

# Von Trinkwasser ausgehende Norovirus-Epidemien

Leena Maunula, Ilkka T. Miettinen, Carl-Henrik von Bonsdorff

Im Rahmen eines intensivierten Monitoring Programms zu lebensmittelbedingten Epidemien in Finnland wurden vom Trinkwasser ausgehende und durch Viren verursachte Krankheitsausbrüche untersucht. Die diagnostischen Maßnahmen umfassten Stuhluntersuchungen von Patienten mittels Elektronenmikroskopie und reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) auf Noroviren und Astroviren. Sobald ein Test positive Resultate für einen Virustyp ergab, wurde die zugehörige Trinkwasserprobe analysiert. Die Viruskonzentration erfolgte mittels positiv geladener Filter aus 1 L Proben. Während der Beobachtungsperiode 1998-2003 waren bei insgesamt 41 als wasserbedingt beschriebenen Epidemien zu 28 dieser Krankheitsausbrüche Wasserproben für Analysen verfügbar. Die Bewertung der RT-PCR-Ergebnisse der Patientenproben ergab bei 18 der Krankheitsausbrüche Noroviren als Ursache. Bei 10 Epidemien wurden in den zugehörigen Wasserproben ebenfalls Noroviren nachgewiesen. Mit Ausnahme eines Falls war die Amplicon-Sequenz dieser Viren identisch mit der bei Patienten gefundenen Virusart. Das weltweite Vorkommen von wasserbedingten Norovirus-Epidemien erfordert Maßnahmen zur Überwachung des Wassers auf Viren.

## Einleitung

Wasser kann Quelle epidemischer Krankheitsausbrüche sein (1). Die Kontamination erfolgt fast ausschließlich durch Abwasser, das Krankheitserreger der Enteritis enthält. Humanpathogene enteri-

sche Viren sind zumeist wirtsspezifisch; ihr weit verbreitetes Vorkommen kann mit hohen Konzentrationen in den Exkrementen der Patienten erklärt werden. Noroviren (vormals als Norwalk-ähnliche Viren bezeichnet) verursachen in allen Altersgruppen Gastroenteritiden. Da Noroviren, anders als Enteroviren, nicht ohne weiteres in Zellkulturen wachsen, wurde ihre Rolle erst in den neunziger Jahren evident, als spezifische diagnostische Methoden verfügbar wurden. Erst in jüngerer Zeit wurde die breite genomische Vielfalt der Genogruppen von Noroviren deutlich (2). Ein neuerer Bericht führt 5 Genogruppen und 22 genetische Cluster auf, die zumeist menschliche, aber auch Schweine- (porcine) und Mäuse- (murine) Viren einschließen (3).

Zusätzlich zu zahlreichen Epidemien in Gemeinden, bei denen die Übertragung von Mensch zu Mensch angenommen wird, kamen auch häufig Epidemien durch kontaminierte Lebensmittel vor (4). Die dominierende Rolle der Noroviren bei nahrungsmittel- und wasserbedingten Krankheitsausbrüchen wurde von Mead et al. (5) abgeschätzt. Verschiedene wasserbedingte Epidemien wurden auf der Basis epidemiologischer Beweise erkannt (6, 7). Erst 1997 erschien der erste Bericht über Noroviren in Brunnenwasser (8). Die auf Genomvergleichen basierende Diagnostik (RT-PCR) bietet eine sensitive und spezifische Methode, um diese Viren zu identifizieren. Die auf Sequenzen beruhende Identifizierung ist für die Ursachensuche bei Epidemien effektiv, insbesondere bei durch Noroviren ausgelösten Ausbrüchen, weil Noroviren eine

### Kontakt:

Leena Maunula  
 Carl-Henrik von Bonsdorff  
 HUCH Laboratory Diagnostics, Helsinki, Finland  
 University of Helsinki, Helsinki, Finland  
 Ilkka T. Miettinen  
 National Public Health Institute, Kuopio, Finland

### Korrespondenzadresse:

Leena Maunula  
 Carl-Henrik von Bonsdorff  
 Department of Food and Environmental Hygiene  
 Faculty of Veterinary Medicine  
 University of Helsinki  
 P.O.Box 66  
 00014 Helsinki  
 FINLAND  
 Fax: +358-9-191-57170  
 E-Mail: Leena.Maunula@helsinki.fi

Dr. Maunula ist Mikrobiologin beim Fachbereich für Nahrung und Umwelthygiene der Universität Helsinki, Finnland. Ihr Forschungsschwerpunkt gilt der molekularen Epidemiologie der Enteroviren, insbesondere der Noro- und Rotaviren. In den letzten Jahren hat sie sich mehr auf Viren in Umweltproben als auf klinische Proben konzentriert.

**Abstract**

**Norovirus Outbreaks from Drinking Water**

As part of an intensified monitoring program for foodborne disease outbreaks in Finland, waterborne outbreaks were investigated for viruses. The diagnostic procedure included analysis of patients' stool samples by electron microscopy and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for noroviruses and astroviruses. When these test results were positive for a virus, the water sample was analyzed. Virus concentration was based on positively charged filters from 1-L samples. Of the total 41 waterborne outbreaks reported during the observation period (1998-2003), samples from 28 outbreaks were available for analysis. As judged by RT-PCR results from patient samples, noroviruses caused 18 outbreaks. In 10 outbreaks, the water sample also yielded a norovirus. In all but 1 instance, the amplicon sequence was identical to that recovered from the patients. The ubiquity of waterborne norovirus outbreaks calls for measures to monitor water for viruses

wurden nicht alle Ausbrüche virologisch untersucht. Die Kriterien für die Feststellung eines wasserbedingten epidemischen Ausbruchs richteten sich nach der englischen Klassifikation (Grade A-D) (11).

Insgesamt wurden 271 Patientenproben von 25 Epidemien auf Viren analysiert. Die Zahlen der von einzelnen Ausbrüchen erhaltenen Fäkalproben schwankten zwischen 2 und 69 (Mittelwert: 11). Für die RNA-Extraktion wurde eine 10%-ige Stuhlsuspension in 0,05 mol/L Tris-HCl, 0,1 mol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 benutzt.

Insgesamt wurden 73 Wasserproben von 27 Epidemien analysiert; in sauberen Glas- oder Plastikflaschen gesammelte 1- bis 2-Liter Wasserproben wurden nach der Methode von Gilgen et al. (12) konzentriert. Die 1-L Proben wurden durch einen positiv aufgeladenen Scheibenmembranfilter geleitet (Durchmesser 47 mm, 45 µm Porengröße; AMF-Cuno, Zetapor, Meriden, CO, USA) mit oder ohne Fiberglas Vorfilter. Nach der Elution in 50 mmol/L Glycine-Puffer, pH 9,5, mit 1% Rinderextrakt, wurde das Eluat schnell mit HCl neutralisiert. Das Volumen wurde mittels Mikrokonzentrator (Centricon-100, Amicon, Beverly, MA, USA) auf etwa 100 µL reduziert. Diese Probe wurde für die RNA-Extraktion und PCR wie beschrieben benutzt (10).

RNA-Extraktion und RT-PCR auf Norovirus Polymerase Region wurden wie beschrieben ausgeführt (13). Kurz wurde RNA durch Phenol- und Guanidinthiocyanat enthaltendes Tripure Reagens (Roche, Indianapolis, IN, USA) extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Virale RNA wurde zu cDNA transkribiert und DNA-Amplifikation erfolgte in getrennten Röhrchen für Norovirus Genogruppen I und II (GI und GII) durch manuelle PCR mit den Primern Nvp110 (14) und N69 (15), bzw. Nvp110 und NI (16).

Ab 2002 wurden die Primer für die Genogruppen modifiziert als

- KA1 (5'-GANGGCCCTSCMTCWGGNTT-3') und
- KA2 (5'-TGGAAATTCNATHGCCCACTGG-3').

Die Amplicons wurden durch Elektrophorese in Agarose-Gel sichtbar gemacht, mittels eines Probenpanels hybridisiert und für Nukleotid-Sequenzierung benutzt.

Die Sequenzierung wurde manuell durchgeführt (Sequense, Version 2.0 DNA sequencing kit, USB, Cleveland, OH, USA) wie beschrieben (13). Sequenzenanalyse erfolgte durch die Programme SeqApp und ClustalW. Unsere Sequenzen wurden mit den folgenden EMBL/GenBank Noroviren aligned: Southampton/91/UK (L07418), Norwalk/68/US (M87661), Malta (AJ277616), Melksham/94/UK (X81879), Hawaii/76/US (U07611), Lordsdale/93/UK (X86557), GIIB (AY7732101), GIID (AF312728), und ein muriner Norovirus (AY228235). Für Nukleotid-Sequenzen Hillingdon/94/UK und Grimsby/95/UK siehe bei Vinje et al. (17); die Sequenz Lord Harris kommt von der Datenbasis des Europäischen Netzwerks (9, 18). Die Zugangsnummern für Nukleotidsequenzen dieser Studie der GenBank sind AY958213-9 für GI und AY958204-12 für GII Noroviren.

hochgradig variable Nukleotidsequenz sogar innerhalb des kurzen Amplicon aufweisen, das in der Polymeraseregion des Virus produziert wird (9).

Wasserbedingte durch Viren ausgelöste Infektionsausbrüche sind oft schwer zu erkennen. Durch Noroviren verursachte Krankheits-episoden kommen häufig vor; wenn der Kontaminationsgrad niedrig ist, bleibt auch die Anzahl der Krankheitsfälle niedrig. Gewöhnlich ist ein ziemlich ausgedehntes epidemisches Geschehen notwendig, damit medizinische Stellen und Behörden das Trinkwasser als mögliche Infektionsquelle erkennen (10). Berichtet wird über virologische Untersuchungen wasserbedingter Epidemien in Finnland, die in einem Zeitraum von 6 Jahren aufgetreten sind. Wir beschreiben ein verbessertes Vorgehen zum Erkennen wasserbürtiger Ausbrüche von Virusinfektionen.

**Methoden**

Die Meldung lebensmittel- und trinkwasserbedingter Epidemien wurde in Finnland 1997 reorganisiert und intensiviert; neue Bestimmungen sorgen seither dafür, dass alle verdächtigen Fälle sofort dem Nationalen Public Health Institut (KTL) gemeldet werden sollen. Für die sorgfältige Sicherstellung sowohl von Patienten- als auch von Umweltproben wurden Empfehlungen ausgegeben. Die Funktionen von lokalen Teams zur Abklärung von Epidemien wurden klar umrissen und umfassen die Ausbildung zur Durchführung epidemiologischer Surveys. Die Laborleistungen wurden verbessert, indem erweiterte Möglichkeiten zur viralen und Protozoendiagnostik sowohl von Patientenmaterial als auch von Umweltproben geschaffen wurden. Alle Fälle, in denen Wasser als Quelle der Infektionen verdächtig wurde, wurden dem KTL gemeldet. Die Probenahmeempfehlungen umfassten 3-10 repräsentative Stuhlproben von Patienten. Wasserproben, Rohwasserproben, und wo angebracht, Trinkwasserproben aus verschiedenen Bereichen des Verteilungsnetzes wurden sofort gezogen. Entgegen den Empfehlungen

**Ergebnisse**

**Beschreibung der Epidemien und Virusbefunde**

Insgesamt wurden von 1998 bis 2003 in Finnland 41 wasserbedingte Epidemien (3 bis 11 je Jahr) registriert. Davon wurden 28 (61 %) auf Viren untersucht. In 24 Fällen waren sowohl Wasser- als auch Patientenproben für Analysen verfügbar; bei 3 Ausbrüchen

waren nur Wasserproben verfügbar, bei einem nur Patientenproben. Bei den verbleibenden 13 Epidemien wurden keine Proben für Virus-Bestimmungen gewonnen. Die Analyse aller Proben erfolgte mittels RT-PCR. Patientenproben wurden zusätzlich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auf Enteritis-Viren und mittels RT-PCR auf Astroviren untersucht. Für Wasserproben wurde die Konzentrationsmethode nach Gilgen et al. (12) mit einem Startvolumen von 1 L etabliert. In den meisten Fällen wurden die Wasserproben nur auf Noroviren untersucht. Die am häufigsten gefundenen Viren, die wasserbedingte Ausbrüche von Krankheiten verursachten, waren Noroviren (18 Epidemien). Rotavirus verursachte eine Epidemie und bei 9 Epidemien wurden keine Viren gefunden. Über die bakteriellen Befunde wird andernorts berichtet.

Die 18 wasserbedingten Norovirus-Epidemien sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Mit Ausnahme von 2001 ereigneten sich in Finnland jedes Jahr mehrere Ausbrüche. Während der Studienperiode wurden 6 große Norovirus-Epidemien mit über 200 Krankheitsfällen erkannt. Die größten Epidemien umfassten >10.000 exponierte Personen mit 2.000-5.500 einschlägig erkrankten Fällen; weitere 7 mittelgroße (40-100 Fälle) und 5 kleine Ausbrüche (<20 Fälle) wurden durch Noroviren ausgelöst.

Die meisten Kontaminationen mit Noroviren traten in Grundwassersystemen auf, deren Nutzung in Finnland am weitesten verbreitet ist. In drei Fällen wurde Oberflächenwasser, See- oder Flusswasser genutzt. Von den Grundwasser-Epidemien traten 8 in öffentlichen kommunalen Systemen und 7 bei privaten Grundwasserbrunnen auf. Typischerweise waren Ferienhäuser oder verschiedene Arten von Campingplätzen mit eigenen Brunnen betroffen.

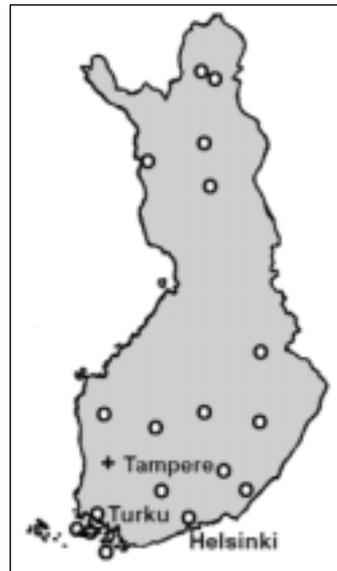


Abb. 1: Karte von Finnland; die Kreise zeigen die Verteilung der wasserbedingten Norovirus-Ausbrüche, 1998-2003.

Die geographische Verteilung der wasserbedingten Norovirus-Ausbrüche ist in Abb. 1 dargestellt. Epidemien traten über das ganze Land verteilt auf, vom südlichen Archipel bis zu den nördlichsten Teilen Finnlands. Saisonale Risiken für wasserbedingte Norovirus-Epidemien scheinen annähernd gleich zu sein (Abb. 2). Die Hälfte (20 von 41) der wasserbedingten Epidemien ereignete sich im Sommer und 11 von 15 Norovirus-Epidemien traten hauptsächlich im späten Winter bis zum Frühjahr (Februar bis Mai) auf. Tatsächlich waren im Winter die meisten Epidemien durch Noroviren verursacht, während im Sommer hauptsächlich Bakterien die Ursache waren.

Ausbruch	Monat/Jahr	Anzahl der Exponierten/ Anzahl der Erkrankten	Herkunft des Wassers
E1, Gemeinde*	3/1998	5.000/2.500	Trinkwasser aus Oberflächenwasser
E2, Gemeinde	4/1998	15.000/2.000	Grundwasser
E3, Ferienhäuser	7/1998	45/13	Brunnenwasser
E4, Zeltplatz auf Insel	8/1998	120/40	kommunaler Brunnen
E5, Gemeinde	1/1999	2.500/200	Grundwasser
E6, Fabrikbereich	2/1999	250/100	Grundwasser
E7, Gemeinde	4/1999	160/58	Grundwasser
E8, Badeort	7/1999	100/60	Brunnen
E9, Gemeinde*	3/2000	10.000/5.500	Grundwasser
E10, Privathaushalt	8/2000	14/13	Brunnen (gebohrt)
E11, Gemeinde	12/2000	2.200/300	Grundwasser
E12, Bauernhof (für Gäste)	4/2002	50/25	Brunnen (gegraben)
E13, Gemeinde	10/2002	960/300	Grundwasser
E14, Gästehaus	2/2003	13/11	Trinkwasser aus See
E15, Gemeinde	5/2003	150/95	Brunnen (gebohrt)
E16, Ferienhäuser		8/2003	25/20 Brunnen
E17, Zeltplatz	5/2003	56/40	Oberflächenwasser (Fluss)
E18, Gemeinde	4/2003	90/40	Grundwasser, Rohrbruch

\*Detaillierte Beschreibungen der Epidemien E1 und E9 sind publiziert (10, 19).

Tab. 1: Vermutete und erkannte Norovirus-Ausbrüche, Finnland, 1998-2003.

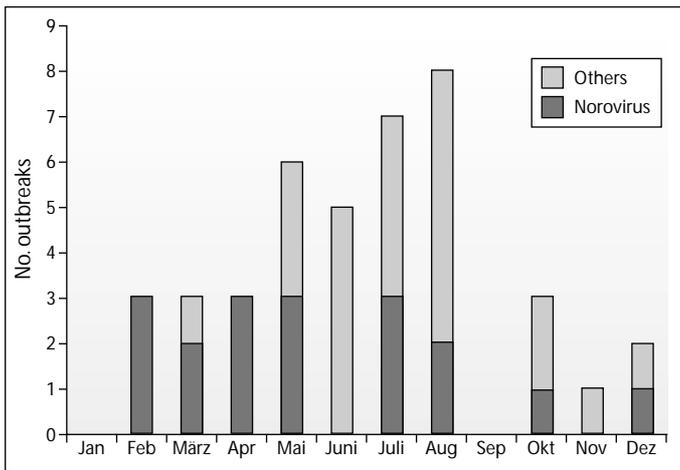


Abb. 2: Monatliche Verteilung der wasserbedingten Ausbrüche, einschließlich der Norovirus-Ausbrüche, Finnland, 1998-2003.

### Detaillierte Analyse der Noroviren

Noroviren von 16 Epidemien (E1-E16) wurden durch Sequenzanalysen der Amplicons weiter charakterisiert, von denen auch der Genotype abgeleitet wurde (Tab. 2). Noroviren traten in den Patientenproben aller 16 Epidemien und in den Wasserproben von 10 Epidemien auf. Bei 9 Epidemien waren auch coliforme Bakterien präsent, wohingegen bei 7 Epidemien kein Hinweis auf mikrobielle Kontamination gefunden wurde. Die meisten Epidemien wurden durch eine einzelne Norovirus-Genotype (Stamm) verursacht (11 Epidemien); mehr als ein Virus wurde häufiger bei

großen als bei kleinen Epidemien gefunden. GII-Noroviren waren nur geringfügig häufiger als GI-Typen (7 vs. 5 Epidemien). Bei den 10 Epidemien mit positiven Wasserproben wurden für die GI und GII Genotypen gleiche Anzahlen gefunden. In allen bis auf einer dieser Krankheitsperioden trat der in Wasserproben gefundene Norovirusgenotyp auch in den Patientenproben auf. Die einzige Ausnahme war Epidemie E 11, bei der die 2 Norovirus-Sequenzen GII.1 und GII.4 in den Wasserproben, aber nur der Typ GII.4 in den Patientenproben gefunden wurde. Bei allen Krankheitsausbrüchen waren nicht nur die viralen Genotypen, sondern auch die gesamten Amplicon-Sequenzen identisch. Zwei Norovirus-Typen der Genogruppe I, GI.3 (Birmingham) und GI.6 (Sindlesham, Hesse), wurden gefunden; eine GI-Sequenz (Epidemie E3) blieb unbestimmt.

Bei den Epidemien GII wurden mindestens 4 verschiedene Genotypen in Patienten- oder Wasserproben gefunden. Der häufigste Genotyp war GII.4 (Bristol, Lordsdale), nachgewiesen in Trinkwasserproben von 4 Epidemien, und Anfang 2003 die neue Variante (20). Auch die etablierten Genotypen GII.1 (Hawaii) und GII.5 (Hillingdon) wurden bei einigen Epidemien gefunden, zusammen mit einigen potenziell neuen Genotypen oder Sequenzen, die mit keinen der etablierten Genotypen, wie bspw. GIId (Upinniemi) und GIIf, eine gute Gruppe (cluster) bildeten. Wie Abb. 3 zeigt, wurde bei den meisten Epidemien ein Virus mit einer einzigartigen Amplicon-Sequenz angetroffen, selbst wenn es zu dem gleichen Genotyp der Viren bei den anderen wasserbedingten Epidemien gehörte. Norovirus des Genotyps GII.4 war die einzige Ausnahme und eine längere Nukleotid-Sequenz hätte wahrscheinlich einige genetische Unterschiede gezeigt (nachgewiesen zwischen den Sequenzen der Epidemien E1 und E11, hier nicht gezeigt).

Epidemien	Datum	Gegenwart von Coliformen	Mikrobiologische Befunde (Genotypen)*	
			Patienten	Wasser
E1, Gemeinde	Mar 1998	-	GI.6, GII.4	GII.4
E2, Gemeinde	Apr 1998	-	GI.6, GIId	-
E3, Ferienhäuser	Jul 1998	-	GI, GII	-
E4, Zeltplatz auf Insel	Aug 1998	-	GII.5	-
E5, Gemeinde	Jan 1999	-	GII.4	-
E6, Fabrikbereich	Feb 1999	+	GI.3	GI.3
E7, Gemeinde	Apr 1999	+	GI.6	GI.6
E8, Badeort	Jul 1999	+	GI.3	GI.3
E9, Gemeinde	Mar 2000	-	GI.3, GII	-
E10, Privathaushalt	Aug 2000	+	GI.3	GI.3
E11, Gemeinde	Dec 2000	+	GII.4	GII.4, GII.1
E12, Bauernhof für Gäste	Apr 2002	+	GII.NA	GII.NA
E13, Gemeinde	Oct 2002	+	GIIf	-
E14, Gästehaus	Feb 2003	-	GII.4nv	GII.4nv
E15, Gemeinde	May 2003	+	GII.4nv	GII.4nv
E16, Ferienhäuser	Aug 2003	+	GI.6	GI.6

Tab. 2: Befunde bei vermuteten und erkannten Norovirus-Ausbrüchen, Finnland, 1998-2003.

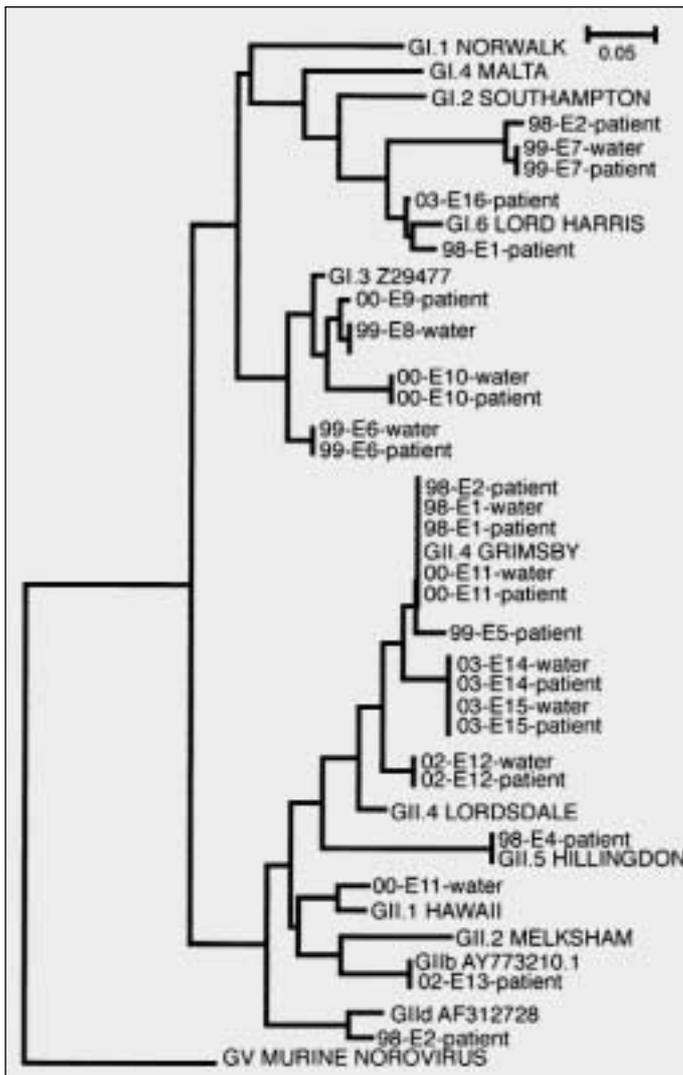


Abb. 3: Aus 28 Norovirus-Sequenzanalysen hergeleitete phylogenetische Bäume.

Die große Anzahl genetisch unterschiedlicher Norovirus-Genotypen hat sich für die Untersuchung von wasserbedingten Epidemien als vorteilhaft erwiesen. Obwohl die kurze Amplicon-Sequenz nicht eindeutig zeigt, ob zwei Viren identisch sind, scheint sie für den Zweck der Suche nach Ursprungsquellen ausreichend zu sein. In dieser Untersuchung trat bei bestimmten Norovirus-Epidemien eine Virussequenz auf und in einem Einzelfall zeigten die Viren von Patienten- und Trinkwasserproben eine andere, ebenfalls identische Sequenz. Bei den meisten Epidemien dürfte der Erfolg der Identifizierung eines Norovirus mit der gleichen Sequenz von Patienten- und Wasserproben darin begründet sein, dass die Epidemien in kleinen Gemeinden stattfanden. Bei großen wasserbedingten Epidemien sind gewöhnlich >1 Virusstamm und oft auch noch andere Viren und Mikroorganismen kausale Erreger.

Beide Norovirusgenogruppen kamen bei wasserbedingten Epidemien vor. Bei einer 5-Jahresstudie in Finnland (1998-2002) übertrafen GII-Epidemien deutlich die durch GI-Noroviren hervorgerufenen Seuchen (86,9% vs. 13,1%) (21). Allerdings waren wasserbedingte Epidemien nahezu zur Hälfte durch GI-Viren verursacht. Bei Viren unterschiedlichen Genotyps können Unterschiede sowohl in der Persistenz als auch hinsichtlich der Fähigkeit, sich von Person zu Person auszubreiten, gegeben sein. Der Typ GI.3, häufigster GI-Genotyp in Wasserproben, war auch der häufigste GI-Typ bei Epidemien in Gemeinden (21). Viren dieses Genotyps haben 2001 in den USA (22) und den Niederlanden Krankheitsausbrüche verursacht (23).

Wie wegen des ubiquitären Vorkommens zu erwarten (24, 25), war der GII.4 Genotyp bei verschiedenen wasserbedingten Ausbrüchen nachweisbar; in Finnland war er bei allen Epidemien der häufigste Genotyp. Die neue GII.4 Variante tauchte in Finnland im Juni 2002 auf; im darauf folgenden Jahr wurden 2 wasserbedingte Epidemien durch diese neue Variante ausgelöst (20). Ein anderer in Finnland 2001 aufgetauchter Genotyp GIIB, der ein Jahr später auch in südlichen Teilen Europas auftrat, war im Jahr 2002 bei einem wasserbedingten Ausbruch das auslösende Agens. Kürzlich wurde über eine durch Trinkwasser ausgelöste Epidemie in Schweden berichtet, die durch diesen Genotyp hervorgerufen worden war (26).

Die Umweltvirologie zur Entdeckung humanpathogener Erreger hat eine ziemlich begrenzte Geschichte. Ein klassischer Fall ist das Monitoring von Polioviren in Abwässern (27). Die dabei angewandte Methode, basierend auf einer Zellkulturtechnik, ist sensitiv für das Auffinden wild zirkulierender Polioviren. Jahrelang fehlten weitergehende Bemühungen der Umweltvirologie, hauptsächlich wegen des Fehlens geeigneter Methoden. Erst nachdem Genamplifizierungstechniken eingeführt worden waren, konnte ein Instrument entwickelt werden, um erfolgreich Noroviren in Umweltproben zu finden (8,10). In den letzten Jahren hat eine steigende Zahl von Berichten wasserbedingte Norovirus-Epidemien durch kontaminiertes Trinkwasser oder durch zur Erholung genutzte Gewässer beschrieben (22, 23, 28, 29).

Nationale Empfehlungen zu den Probenahmeverolumina von Wasser variieren zwischen 10 und hundert Litern. Solche Mengen bereiten den untersuchenden Laboratorien ein ernstes praktisches Problem. Für den Virennachweis mittels RT-PCR ist, wie von Gilgen et al. vorgeschlagen (12), eine kleinere Menge (1 L) vorzuziehen. Unabhängig von der Konzentrationsmethode setzt gewöhnlich der Anstieg von RT-PCR Inhibitoren der Konzentrie-

## Diskussion

Als Teil des verbesserten und intensivierten Überwachungssystems für epidemische Ausbrüche in Finnland haben wir seit 1998 wasserbedingte virale Epidemien identifiziert. In einer relativ kurzen Zeitspanne, während der die Norovirusdiagnostik sowohl für Patienten- als auch für Umweltproben verfügbar war, wurde eine beträchtliche Zahl von wasserbedingten Norovirus-Epidemien gefunden. Zum Teil können diese zahlreichen Epidemien dadurch erklärt werden, dass in Finnland über 1.300 Trinkwasseraufbereitungsanlagen betrieben werden. Viele dieser Anlagen nutzen noch Oberflächengewässer (Seen oder Flüsse) als Rohwasserquellen. Inadäquate Desinfektion ist dann häufigster Grund für wasserbedingte Epidemien, wie es bei Epidemie E1 der Fall war (10). Ebenso ein Risiko sind Wasserwerke, die Grundwasser ohne Desinfektion nutzen. In Finnland schmilzt im Frühling der Schnee, während der Boden noch gefroren ist, was zum vermehrten Abfluss von Oberflächenwasser und zu Überschwemmungen führt. Undichte Abwasserkanäle in der Nähe von Brunnen verursachten verschiedene große wasserbedingte Epidemien. Unzureichende Abwasserbeseitigung verursachte ebenfalls viele kleine wasserbedingte Epidemien bei Wohn- und Ferienhäusern.

zung von Wasser Grenzen. Sensitive Methoden werden benötigt, um Viren in Umweltproben zu entdecken. Neuere Berichte über die Anwendbarkeit und Sensitivität der real-time RT-PCR (30-32) für Noroviren bieten neue Möglichkeiten, die Sensitivität zu erhöhen. Ein anderer Faktor liegt in der höheren Geschwindigkeit der Tests, was für das Monitoring der Wasserqualität insbesondere bei epidemischen Situationen essentiell ist. Der dritte Vorteil besteht darin, dass ein quantitativer Schätzwert des Kontaminationsgrades gewonnen wird.

Mikrobielle Risiken durch Trinkwasser werden mit starker Betonung der Risikoabschätzung eingestanden (33). Die Überwachung des Wassers hängt trotzdem von Indikatororganismen wie coliformen Keimen oder Enterokokken ab, deren Überlebensrate im Wasser kürzer ist als die von Enteroviren, insbesondere von Noroviren und dem Hepatitis-A-Virus. Deshalb können Viren leicht in „mikrobiell makellosem“ Wasser vorhanden sein (34,35). In Situationen, in denen ein Brunnen durch Abwasser kontaminiert ist, werden nahezu immer coliforme Erreger gefunden. Wenn Abwasser in einen See eingeleitet wird, dessen Wasser stromabwärts als Rohwasser dient, können Indikatororganismen nicht mehr nachweisbar sein, Noroviren hingegen können noch vorhanden sein und Krankheiten verursachen. Diese Abfolge von Ereignissen hat vermutlich zu dem ersten Epidemieausbruch geführt, den wir untersucht haben (E1) (10).

Wenn Wasserwerke Oberflächenwasser nutzen, kann die Kontamination kurzlebig sein und schon verschwunden sein, wenn die Epidemie entdeckt wird. Wegen des Verschmutzungsrisikos könnte in solchen Wasserwerken ein „rollierendes“ System von Probenahmen angewendet werden, mit dem Proben in regelmäßigen Intervallen entnommen werden (z.B. täglich, wöchentlich) und bei 4° C aufbewahrt werden. Solange keine Krankheitsausbrüche auftreten, können die Proben in den gleichen Intervallen verworfen wie neue gezogen werden. Im Falle einer Kontamination würden dann Wasserproben für Analysen vorliegen.

Der mit diesem Beitrag, in Verbindung mit mehreren neueren, oben zitierten Berichten, präsentierte Beweis zeigt die Bedeutung von Viren als Kontaminanten von Trinkwasser. In Finnland hat das Ergebnis, dass Noroviren oft wasserbedingte Epidemien auslösen, zu einer erhöhten Aufmerksamkeit der Behörden für virale Risiken geführt. Als Konsequenz wurden Labortechniken verbessert und die Kapazitäten für Analysen von Umweltproben, insbesondere von Trinkwasserproben, erhöht. Gesetzliche Maßnahmen zur viralen Überwachung des Trinkwassers als Teil des mikrobiellen Risikoassessments der Trinkwasserproduktion sollten ernsthaft erwogen werden.

**Danksagungen:**

Wir danken allen an den Wasseranalysen beteiligten Personen genauso wie dem PCR Labor des Department of Virology der HUCS Laboratory Diagnostics (jetzt HUSLAB).

Diese Studie wurde zum Teil mit Fördermitteln der Akademie von Finnland (42675/98) und durch eine Vereinbarung der Europäischen Kommission (Nahrungsmittelbedingte Viren in Europa, QLK1-1999-00594) unterstützt.

*(Übersetzung ins Deutsche von R. Frentzel-Beyme; Originalarbeit: Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff C-H. (2005): Norovirus Outbreaks from Drinking Water. Emerg Infect Dis 11(11), 2005 Nov (cited 2.3.06, <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no11/05-0487.htm>)*

**Nachweise**

1. WYN-JONES A, SELLWOOD J. (2001): Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 91: 945-962.
2. GREEN KY, CHANOCK M, KAPIKIAN AZ. (2001): Human caliciviruses. In: KNIPE D (ed.): *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 841-874.
3. VINJE J, HAMIDJAJA RA, SOBSEY MD. (2004): 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.* 116: 109-117.
4. KOOPMANS M, VON BONSDORFF CH, VINJE J et al. (2002): Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 187-205.
5. MEAD P, SLUTSKER L, DIETZ V et al. (1995): Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5: 607-625.
6. KAPLAN JE, GOODMAN RA, SCHONBERGER LB et al. (1982): Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis.* 146: 190-197.
7. BLACKBURN BG, CRAUN GF, YODER JS et al. (2004): Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water-United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ.* 53: 23-45.
8. BELLER M, ELLIS A, LEE SH et al. (1997): Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. *International consequences.* *JAMA.* 278: 563-568.
9. Vinje J, Vennema H, Maunula L et al. (2003): International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol.* 41: 1423-1433.
10. KUKKULA M, MAUNULA L, SILVENNOINEN E, VON BONSDORFF CH. (1999): Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 180: 1771-1776.
11. PHLS Communicable Disease Surveillance Centre (1996): Strength of association between human illness and water: revised definitions for use in outbreak investigation. *Commun Dis Rep CDR Wkly.* 6: 65,8.
12. GILGEN M, D GERMANN, LÜTHY J, HÜBNER P. (1997): Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol.* 1997: 189-199.
13. MAUNULA L, PIIPARINEN H, VON BONSDORFF CH (1999): Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. *J Virol Methods.* 83: 125-134.
14. LE GUYADER F, ESTES MK, HARDY ME et al. (1996): Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol.* 141: 2225-2235.
15. WANG J, JIANG X, MADORE HP et al. (1994): Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol.* 68: 5982-5990.
16. GREEN J, GALLIMORE CI, NORCOTT JP, LEWIS D, BROWN DW (1995): Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 47: 392-398.
17. VINJE J, GREEN J, LEWIS DC, GALLIMORE CI, BROWN DW, KOOPMANS MP (2000): Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses." *Arch Virol.* 145: 223-241.
18. KOOPMANS M, VENNEMA H, HEERSMA H et al. (2003): Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis.* 9: 1136-1142.
19. KUUSI M, NUORTI JP, MAUNULA L, MIETTINEN I, PESONEN H, VON BONSDORFF CH (2004): Internet use and epidemiologic investigation of gastroenteritis outbreak. *Emerg Infect Dis.* 10: 447-450.
20. LOPMAN B, VENNEMA H, KOHLI E et al. (2004): Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 363: 682-688.
21. MAUNULA L, VON BONSDORFF C-H (2005): Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002. *J Clin Virol.* Epub 2005 May 20.
22. PARSHIONIKAR SU, WILLIAN-TRUE S, FOUT GS et al. (2003): Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5263-5268.
23. HOEBE CJ, VENNEMA H, HUSMAN AM, VAN DUYNHOVEN YT (2004): Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis.* 189: 699-705.
24. NOEL JS, FANKHAUSER RL, ANDO T, MONROE SS, GLASS RI (1999): Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis.* 179: 1334-1344.
25. FANKHAUSER RL, MONROE SS, NOEL JS et al. (2002): Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 186: 1-7.
26. NYGARD K, TORVEN M, ANCKER C et al. (2003): Emerging genotype (GGIIB) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 9: 1548-1552.
27. LAPINLEIMU K, STENVIK M (1978): The efficacy of polio vaccination in Finland. *Dev Biol Stand.* 41: 137-139.
28. BOCCIA D, TOZZI AE, COTTER B et al. (2002): Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis.* 8: 563-568.
29. ANDERSON AD, HERYFORD AG, SARISKY JP et al. (2003): A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J Infect Dis.* 187: 303-306.
30. KAGEYAMA T, KOJIMA S, SHINOHARA M et al. (2003): Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 41: 1548-1557.
31. HOHNE M, SCHREIER E. (2004): Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol.* 72: 312-319.
32. BEURET C. (2004): Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 115: 1-8.
33. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2004): Guidelines for drinking-water quality. 3rd ed [monograph on the Internet]. 2004 [cited 2005 Sep 8]. Available from [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/)
34. PAYMENT P, FRANCO E, FOUT GS. (1994): Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water-related gastrointestinal illness. *Can J Microbiol.* 40: 805-809.
35. LEES D (2000): Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol.* 59: 81-116.