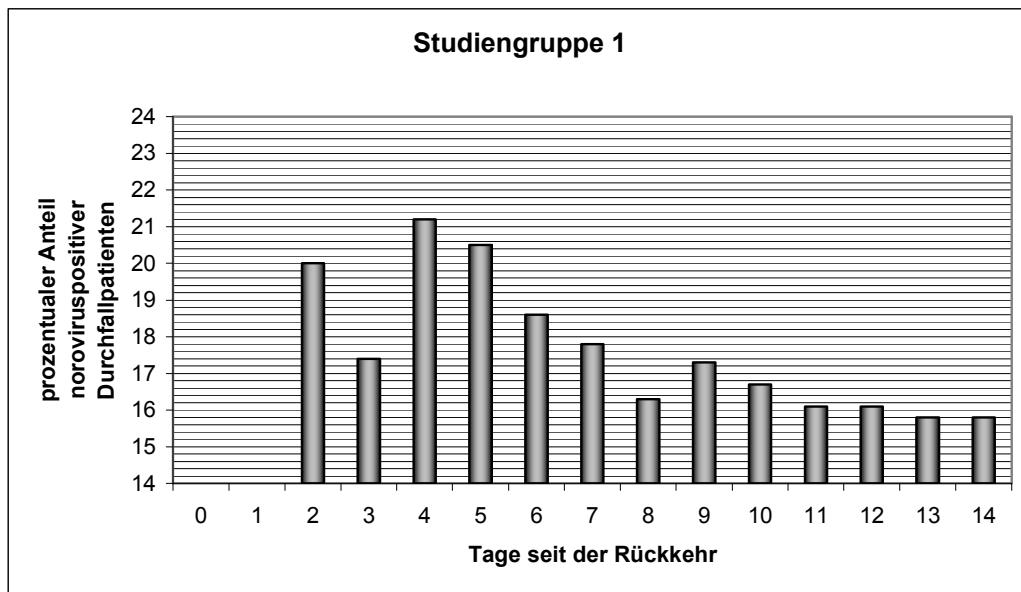
Der genannte Studienaufbau lässt die relevante Kritik zu, dass bei einer maximalen Zeitspanne von 14 Tagen zwischen Reiserückkehr und Beginn der Symptomatik sowie Vorstellung in der Ambulanz unter keinen Umständen garantiert werden kann, dass alle detektierten Norovirusinfektionen in der Studiengruppe 1 tatsächlich auf der Reise erworben wurden. Jedoch zeigt der mit $p=0,017$ (chi-Quadrat Test) klar signifikante Unterschied in der Norovirusprävalenz zwischen Studiengruppe 1 und 2, dass durch die deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Norovirusinfektion im Falle einer Diarrhö bei Patienten der Studiengruppe 1 ($OR= 8,8125$) im Vergleich zur während des selben Zeitraumes gesammelten Studiengruppe 2 eine Assoziation der detektierten Norovirusinfektionen mit der letzten Reise wahrscheinlich ist. Dies heist mit anderen Worten auch dass Reisen als unabhängiger Risikofaktor für eine Norovirusinfektion anzusehen ist.

Dieses Argument wird auch dadurch gestützt, dass acht der neun positiv getesteten Patienten der Studiengruppe 1 innerhalb der ersten fünf Tage nach Reiserückkehr unser

Institut aufsuchten. Dies führte zu einem Gipfel des prozentualen Anteils der an Norovirus erkrankten Durchfallpatienten am Tag 4 nach Reiserückkehr.

Sieben der 33 Patienten, die sich bis zum vierten Tag nach ihrer Reiserückkehr bei uns vorgestellt hatten, wurden positiv auf Noroviren getestet, was einem Anteil von 21,2% entsprach (siehe: Graphik 2). Da in den nächsten zehn Tagen (an Tag 9 nach Reiserückkehr) nur eine weitere Norovirusinfektion auftrat, sank dieser Anteil bezogen auf das bis Tag 14 gesehene Gesamtaufkommen von Patienten kontinuierlich auf die bereits zitierten 15,7%. Fünf der neun positiv auf Noroviren getesteten Patienten in Studiengruppe 1 gaben zudem an, bereits während ihrer Reise unter Symptomen gelitten zu haben. Die übrigen vier positiv getesteten Patienten gaben an innerhalb der ersten 4 Tage nach Reiserückkehr erkrankt zu sein. Gesteht man diesen vier Patienten die von Atmar et al. 2008⁽¹³⁵⁾ beobachtete maximale Inkubationszeit von fünf Tagen zu, ist dies eine klare Indikation dafür, dass ein Großteil der beobachteten Infektionen in Studiengruppe 1, wenn nicht alle, reiseassoziiert waren.

Graphik 2: Prozentualer Anteil der noroviruspositiven Patienten am Gesamtaufkommen aller Patienten der Studiengruppe 1. Sowohl das Gesamtaufkommen der Patienten als auch der positiv auf Noroviren getesteten Patienten bezieht sich auf alle einschließlich des angegebenen Tages getesteten Proben.



Epidemiologische Daten der letzten Jahre haben gezeigt, dass Noroviren der Genogruppe II als weltweit dominierende Gattung anzusehen sind.^(40,57,85,145,166-168) In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten in der Studiengruppe 1 sieben Infektionen mit Noroviren der Genogruppe II, eine Infektion mit Noroviren der Genogruppe I sowie eine Koinfektion mit

Viren beider Genogruppen festgestellt werden. Der infizierte Patient der Studiengruppe 2 war ebenfalls positiv auf Noroviren der Genogruppe II getestet worden

Es bestanden deutliche Unterschiede im Patientenprofil der Studiengruppen 1 und 2. So gaben 25% der Patienten der Studiengruppe 2 und nur 3,5% der Studiengruppe 1 an, an chronischen Krankheiten zu leiden ($p=0,001$ Chi-Quadrat Test). Besonders auffallend war dabei die Häufung der mit chronischer Diarröh assoziierten Pathologien in Studiengruppe 2. Alle dokumentierten Fälle von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (vier) sowie zwei der drei dokumentierten Fälle von Zöliakie und der einzige dokumentierte Fall einer Laktoseintoleranz wurden in dieser Gruppe gefunden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Patienten mit chronischen Erkrankungen, besonders solchen die mit Durchfällen assoziiert sind, bei neu auftretender Diarröh weniger schnell geneigt sind einen Arzt zu konsultieren, da sie eine solche Diarröh vermutlich zuerst auf ihre Erkrankung und erst sekundär auf eine eventuell während der Reise erworbene Infektion zurückführen. Somit war es wahrscheinlicher, dass diese Patienten der Studiengruppe 2 zugeordnet wurden.

Die Anzahl der Fälle in denen eine Diarröh auf einen detektierten parasitären oder bakteriellen Erreger zurückgeführt wurde unterschied sich in den Studiengruppen 1 und 2 nicht signifikant. Wie der erhöhte Anteil an chronisch Kranken in der Studiengruppe 2 vermuten lässt, wurde als Grund einer Diarröh in der Studiengruppe 2 signifikant häufiger eine Erkrankung nicht infektiöser Natur diagnostiziert ($p=0,005$ chi-Quadrat test). Bezieht man auch die chronischen, mit Diarröh assoziierten Erkrankungen der Patienten als mögliche Ursache für eine aktuelle Diarröh mit ein, so ist in der Studiengruppe 2 in etwas mehr als einem Fünftel aller Patienten (20,83%) eine nicht-infektöse Genese der Diarröh wahrscheinlich, während dies in der Studiengruppe 1 nur bei einem der Patienten der Fall ist. Dies stellt einen signifikanten ($p=0,001$, chi-Quadrat Test) Unterschied dar.

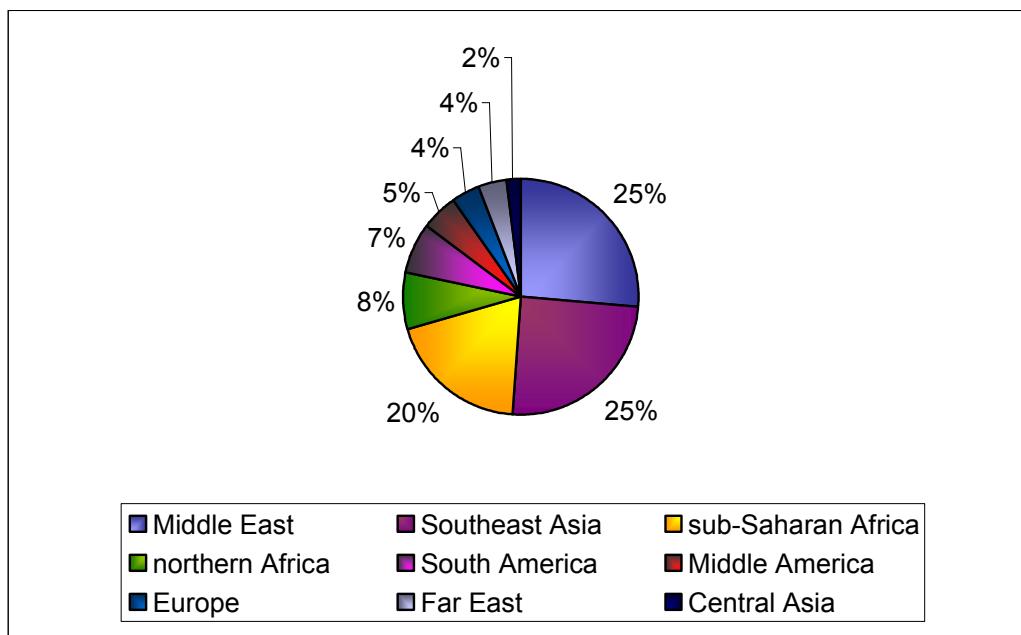
Gerade auch in Anbetracht der im ersten Teil dieser Diskussion angestellten Vermutungen zu Risikofaktoren für eine Infektion mit Noroviren überrascht es nicht, dass die Rucksack- oder Abenteuerreise mit einem im Vergleich zu anderen Reisemodalitäten fast fünffach erhöhten Risiko einer Norovirusinfektion assoziiert war ($OR=4,923$). Es ist davon auszugehen dass Rucksackreisende häufiger öffentliche Toiletten und Bäder nutzen, sich häufig von auf Märkten und an Straßenständen erworbener „landestypischer Kost“ ernähren, sich häufiger in Einrichtungen mit einer hohen Durchsatzrate an Besuchern wie Jugendherbergen einquartieren und dass sie vermehrt Kontakt mit verunreinigtem Trinkwasser haben. Da angenommen werden kann dass diese Verhaltensweisen bei Pauschalreisenden weniger häufig anzutreffen sind, ist ein in dieser Studie belegter

protektiver Effekt bezüglich einer Infektion mit Noroviren von Pauschalreisen im Vergleich zu anderen Reisearten (OR=0,304) kongruent mit diesen Überlegungen.

Überraschend ist jedoch, dass kein Unterschied in der Häufung einzelner Reisemodalitäten zwischen der Kontroll- und der Studiengruppe 1 festgestellt werden konnte. Man hatte bei Patienten die angegeben hatten seit mindestens zwei Wochen nicht mehr an Reise- oder anderen Diarrhöen erkrankt gewesen zu sein davon ausgehen können, dass ein erhöhtes Maß an schützenden Verhaltensweisen praktiziert wurde. Es war zu vermuten, dass sich dies auch in einer unterschiedlichen Häufung protektiver Reisemodalitäten wie der Pauschalreise zeigen würde. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Die von Patienten der Kontrollgruppe und Patienten der Studiengruppe 1 bereisten Länder und Regionen sind in der Graphik 3 gezeigt. Insgesamt wurden über 50 Länder bereist. Mehr als 4/5 (80,77%) aller Patienten bereisten Regionen die mit einem besonders hohen Risiko einer Reisediarrhö assoziiert sind. ⁽²¹²⁻²¹⁶⁾ Namentlich waren dies Schwarzafrika, Südasien, Lateinamerika und der mittlere Osten. 75,44% der Reisenden der Studiengruppe 1 war in diese Hochrisikogebiete gereist. In der Kontrollgruppe war dieser Anteil überraschenderweise mit 91,49% signifikant ($p=0,032$ chi-Quadrat Test) höher. Wir interpretieren dies derart, dass weder das Reiseland noch die Reiseart an sich einen Risikofaktor darstellen, sondern vor allem das Verhalten der Reisenden vor Ort.

Graphik 3: Prozentualer Anteil eines besuchten Reiseziels bezogen auf die Gesamtzahl der besuchten Ziele.



Das meistbesuchte Land in dieser Studie war Indien mit 21 Besuchern (20,19%), davon 13 aus der Studiengruppe 1 und 8 aus der Kontrollgruppe. Vier der 13 Reiserückkehrer aus Indien in der Studiengruppe 1 wurden positiv auf Noroviren getestet, was einem Anteil von 30,77% entsprach. Statistisch valide Aussagen zum Infektionsrisiko je Land und Region lassen sich aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Patienten nicht treffen. Dennoch ist davon auszugehen, dass eine Reise nach Indien mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist an Noroviren zu erkranken.

22 Patienten der Studiengruppe 1 hatten angegeben eine Rucksackreise gemacht zu haben, sechs wurden positiv auf Noroviren getestet. Somit betrug der Anteil der Norovirusinfektionen bei an Diarrhö erkrankten Rückkehrern von einer Rucksackreise 27,27%. Nimmt man beide Risikofaktoren zusammen, konnte festgestellt werden, dass drei von sieben Rucksackreisenden nach Indien bei einer nach Reiserückkehr aufgetretenen Diarrhö an Noroviren erkrankt waren.

5.3. Schlussfolgerungen

Diese Studie konnte eine hohe Prävalenz von Norovirusinfektionen bei Reiserückkehrern belegen. Bis zu einem Sechstel (15,7%) aller innerhalb von 14 Tagen nach Reiserückkehr an Diarrhö erkrankten Patienten wurden positiv getestet. Dieser Anteil liegt signifikant ($p=0,017$) über jenem solcher Diarrhö Patienten deren Reise mehr als 14 Tage zurück liegt. Dies zeigt, dass Auslandsreisen als ein unabhängiger Risikofaktor für eine Norovirusinfektion angesehen werden müssen. Die Prävalenz des Virus in an Diarrhö leidenden Reiserückkehrern steigt, je geringer die Zeitspanne zwischen Reiserückkehr und Beginn der Symptome. 21,2% aller in den ersten vier Tagen nach Reiserückkehr getesteten Durchfallpatienten zeigten ein positives Testergebnis. Dieser Anteil erscheint uns durchaus hoch genug um das Patientenkollektiv der an Diarrhö leidenden Reiserückkehrer als mögliches Risiko für die öffentliche Gesundheit einzustufen und weitere Studien zu diesem Thema anzuregen.

Es sollte bei der Beurteilung der Gefährdung der Öffentlichkeit durch von Reiserückkehrern eingeschleppte Noroviren nicht außer Acht gelassen werden, dass die Anzahl der Norovirusinfektionen in den letzten Jahren weltweit stark zugenommen hat.^(23,142-148) Dies wird vor allem auf einen Anstieg des Anteils der Noroviren der Gruppe GII.4 zurückgeführt.^(23,142,146-149) Ein weiterer Anstieg der absoluten Zahl von Norovirusinfektionen weltweit wird vorhergesagt.⁽¹⁵⁰⁾ Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass GII.4

Noroviren signifikant häufiger von Mensch-zu-Mensch übertragen werden als andere Genotypen.⁽¹⁴⁵⁾ Somit ist in den nächsten Jahren nicht nur mit einem erhöhten prozentualen Anteil an Norovirusinfektionen als Ursache von Diarröh in Reiserückkehrern zu rechnen, sondern auch damit, dass diese Norovirusinfektionen leichter übertragen werden als herkömmliche Noroviruserkrankungen.

Bei jeder Diskussion von Norovirus Prävalenzen in Patientenpopulationen sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass aktuell keine Screeningmethode für Noroviren existiert die in der Lage ist alle bekannten Virusstämme zu erfassen. Somit unterschätzen alle hier präsentierten Daten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit den tatsächlichen Anteil an Norovirusinfektionen in Reiserückkehrern. Wie bereits unter Punkt 3.5. der Einleitung erwähnt führen zudem besonders die geringe Viruslast in fäkalen Ausscheidungen, das Vorhandensein von Reverse Transkriptase-Inhibitoren im Stuhl, sowie eine wenig effiziente RNA-Extraktion häufig zu einem hohen Anteil an falsch-negativen Testergebnissen in Studien.^(10,153) Diese Studie stellt diesbezüglich mit Sicherheit keine Ausnahme dar und so können wir nur davon ausgehen, dass die hier präsentierten Daten lediglich den unteren Schwellwert abbilden und bei komplexeren Messungen noch höhere Infektionshäufigkeiten nachgewiesen werden können.

Die Wahrscheinlichkeit mit der ein an Diarröh leidender Reiserückkehrer sich mit Noroviren infiziert hat sollte im klinischen Alltag mit Hilfe einer genauen Reiseanamnese evaluiert werden. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Risiko einer Noroviruserkrankung bei an Durchfall leidenden Reiserückkehrern von Rucksackkreisen im Vergleich zu Reisenden anderer Reisearten erhöht ist. Mehr als ein Viertel von ihnen (27,27%) litten an einer Norovirusinfektion. Bei an Diarröh erkrankten Reiserückkehrern aus Indien lag der Anteil der Norovirusinfektionen sogar bei knapp über 30%. So sollte die Anamnese unserer Meinung nach vor allem folgende Punkte genauer erfragen:

- Beruf des Reisenden
- Erkrankungen von Mitreisenden Familienmitgliedern oder Hotelangestellten, inklusive der Nachbarn in Hotel oder Pension
- Kontakte mit potentiell kontaminiertem Wasser (Baden in Seen, Flüssen oder in Schwimmbecken)
- Verzehr von Austern oder anderen Schalentieren (vor allem in roher Form)
- Kontakte mit potentiell kontaminierten Lebensmitteln (Verzehr von ungewaschenem Obst oder Gemüse, Verzehr von Essen in Restaurants, Buden oder an Straßenständen zweifelhafter Hygiene)

- Häufigkeit des Besuchs öffentlicher Sanitäreinrichtungen
- Frequenz des Händewaschens oder Gebrauch von Händedesinfektionsmitteln
- Kontakt mit Erbrochenem (inklusive der Frage ob öffentliches Erbrechen beobachtet werden konnte)
- Erfolgte eine Selbstmedikation mit Antibiotika?
- Zeit seit der Rückkehr
- Beginn der Symptome (vor oder kurz nach der Reise?)
- Art der Reise
- Reiseziel

Diese Studie ist nicht in der Lage allgemeingültigen Empfehlungen dazu abzugeben ob eine Norovirusdiagnostik bei an Diarröh erkrankten Reiserückkehrern routinemäßig durchgeführt werden sollte. Der in dieser Studie belegte Anteil von Norovirusinfektionen bei an Diarröh leidenden Reiserückkehrern von über 20% in Woche eins nach Reiserückkehr, erscheint uns jedoch hoch genug, um solch eine Testung zumindest für die Tropenmedizinische Ambulanz als Teil der Untersuchungsroutine zu empfehlen. Sollte zudem die Anamnese auf ein erhöhtes Infektionsrisiko hindeuten ist eine Testung dringend anzuraten.

Spira 2003⁽²¹¹⁾ weist in ihrer Übersichtsarbeit zur Verfahrensweise mit erkrankten Reiserückkehrer besonders darauf hin, dass Erkrankungen die ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellen könnten unbedingt ausgeschlossen werden müssen. Eine Weiterverbreitung von Noroviren durch Reiserückkehrer, bis hin zur Epidemie und daraus resultierenden Todesfällen, ist belegt.^(12,13) Aufgrund dessen interpretieren wir Spira 2003 so, dass bei an Diarröh erkrankten Reiserückkehrern, die ein beruflich hohes Potential dafür haben die Viren weiterzuverbreiten und Epidemien auszulösen (so zum Beispiel Angestellte von Kliniken, Alten- und Pflegeheimen, Alten- und Krankpfleger in der ambulanten Versorgung, niedergelassene Ärzte, Kindergärtnerinnen und in der Lebensmittelverarbeitung arbeitende Personen) eine Norovirusinfektion unbedingt und routinemäßig auszuschließen ist. Eine Beurlaubung dieser Personen bis zum Erhalt des Ergebnisses der Testung wäre anzuraten. Im Falle einer positiven Testung sollten die Patienten auf die Notwendigkeit einer besonders strikten Körperhygiene hingewiesen werden. Eine weitere Beurlaubung ist in diesem Fall zu überdenken.

6 Zusammenfassung

Die akute Diarröhö gilt mit etwa 4,6 Milliarden Fällen pro Jahr als die häufigste Erkrankung des Menschen⁽¹⁾ und die Noroviren zählen zu den häufigsten Erregern akuter Durchfallserkrankungen weltweit.⁽²⁻⁹⁾ Zur Bedeutung von Noroviren als Ursache einer Reisediarrhoe und zur epidemiologischen Bedeutung von Reisenden für die Verbreitung von Noroviren liegen jedoch bislang nur wenige Daten vor. Eine kleine Studie aus dem Jahr 2005⁽⁴⁵⁾ zeigte eine außergewöhnlich hohe Prävalenz (65%) von Noroviren bei an Diarröhö erkrankten Reisenden, was vermuten lässt, dass auch bei unter Diarröhö leidenden Reiserückkehrern mit einer erhöhten Prävalenz von Noroviruserkrankungen zu rechnen sein könnte. Obwohl eine Weiterverbreitung von Noroviren durch Reiserückkehrer, bis hin zur Epidemie und daraus resultierenden Todesfällen, in der Literatur belegt ist,^(12,13) existieren derzeit keine uns bekannten Untersuchungen zur Prävalenz von Noroviruserkrankungen bei Reiserückkehrern. Da jedoch aufgrund der aktuellen Datenlage von einer erhöhten Norovirusprävalenz in diesem Patientenkollektiv auszugehen ist, stellt sich die Frage in wie weit mit einer Gefährdung der öffentlichen Gesundheit durch diese Gruppe zu rechnen sein kann und ob eine Routinescreening von Noroviren bei an Diarröhö erkrankten Reiserückkehrern anzuraten ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher erste Zahlen zur Häufigkeit von Noroviruserkrankungen bei an Diarröhö erkrankten Reiserückkehrern zu sammeln und diese Daten mit Blick auf die Etablierung eines Routinescreenings und die potentielle Gefährdung der öffentlichen Gesundheit hin zu evaluieren. Im Zuge dessen erfasste diese Arbeit auch die Häufigkeit von Norovirusinfektionen in Abhängigkeit von der Reisedestination, sowie das Krankheitsbild und den Krankheitsverlauf einer Norovirusinfektion und verglich diese Daten mit Daten zweier nach Alter, Geschlecht und Größe vergleichbarer Kontrollgruppen.

Zur Detektion einer etwaigen Norovirusinfektion wurden in drei Asservationsphasen Stuhlproben aus der poliklinischen Ambulanz der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin des Klinikums der Universität München gesammelt. Es wurde nur Proben- und Datenmaterial von Patienten verwendet, die ihr schriftliches Einverständnis hierzu erklärt hatten bzw. von Minderjährigen, bei denen dies durch die Erziehungsberechtigten erfolgte. Der Wortlaut der schriftlichen Information und der Einverständniserklärung war der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München vorgelegt und von dieser so genehmigt worden. Die so gesammelten Stuhlproben wurden anfänglich einer Studiengruppe von an Diarröhö leidenden Patienten und einer Kontrollgruppe zugeteilt, wobei

die Studiengruppe solche Proben umfasste die „ungeformt“ waren, also die Form des Probengefäßes angenommen hatten. Die Kontrollgruppe umfasste nur solche Patienten die im Anamnesegespräch mit dem behandelnden Arzt angegeben hatten seit nicht mehr als 14 Tagen von ihrer letzten Reise zurückgekehrt zu sein und seit mindestens 14 Tagen nicht mehr unter gastrointestinalen Symptomen gelitten zu haben.

Die Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung nach Zuordnung der im Computersystem erfassten Patientendaten in zwei Kollektive unterteilt. Der Studiengruppe 1 wurden all jene Patienten zugeordnet die sich zum Zeitpunkt des Aufsuchens der Tropenmedizinischen Ambulanz seit weniger als 14 Tagen nach erfolgter Reise wieder in Deutschland befanden. Alle restlichen Patienten der Studiengruppe wurden dem Kollektiv „Studiengruppe 2“ zugeordnet.

Bei der statistischen Auswertung konnten somit drei Patientengruppen unterschieden werden: eine Studiengruppe 1 mit 57 Patienten deren symptomatische Noroviruserkrankungen aller Wahrscheinlichkeit nach mit ihrer letzten Reise in Verbindung standen. Eine Studiengruppe 2 mit 48 Patienten deren symptomatische Noroviruserkrankungen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mit ihrer letzten Reise in Verbindung standen, sowie eine Kontrollgruppe von 47 Patienten, deren asymptomatische Noroviruserkrankungen möglicherweise mit ihrer letzten Reise in Verbindung standen.

Stuhlproben wurden nach einer in der Literatur belegten Methode^(43,71,205-210) als 20% Suspension in am Routine-labor der Tropenmedizinischen Ambulanz standardmäßig eingesetztem Nuklease-freiem Wasser bei -80°C asserviert. Die Extraktion der viralen RNA erfolgte am Tag der RT-PCR Testung im Routine-labor für Norovirusdiagnostik des „Landesamtes für Gesundheitsschutz und Lebensmittelsicherheit Oberbayern“. Für die Extraktion wurde die 20%ige Stuhlsuspension mit Nuklease-freiem Wasser auf 10% verdünnt und zehn Minuten bei 3500g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die RNA Extraktion mit Hilfe des „MicrolabStar“ Extraktionsroboters der Firma Hamilton (Bonaduz, Schweiz) genutzt. Die hierzu verwendeten Reagenzien waren im QiAmp biorobot kit der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) enthalten und wurden den Angaben des Herstellers folgend verwendet. Nach erfolgter RNA-Extraktion wurden die Proben mittels einer am Landesamt für Gesundheitsschutz und Lebensmittelsicherheit Oberbayern etablierten qRT-PCR Methode auf Noroviren der Genogruppen I und II getestet.

Tabelle 1: In der qRT-PCR verwendete Primersequenzen:

NV 192	5'- gC (CT) ATg TTC CgC Tgg ATg C-3'
NV 193	5'- CgT CCT TAg ACg CCA TCA TCA -3'
TM8 Probe	5'- FAM – Tgg ACA gg(Ag) gAT CgC (Ag)AT CTC CTg C- 3' - TMR
NV 107a	5'- AgC CAA TgT TCA gAT ggA Tg -3'
NV 117	5'- TCg ACg CCA TCT TCA TTC AC -3'
TM3 Probe	5' - FAM - Tgg gAg ggC gAT CgC AAT CTg gC - 3' - TMR

Insgesamt untersuchte die hier präsentierte Studie ein Patientenkollektiv von 152 Personen, von denen 83 männlichen und 69 weiblichen Geschlechts waren. Patienten zwischen vier und 80 Jahren wurden untersucht, wobei der Altersdurchschnitt bei $39,7 \pm 15$ Jahren lag und sich in den drei untersuchten Patientenkollektiven nicht signifikant unterschied (p=0,056; one-way Anova Test). Auch der Geschlechteranteil (p= 0,741; chi-quadrat Test) sowie die mittlere Reisedauer (p= 0,949 one-way Anova Test) waren in allen betreffenden Kollektiven vergleichbar.

Noroviren konnten bei elf der 152 (5,9%) Patienten dieser Studie nachgewiesen werden. In der Studiengruppe 1 lag die Rate der Noroviruserkrankungen bei 15,7%. In der Studiengruppe 2 lag sie hingegen nur bei 2,1%, was dem Anteil der Kontrollgruppe entsprach. Es ist in der Literatur belegt dass Noroviren der Genogruppe II aktuell als weltweit dominierende Gattung anzusehen sind.^(40,57,85,145,166-168) In Übereinstimmung mit diesen Daten wurden sieben Fälle von GGII Infektion in der Studiengruppe 1, je einer in der Studiengruppe 2 und der Kontrollgruppe, sowie eine GGI/GGII Koinfektion in der Studiengruppe 1 und eine GGI Infektion, ebenfalls in der Studiengruppe 1, detektiert. Die Zahl der Norovirusinfektionen war in der Studiengruppe 1 signifikant höher als in der Studiengruppe 2 (p=0,017, chi-Quadrat Test) und der Kontrollgruppe (p=0,019, chi-Quadrat Test). Somit war auch die Wahrscheinlichkeit bei Diarröh an einer Noroviruserkrankung zu leiden in der Studiengruppe 1 signifikant höher als in der Studiengruppe 2 (OR=8,813).

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs lies sich keine statistisch valide Aussage über das mit der Reise in ein bestimmtes Land oder eine Region assoziierte Risiko einer Norovirusinfektion treffen. Es war jedoch auffallend, dass die Mehrzahl der Norovirusinfektionen dieser Studie bei Reiserückkehrern aus Indien diagnostiziert wurde. Vier von 13 an Diarröh leidenden Reiserückkehrern aus Indien waren Norovirus-positiv getestet worden, was einem Anteil von 30,77% entsprach. Auch der Norovirus-positive Patient der Kontrollgruppe war nach Indien gereist. Des weiteren war das hohe mit einer Rucksackreise assoziierte Risiko einer Norovirusinfektion bei Reiserückkehr (OR=4,923 im

Vergleich zu anderen Reisemodealitäten) auffallend. Im Kontrast hierzu war die Pauschalreise mit dem geringsten Norovirusrisiko bei Reiserückkehr assoziiert (OR=0,304), obwohl sie die zweithäufigste Reiseart war. Man könnte aufgrund des genannten odds ratios von 0,304 sogar von einem protektiven Effekt im Vergleich zu anderen Reisemodealitäten sprechen.

Die vorliegenden Daten zeigten durch den mit $p=0,017$ (chi-Quadrat Test) klar signifikanten Unterschied in der Norovirusprävalenz zwischen Studiengruppe 1 und 2, dass eine Assoziation der detektierten Norovirusinfektionen mit der letzten Reise wahrscheinlich war. Somit konnte die Schlussfolgerung getroffen werden, dass das Reisen als unabhängiger Risikofaktor für eine Norovirusinfektion anzusehen ist. Dieser Schluss wurde auch dadurch gestützt, dass acht der neun positiv getesteten Patienten der Studiengruppe 1 innerhalb der ersten fünf Tage nach Reiserückkehr unser Institut aufsuchten. Dies führte zu einem Gipfel des prozentualen Anteils der an Norovirus erkrankten Durchfallpatienten am Tag 4 nach Reiserückkehr von 21,2%. Fünf der neun positiv auf Noroviren getesteten Patienten in Studiengruppe 1 gaben zudem an, bereits während ihrer Reise unter Symptomen gelitten zu haben. Die übrigen vier positiv getesteten Patienten gaben an innerhalb der ersten 4 Tage nach Reiserückkehr erkrankt zu sein. Gestehst man diesen vier Patienten die von Atmar et al. 2008⁽¹³⁵⁾ beobachtete maximale Inkubationszeit von fünf Tagen zu, ist dies eine klare Indikation dafür, dass ein Großteil der beobachteten Infektionen in Studiengruppe 1, wenn nicht alle, reiseassoziiert waren.

Diese Studie war durch die Größe des untersuchten Patientenkollektivs nicht in der Lage allgemeingültigen Empfehlungen dazu abzugeben ob eine Norovirusdiagnostik bei an Diarröh erkrankten Reiserückkehrern routinemäßig durchgeführt werden sollte. Der in dieser Studie belegte Anteil von Norovirusinfektionen bei an Diarröh leidenden Reiserückkehrern von über 20% in Woche eins nach Reiserückkehr, erschien uns jedoch hoch genug, um solch eine Testung zumindest für die Tropenmedizinische Ambulanz als Teil der Untersuchungsroutine zu empfehlen. Des Weiteren kam die vorliegende Studie zu dem Schluss, dass bei an Diarröh erkrankten Reiserückkehrern, die ein beruflich hohes Potential dafür haben die Viren weiterzuverbreiten und Epidemien auszulösen (so zum Beispiel Angestellte von Kliniken, Alten- und Pflegeheimen, Alten- und Krankenpfleger in der ambulanten Versorgung, niedergelassene Ärzte, Kindergärtnerinnen und in der Lebensmittelverarbeitung arbeitende Personen) eine Norovirusinfektion unbedingt und routinemäßig auszuschließen ist. Eine Beurlaubung dieser Personen bis zum Erhalt des Ergebnisses der Testung wäre anzuraten. Im Falle einer positiven Testung sollten die

Patienten auf die Notwendigkeit einer besonders strikten Körperhygiene hingewiesen werden. Eine weitere Beurlaubung ist in diesem Fall zu überdenken.

7. Bibliographie:

1. WHO. global burden of disease - 2004 update.
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf 2008.
2. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):246-53.
3. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S254-61.
4. Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174(3):610-5.
5. Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteijn B, et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1389-94.
6. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35(2):275-90, viii.
7. Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006;193(3):413-21.
8. Lopman BA, Reacher MH, Van Duijnhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):90-6.
9. Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13(1):144-6.
10. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8):1224-31.
11. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5(5):607-25.
12. Fretz R, Schmid H, Kayser U, Svoboda P, Tanner M, Baumgartner A. Rapid propagation of norovirus gastrointestinal illness through multiple nursing homes following a pilgrimage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22(10):625-7.
13. Verhoef L, Duizer E, Vennema H, Siebenga J, Swaan C, Isken L, et al. Import of norovirus infections in the Netherlands and Ireland following pilgrimages to Lourdes, 2008--preliminary report. *Euro Surveill* 2008;13(44):pii: 19025.

14. Michel A, Fitzgerald R, Whyte D, Fitzgerald A, Beggan E, O'Connell N, et al. Norovirus outbreak associated with a hotel in the west of Ireland, 2006. *Euro Surveill* 2007;12(7):E11-2.
15. Reid JA, Caul EO, White DG, Palmer SR. Role of infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control. *Lancet* 1988;2(8606):321-3.
16. Brown CM, Cann JW, Simons G, Fankhauser RL, Thomas W, Parashar UD, et al. Outbreak of Norwalk virus in a Caribbean island resort: application of molecular diagnostics to ascertain the vehicle of infection. *Epidemiol Infect* 2001;126(3):425-32.
17. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000;124(3):481-7.
18. Cheesbrough JS, Green J, Gallimore CI, Wright PA, Brown DW. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect* 2000;125(1):93-8.
19. Love SS, Jiang X, Barrett E, Farkas T, Kelly S. A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiol Infect* 2002;129(1):127-32.
20. Dippold L, Lee R, Selman C, Monroe S, Henry C. A gastroenteritis outbreak due to norovirus associated with a Colorado hotel. *J Environ Health* 2003;66(5):13-7, 26; quiz 27-8.
21. Chimonas MA, Vaughan GH, Andre Z, Ames JT, Tarling GA, Beard S, et al. Passenger behaviors associated with norovirus infection on board a cruise ship--Alaska, May to June 2004. *J Travel Med* 2008;15(3):177-83.
22. Lang L. Acute gastroenteritis outbreaks on cruise ships linked to Norwalk-like viruses. *Gastroenterology* 2003;124(2):284-5.
23. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J Infect Dis* 2004;190(1):27-36.
24. Isakbaeva ET, Widdowson MA, Beard RS, Bulens SN, Mullins J, Monroe SS, et al. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Infect Dis* 2005;11(1):154-8.
25. Takkinen J. Recent norovirus outbreaks on river and seagoing cruise ships in Europe. *Euro Surveill* 2006;11(6):E060615 2.
26. Enserink M. Infectious diseases. Gastrointestinal virus strikes European cruise ships. *Science* 2006;313(5788):747.

27. Koopmans M, Harris J, Verhoef L, Depoortere E, Takkinen J, Coulombier D. European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update. *Euro Surveill* 2006;11(7):E060706 5.
28. Depoortere E, Takkinen J. Coordinated European actions to prevent and control norovirus outbreaks on cruise ships. *Euro Surveill* 2006;11(10):E061018 2.
29. Dahl E. Norovirus challenges aboard cruise ships. *Int Marit Health* 2006;57(1-4):230-4.
30. Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, et al. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis* 2008;14(2):238-43.
31. Verhoef L, Boxman IL, Duizer E, Rutjes SA, Vennema H, Friesema IH, et al. Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006. *Euro Surveill* 2008;13(24).
32. Neri AJ, Cramer EH, Vaughan GH, Vinje J, Mainzer HM. Passenger behaviors during norovirus outbreaks on cruise ships. *J Travel Med* 2008;15(3):172-6.
33. Keswick BH, Blacklow NR, Cukor GC, DuPont HL, Vollet JL. Norwalk virus and rotavirus in travellers' diarrhoea in Mexico. *Lancet* 1982;1(8263):109-10.
34. Ryder RW, Oquist CA, Greenberg H, Taylor DN, Orskov F, Orskov I, et al. Travelers' diarrhea in panamanian tourists in Mexico. *J Infect Dis* 1981;144(5):442-8.
35. Taylor DN, Echeverria P, Blaser MJ, Pitarangsi C, Blacklow N, Cross J, et al. Polymicrobial aetiology of travellers' diarrhoea. *Lancet* 1985;1(8425):381-3.
36. Koch J, Schneider T, Stark K, Schreier E. Norovirusinfektionen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch -Gesundheitsschutz* 2006;49:296 - 309.
37. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2529-34.
38. De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3151-7.
39. de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006;137(2):259-64.
40. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bressee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186(1):1-7.
41. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):15-37.
42. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for

detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2587-95.

43. Michael Schmid RO, Gunnar Schalasta, Stefan Brockmann, Peter Kimmig, Gisela Enders. Fast detection of Noroviruses using a real-time PCR assay and automated sample preparation. *BMC Infectious Diseases* 2004;15(4).

44. Jan Vinje HV, Leena Maunula, Carl-Henrik von Bonsdorff, Marina Hoehne, Eckart Schreier, Alison Richards, Jon Green, David Brown, Suzanne S. Beard, Stephan S. Monroe, Erwin de Bruin, Lennart Svensson, Marion P. G. Koopmans. International Collaborative Study To Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2003;41(4):1423-1433.

45. Chapin AR CMC, William C. Dudley, Lucy C. Gibson, Rafael Pratdesaba, Olga Torres, Domingo Sanchez, Jaime Belkind-Gerson, Irene Nyquist, Anders Kärnell, Bjorn Gustafsson, Jane L. Halpern, A. Louis Bourgeois, Kellogg J. Schwab. Prevalence of Norovirus among Visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43(3):1112-1117.

46. Zahorsky. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. . *Arch. Pediatr.* 1929(46):391-5.

47. Kapikian AZ. The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. *Journal of Infectious Diseases* 2000;181(Supplement 2):295 - 302.

48. Gordon I, Ingraham HS, et al. Gastroenteritis in man due to a filtrable agent. *N Y State J Med* 1949;49(16):1918-20.

49. Reimann HA PA, Hodges JH. The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Proc Soc Exp Biol Med* 1945;59:8-9.

50. Kojima S FH, Kusama H, et al. . Studies on the causative agent of the infectious diarrhea. Records of the experiments on human volunteers. *Japanese Medical Journal* 1948;1:467-76.

51. Fukumi H, Nakaya R, Hatta S, Noriki H, Yunoki H, Akagi K, et al. An indication as to identity between the infectious diarrhea in Japan and the afebrile infectious nonbacterial gastroenteritis by human volunteer experiments. *Jpn J Med Sci Biol* 1957;10(1):1-17.

52. Jordan WS, Jr., Gordon I, Dorrance WR. A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute non-bacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiologic agents. *J Exp Med* 1953;98(5):461-75.

53. Gordon IG, Patterson PR, Whitney E. Immunity in volunteers recovered from non-bacterial gastroenteritis. *J Clin Invest* 1956;35(2):200-5.

54. Gordon I, Meneely JK, Jr., Currie GD, Chicoine A. Clinical laboratory studies in experimentally-induced epidemic nonbacterial gastroenteritis. *J Lab Clin Med* 1953;41(1):133-41.
55. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10(5):1075-81.
56. Ettayebi K, Hardy ME. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* 2003;77(21):11790-7.
57. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the Caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181(supplement 2):322 - 30.
58. Matthews RE. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979;12(3-5):129-296.
59. Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, et al. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981;37(3):994-9.
60. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250(4987):1580-3.
61. Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 2002;147(8):1655-63.
62. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/research/CatA.htm>.
63. Green C, Kapikian. *Human caliciviruses*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott/The Williams & Wilkins Co., 2001.
64. Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 2):291-301.
65. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195(1):51-61.
66. Black DN, Burroughs JN, Harris TJ, Brown F. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* 1978;274(5671):614-5.
67. Burroughs JN, Brown F. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* 1978;41(2):443-6.
68. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259(5094):516-9.
69. Clarke IN, Lambden PR. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S309-16.
70. Rowena A. Bull MMT, Peter A. White Norovirus Recombination. *Journal of General Virology* 2007(88):3347-3359.

71. Shigeyuki Kojima TK, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods* 2002;100:107-114.
72. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters* 2005;253:1 - 8.
73. Boniotti B, Wirblich C, Sibilia M, Meyers G, Thiel HJ, Rossi C. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 1994;68(10):6487-95.
74. Sosnovtsev SV, Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 2000;277(1):193-203.
75. Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* 2001;75(4):1611-9.
76. Liu B, Clarke IN, Lambden PR. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 1996;70(4):2605-10.
77. Dunham DM, Jiang X, Berke T, Smith AW, Matson DO. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* 1998;143(12):2421-30.
78. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000;74(14):6581-91.
79. Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 2003;77(21):11603-15.
80. Pletneva MA, Sosnovtsev SV, Green KY. The genome of hawaii virus and its relationship with other members of the caliciviridae. *Virus Genes* 2001;23(1):5-16.
81. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999;286(5438):287-90.
82. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 1994;68(8):5117-25.
83. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66(11):6527-32.
84. Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol* 2003;77(6):3569-77.

85. David J. Allen JJG, Chris I. Gallimore, Jacqueline Xerry, Miren Iturriza-Gómara. Analysis of Amino Acid Variation in the P2 Domain of the GII-4 Norovirus VP1 Protein Reveals Putative Variant-Specific Epitopes. *PLoS one* 2008;3(1):e1485.
86. Lochridge VP, Hardy ME. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol* 2007;81(22):12316-22.
87. Vance P. Lochridge KLJ, Joel W. Graff, Michele E. Hardy. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *Journal of General Virology* 2005;86(Pt 10):2799-806.
88. Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 2005;79(22):14017-30.
89. Mayo MA. Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* 2002;147(5):1071-6.
90. Green K. *Caliciviridae: the noroviruses*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
91. Green SM, Lambden PR, Deng Y, Lowes JA, Lineham S, Bushell J, et al. Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. *J Med Virol* 1995;45(2):197-202.
92. G Rachakonda AC, S Parveen, S Bhatnagar, A Patwari, S Broor. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. *Journal of Clinical Virology* 2008;doi:10.1016/j.jcv.2008.05.006.
93. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to Norovirus in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(7):2988 - 2995.
94. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346(2):312-23.
95. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S336-48.
96. Rockx BHG, Vennema H, Hoebe CJPA, Duizer E, Koopmans MPG. Association of Histo-Blood Group Antigens and Susceptibility to Norovirus Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 2005;191(March):749 - 754.
97. Lopman BA, Gallimore C, Gray JJ, Vipond IB, Andrews N, Sarangi J, et al. Linking healthcare associated norovirus outbreaks: a molecular epidemiologic method for investigating transmission. *BMC Infectious Diseases* 2006;6(108).

98. Green J, Vinje J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DW, et al. Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* 2000;20(3):227-36.
99. Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* 2000;145(2):223-41.
100. Green SM, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res* 1995;37(3):271-83.
101. Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000;38(7):2595-601.
102. Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DW, et al. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 2003;77(4):2789-98.
103. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003;299(5612):1575-8.
104. Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, et al. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* 2007;13(7):1071-3.
105. Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, et al. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8):1306-8.
106. Bull RA, Tu ETV, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(2):327 - 333.
107. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 2004;116(2):109-17.
108. La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol* 2008;153(11):2077-83.
109. Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H, Saif LJ. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3089-99.
110. Deng Y, Batten CA, Liu BL, Lambden PR, Elschner M, Gunther H, et al. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2300-5.

111. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2004;2(12):e432.
112. Chris I. Gallimore JG, David Lewis, Alison F. Richards, Benjamin A. Lopman, Antony D. Hale, Roger Eglin, Jim J. Gray, David W. G. Brown. Diversity of Noroviruses Cocirculating in the North of England from 1998 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(4):1396-1401.
113. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002;299(2):225-239.
114. Hardy ME, Kramer SF, Treanor JJ, Estes MK. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch Virol* 1997;142(7):1469-79.
115. Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5214-24.
116. Papadopoulos VP, Vlachos O, Isidoridou E, Kasmeridis C, Pappa Z, Goutzouvelidis A, et al. A Gastroenteritis Outbreak due to Norovirus Infection in Xanthi, Northern Greece: Management and Public Health Consequences. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2006;15(1):27 - 30.
117. Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, et al. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 2000;181(4):1467-70.
118. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus LA. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Methods* 2002;100(1-2):57-69.
119. Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998;178(6):1571-8.
120. Girish R, Broor S, Dar L, Ghosh D. Foodborne outbreak caused by a Norwalk-like virus in India. *J Med Virol* 2002;67(4):603-7.
121. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994;170(1):34-43.
122. Fretz R, Herrmann L, Christen A, Svoboda P, Dubuis O, Viollier EH, et al. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in

Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2005;24:214 - 216.

123. Becker KM, Moe CL, Southwick KL, MacCormack JN. Transmission of Norwalk virus during football game. *N Engl J Med* 2000;343(17):1223-7.
124. Baron RC, Murphy FD, Greenberg HB, Davis CE, Bregman DJ, Gary GW, et al. Norwalk gastrointestinal illness: an outbreak associated with swimming in a recreational lake and secondary person-to-person transmission. *Am J Epidemiol* 1982;115(2):163-72.
125. Koopman JS, Eckert EA, Greenberg HB, Strohm BC, Isaacson RE, Monto AS. Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *Am J Epidemiol* 1982;115(2):173-7.
126. D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C, et al. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International Journal of Food Microbiology* 2006;108:84 - 91.
127. Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(11):3349-55.
128. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 2006;6(130).
129. Kapikian A.Z. CRM. *Norwalk group of viruses*. In: *Fields Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990.
130. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 2004;12(6):279-87.
131. Iversen AM, Gill M, Bartlett CL, Cubitt WD, McSwiggan DA. Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet* 1987;2(8558):556-8.
132. Moe C.L. RD, Pusek S., Tseng F., Heizer W., Kapoor C., Gilliam B., Harb M., Stewart P., Miller S., Sobsey M., Herrmann J., Blacklow N., Calderon R. Determination of Norwalk virus dose- response in human volunteers. *98th Annual Meeting of the American Society for Microbiology*. Atlanta, GA, 1998.
133. Jaykus L. *Detection of human enteric viruses in foods*. In: *Foodborne Disease Handbook; Viruses, Parasites, and HACCP*. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2000.
134. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 1):79-87.

135. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14(10):1553-7.

136. Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2004;42(5):2271-4.

137. Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005;11(12):1874-81.

138. Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WH, Vinje J, van Duynhoven YT, et al. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* 2005;76(1):119-28.

139. Jiang B, McClure HM, Fankhauser RL, Monroe SS, Glass RI. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. *Journal of Medical Primatology* 2003;33:30 - 33.

140. de Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD, Webster RG, Lim WL. A pandemic warning? *Nature* 1997;389(6651):554.

141. Tian P, Bates AH, Jensen HM, Mandrell RE. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Letters in Applied Microbiology* 2006;43(6):645-651.

142. Dingle KE. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):3950-7.

143. Sakon N, Yamazaki K, Yoda T, Tsukamoto T, Kase T, Taniguchi K, et al. Norovirus storm in Osaka, Japan, last winter (2006/2007). *Jpn J Infect Dis* 2007;60(6):409-10.

144. CDC. Norovirus activity- United States, 2006-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2007;56:842-846.

145. Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):2959-65.

146. Vipond IB, Caul EO, Hirst D, Carmen B, Curry A, Lopman BA, et al. National epidemic of Lordsdale Norovirus in the UK. *J Clin Virol* 2004;30(3):243-7.

147. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004;363(9410):682-8.

148. Kroneman A VH, van Duijnoven Y, Duizer E, Koopmans M. High number of norovirus outbreaks associated with a GII.4 variant in the Netherlands and elsewhere: does this herald a worldwide increase? *Eurosurveillance* 2004;8(52).

149. White PA, Hansman GS, Li A, Dable J, Isaacs M, Ferson M, et al. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J Med Virol* 2002;68(1):113-8.

150. Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI. Are noroviruses emerging? *Emerg Infect Dis* 2005;11(5):735-7.

151. Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desselberger U, Estes MK. Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Clin Microbiol* 1993;31(4):1022-5.

152. Greenberg HB, Valdesuso J, Kapikian AZ, Chanock RM, Wyatt RG, Szmuness W, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infect Immun* 1979;26(1):270-3.

153. Lopman B. Noroviruses: simple detection for complex epidemiology. *Clin Infect Dis* 2006;42(7):970-1.

154. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365(9465):1147-52.

155. Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *Bmj* 1999;318(7190):1046-50.

156. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154(7):666-74.

157. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994;343(8908):1240-2.

158. Green J, Wright PA, Gallimore CI, Mitchell O, Morgan-Capner P, Brown DW. The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Hosp Infect* 1998;39(1):39-45.

159. Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 1994;26(4):251-9.

160. Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of viral agents in korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci* 2008;23(6):937-40.

161. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhao AG, Ramirez ML, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13(11):1756-8.

162. Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Virol* 2008;43(3):340-2.
163. Sasaki Y, Kai A, Hayashi Y, Shinkai T, Noguchi Y, Hasegawa M, et al. Multiple Viral Infections and Genomic Divergence among Noroviruses during an Outbreak of Acute Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(3):790 - 797.
164. Anthony W, Mounts TA, Marion Koopmans, Joseph S. Bresee, Jacqueline Noel, Roger I. Glass Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181(2):284- 287.
165. Lopman B, Zambon M, Brown DW. The evolution of norovirus, the "gastric flu". *PLoS Med* 2008;5(2):e42.
166. Schreier E, Doring F, Kunkel U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol* 2000;145(3):443-53.
167. Hale A, Mattick K, Lewis D, Estes M, Jiang X, Green J, et al. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J Med Virol* 2000;62(1):99-103.
168. Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, et al. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis* 2002;185(2):133-46.
169. Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 1999;179(6):1334-44.
170. Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 2004;305(5682):371-6.
171. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 2008;5(2):e31.
172. Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Xerry J, Adigwe J, Gray JJ. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Arch Virol* 2007;152(7):1295-303.
173. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297(2):86-9.
174. Farkas T, Thornton SA, Wilton N, Zhong W, Altaye M, Jiang X. Homologous versus heterologous immune responses to Norwalk-like viruses among crew members after acute gastroenteritis outbreaks on 2 US Navy vessels. *J Infect Dis* 2003;187(2):187-93.

175. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990;161(1):18-21.

176. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;140(2):578-83.

177. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974;129(6):709-14.

178. Ryder RW, Singh N, Reeves WC, Kapikian AZ, Greenberg HB, Sack RB. Evidence of immunity induced by naturally acquired rotavirus and Norwalk virus infection on two remote Panamanian islands. *J Infect Dis* 1985;151(1):99-105.

179. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo–Blood Group Type. *The Journal of Infectious Diseases* 2002;185:1335 - 1337.

180. Gary GW, Anderson LJ, Keswick BH, Johnson PC, DuPont HL, Stine SE, et al. Norwalk virus antigen and antibody response in an adult volunteer study. *J Clin Microbiol* 1987;25(10):2001-3.

181. Hutson AM, Estes MK, Atmar RL. Re: Nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritis and investigation of ABO histo-blood group type in infected staff and patients. *J Hosp Infect* 2004;58(2):163-4.

182. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9(5):548-53.

183. Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 2005;13(6):285-93.

184. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol* 2003;77(1):405-15.

185. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 2002;76(23):12335-43.

186. Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoen-Clouet N, Morrow AL, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* 2003;188(1):19-31.

187. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 2003;77(23):12562-71.

188. Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol* 2005;79(1):554-68.
189. Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007;81(11):5949-57.
190. Harrington PR, Vinje J, Moe CL, Baric RS. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* 2004;78(6):3035-45.
191. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacios G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122(7):1967-77.
192. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Brief Review Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Archives of Virology* 2007(152):457 - 461.
193. Oriol R, Mollicone R, Coullin P, Dalix AM, Candelier JJ. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl* 1992;27:28-38.
194. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *Apmis* 2000;108(1):1-28.
195. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzen-Derr JK, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 2004;145(3):297-303.
196. CDC. "Norwalklike viruses": public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001;50(9):1-18.
197. Gotz H, Ekdahl K, Lindback J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. *Clin Infect Dis* 2001;33(5):622-8.
198. Jansen A, Beyer A, Brandt C, Hohne M, Schreier E, Schulzke J, et al. [The norovirus-epidemic in Berlin - clinic, epidemiology, and prevention]. *Z Gastroenterol* 2004;42(4):311-6.
199. Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(1):46-9.
200. Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):71-7.

201. Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Magid MS, Gordon RE, Morse DL, et al. Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am J Transplant* 2003;3(6):764-8.

202. Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003;77(24):13117-24.

203. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clinical Microbiology and Infection* 2006;12:69 - 74.

204. CDC. Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel—Afghanistan. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2002;51:477–479.

205. Djin-Ye Oh GG, Eckart Schreier. Viral Agents of Acute Gastroenteritis in German Children: Prevalence and Molecular Diversity. *Journal of Medical Virology* 2003;71(1):82-93.

206. Rowena A. Bull ETVT, Christopher J. McIver, William D. Rawlinson, Peter A. White. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(2):327-333.

207. Marina Hoehne ES. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT- PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases* 2006;69(6).

208. Anthony C. Ike SOB, Kathrin Hartelt, Rachel E. Marschang, Matthias Contzen, Rainer M. Oehme. Molecular Epidemiology of Norovirus in Outbreaks of Gastroenteritis in Southwest Germany from 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(4):1262-1267.

209. Gary P. Richards MAW, Rebecca L. Fankhauser, and Stephan S. Monroe. Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Highly Degenerate Universal Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(12):7179-7184.

210. Tsutomu Kageyama SK, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41(4):1548-1557.

211. Spira AM. Assessment of travellers who return home ill. *Lancet* 2003;361(9367):1459-69.

212. Steffen R, van der Linde F, Gyr K, Schar M. Epidemiology of diarrhea in travelers. *Jama* 1983;249(9):1176-80.

213. Kozicki M, Steffen R, Schar M. 'Boil it, cook it, peel it or forget it': does this rule prevent travellers' diarrhoea? *Int J Epidemiol* 1985;14(1):169-72.

214. Castelli F, Carosi G. Epidemiology of traveler's diarrhea. *Chemotherapy* 1995;41 Suppl 1:20-32.

215. Steffen R. Epidemiologic studies of travelers' diarrhea, severe gastrointestinal infections, and cholera. *Rev Infect Dis* 1986;8 Suppl 2:S122-30.

216. Steffen R. Travel medicine--prevention based on epidemiological data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85(2):156-62.

217. Ericsson CD. Travelers' diarrhea. Epidemiology, prevention, and self-treatment. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12(2):285-303.

218. Cramer EH, Blanton CJ, Blanton LH, Vaughan GH, Jr., Bopp CA, Forney DL. Epidemiology of gastroenteritis on cruise ships, 2001-2004. *Am J Prev Med* 2006;30(3):252-7.

219. Browne A, Dalby A. Major incidents. Norwalk on the wild side. *Health Serv J* 2003;113(5840):26-7.

220. Ronveaux O, Vos D, Bosman A, Brandwijk K, Vinje J, Koopmans M, et al. An outbreak of Norwalk like virus gastroenteritis in a nursing home in Rotterdam. *Euro Surveill* 2000;5(5):54-57.

221. Traore O, Belliot G, Mollat C, Piloquet H, Chamoux C, Laveran H, et al. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J Clin Virol* 2000;17(3):151-8.

222. Guest C, Spitalny KC, Madore HP, Pray K, Dolin R, Herrmann JE, et al. Foodborne Snow Mountain agent gastroenteritis in a school cafeteria. *Pediatrics* 1987;79(4):559-63.

223. Gotz H, de JB, Lindback J, Parment PA, Hedlund KO, Torven M, et al. Epidemiological investigation of a food-borne gastroenteritis outbreak caused by Norwalk-like virus in 30 day-care centres. *Scand J Infect Dis* 2002;34(2):115-21.

224. Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 2003;131(1):727-36.

225. Lawrence DN. Outbreaks of Gastrointestinal Diseases on Cruise Ships: Lessons from Three Decades of Progress. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6(2):115-123.

226. CDC. Norovirus activity— United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003;52:41-45.

227. Ho MS, Glass RI, Monroe SS, Madore HP, Stine S, Pinsky PF, et al. Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet* 1989;2(8669):961-5.

228. Sharp TW, Hyams KC, Watts D, Trofa AF, Martin GJ, Kapikian AZ, et al. Epidemiology of Norwalk virus during an outbreak of acute gastroenteritis aboard a US aircraft carrier. *J Med Virol* 1995;45(1):61-7.
229. Gunn RA, Terranova WA, Greenberg HB, Yashuk J, Gary GW, Wells JG, et al. Norwalk virus gastroenteritis aboard a cruise ship: an outbreak on five consecutive cruises. *Am J Epidemiol* 1980;112(6):820-7.
230. Widdowson MA, Glass R, Monroe S, Beard RS, Bateman JW, Lurie P, et al. Probable transmission of norovirus on an airplane. *Jama* 2005;293(15):1859-60.
231. Kampf G, Ostermeyer C. Efficacy of alcohol-based gels compared with simple hand wash and hygienic hand disinfection. *J Hosp Infect* 2004;56 Suppl 2:S13-5.
232. Duizer E, Koopmans M. Efficacy of ethanol-based hand rubs. *J Hosp Infect* 2005;61(4):362-3.
233. Bean NH, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1988-1992. *MMWR CDC Surveill Summ* 1996;45(5):1-66.
234. von Sonnenburg F, Tornieporth N, Waiyaki P, Lowe B, Peruski LF, Jr., DuPont HL, et al. Risk and aetiology of diarrhoea at various tourist destinations. *Lancet* 2000;356(9224):133-4.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Landesamtes für Gesundheitsschutz und Lebensmittelsicherheit Oberbayern, im Besonderen Frau Christine Hartberger und Herrn Dr. Campe.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern des Labors sowie den Ärzten der Tropenmedizinischen Ambulanz ganz besonders für ihre Mithilfe bedanken.

9. Lebenslauf

Name: Nadja Apelt

Geboren: 15.7.1984 in Berlin

Bisheriger beruflicher Werdegang:

Zeitraum	Tätigkeit
Seit August 2009	Research Fellow im 'Department of Endocrinology, Diabetes and Hypertension' des Brigham and Women's Hospitals in Boston, USA unter Leitung von Dr José R. Romero
April 2010	Erwerb der Approbation in den USA, ausgestellt durch die 'Educational Commission for Foreign International Medical Graduates'
Oktober 2009	Publikation des Artikels "ACP1 genotype, glutathione reductase activity and riboflavin uptake affect cardiovascular risk in the obese." im Journal 'Metabolism'
1.8.2009	Erwerb der Approbation in Deutschland sowie Studienabschluss
Oktober 2008 – Januar 2009	PJ Tertiales im Fach Chirurgie am 'Hospital Clínic' (Universitat de Barcelona) in Barcelona, Spanien, unter Leitung von Dr. Samuel Bennaroch
Juni 2008 – Oktober 2008	PJ Tertiales im Fach Pädiatrie am 'Hospital de Santa Maria' (Universidade de Lisboa) in Lissabon, Portugal, unter Leitung von Professor Lincoln da Silva
Februar 2008 – Juni 2008	PJ Tertiales im Fach Innere Medizin am 'Hospital de Santa Maria' (Universidade de Lisboa) in Lissabon, Portugal, unter Leitung von Professor Luis Menezes Falcão
August 2007 – Februar 2008	Forschungsprojekt zur Genotyp-Phenotyp Assoziation zwischen dem ACP1 - Gen, der Enzymatischen Aktivität der Glutathion Reduktase sowie Hypertension, Lipidprofil und BMI

	(im Rahmen des 'Modul 6' des Medizinischen Curriculums der Universität München) am Institut für Genetische Forschung und Metabolische Studien (Instituto de Genética e Metabolismo) der Universidade de Lisboa, Lissabon, Portugal; unter Leitung von Professor Manuel Bicho.
Juni – Juli 2007	Famulatur im Fach Chirurgie an der Chirurgischen Klinik Nußbaumstraße
Juli - September 2005	Famulatur im Fach Chirurgie am 'Hospital de San Joan' (Universidad Miguel Hernandez de Elche) in Alicante, Spanien, unter der Leitung von Dr. Diaz und Dr. Compañ
Mai 2005	Erwerb des Physikums
August 2004 – März 2005	Teilnahme an einem Studienaustausch im Rahmen des ERASMUS Programs der Europäischen Union an der Universidad Miguel Hernandez de Elche in Alicante, Spanien
März 2004	Pflegepraktikum auf der Chirurgischen Allgemeinstation, Krankenhaus Bogenhausen, München
August 2003	Pflegepraktikum in der pädiatrischen Abteilung des 'Institut Universitari Dexeus' (Partnerkrankenhaus der Universitat de Barcelona), Barcelona, Spanien
März 2003	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2002 – März 2003	Absolvierung der Kurses 'Estudios Hispanicos' in den Fächern 'Frühe und Mittelalterliche Geschichte Spaniens' sowie 'Spanische Philologie' an der Universitat de Barcelona, Barcelona, Spanien
Juni 2002	Erwerb des 'Certificate of Advanced Education' (A-Level) an der 'Greenshaw High School' in Sutton, London, GB
Juni 2001	Erwerb des 'Certificate of Advanced Subsidiary Education' (As-Level) an der 'Bishop Reindorp CE School' in Guildford, Surrey, GB
Bis August 2000	Besuch des St.-Anna-Gymnasiums, München