



Alimentäre Übertragung von Frühsommer- Meningoenzephalitis-Virus



demeter-bw.de

Dominik Moor

NRL für durch Lebensmittel übertragbare Viren



Einleitung

FSME Virus & Vektor

FSME Krankheit

Alimentäre Übertragung

Nachweismethode

Ziegenmilch-Monitoring 2021



Einleitung

- Frühsommer-Meningoenzephalitis, FSME [*EN: Tick-borne encephalitis, TBE*] häufigste virale, durch Zecken übertragene Zoonose in Zentral-/Osteuropa
- Fallmeldungen Schweiz, 2019-2022: 262 / **454** / 285 / 359
- Krankheit wird durch das FSME Virus verursacht
- FSMEV kann beim Menschen grippeartige Symptome verursachen, in schweren Fällen zu Entzündungen des zentralen Nervensystems führen (Hirnhaut, Gehirn, Rückenmark)
- FSMEV Verbreitung: gesamte Schweiz, bis 2000 m ü.M.
- Übertragung auf Menschen v.a. durch Zeckenstiche
- Auch Nutztiere können infiziert werden (Ziegen, Schafe, Kühe)
- FSMEV wird für kurze Zeitdauer über Milch ausgeschieden



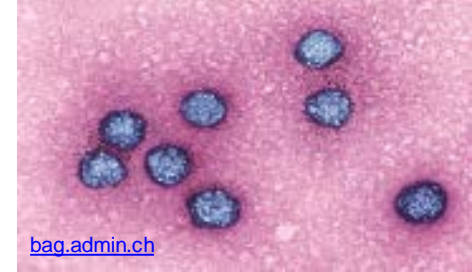
Infektion durch Konsum von kontaminierter Rohmilch und Rohmilch-Produkten (Frischkäse)

- Konsum von Rohmilch-Produkten / unprozessierten Lebensmitteln ist populär
- Impfung gegen FSME ist unpopulär
- Grössere Ausbrüche in Estland, Lettland, Slowakei (rohe Ziegenmilch), Deutschland, Frankreich (Ziegen-Rohmilchkäse)
- Ausbruch in Frankreich 2020 (Auvergne-Rhône-Alpes), 37 Patienten

**Prävalenz von FSMEV in Ziegenrohmilch in Schweiz ?
Bedeutung des alimentären Übertragungsweges ?**



FSME Virus

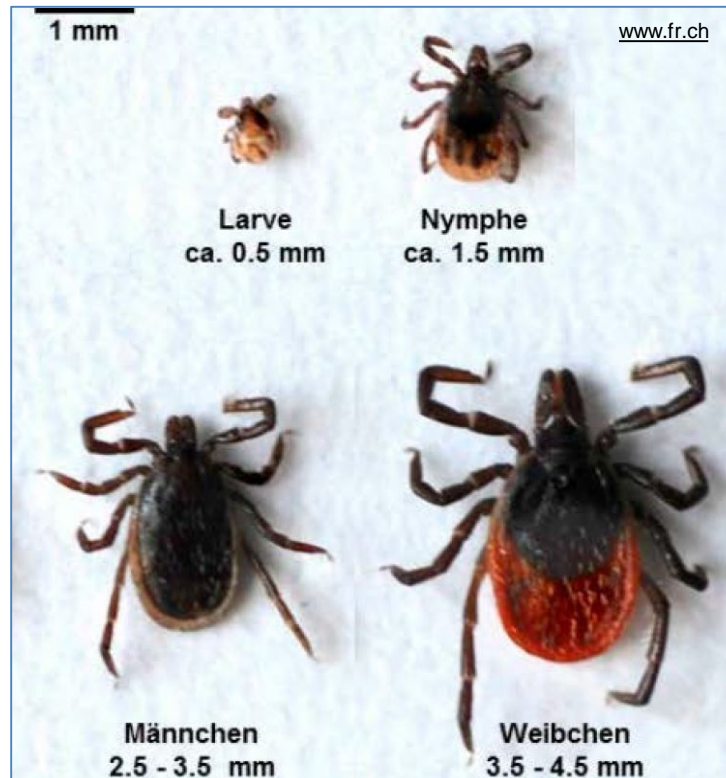


- Behülltes Virus, Genus Flavivirus
- Einzelsträngiges positive-sense RNA Genom, (+)ssRNA
- 3 Subtypen: Far Eastern, Siberian, European
- In Europa nur Europäischer Subtyp verbreitet
- Gemeiner Holzbock (*Ixodes ricinus*)
 - häufigste Zeckenart in Europa
 - hauptsächlicher Vektor von FSMEV



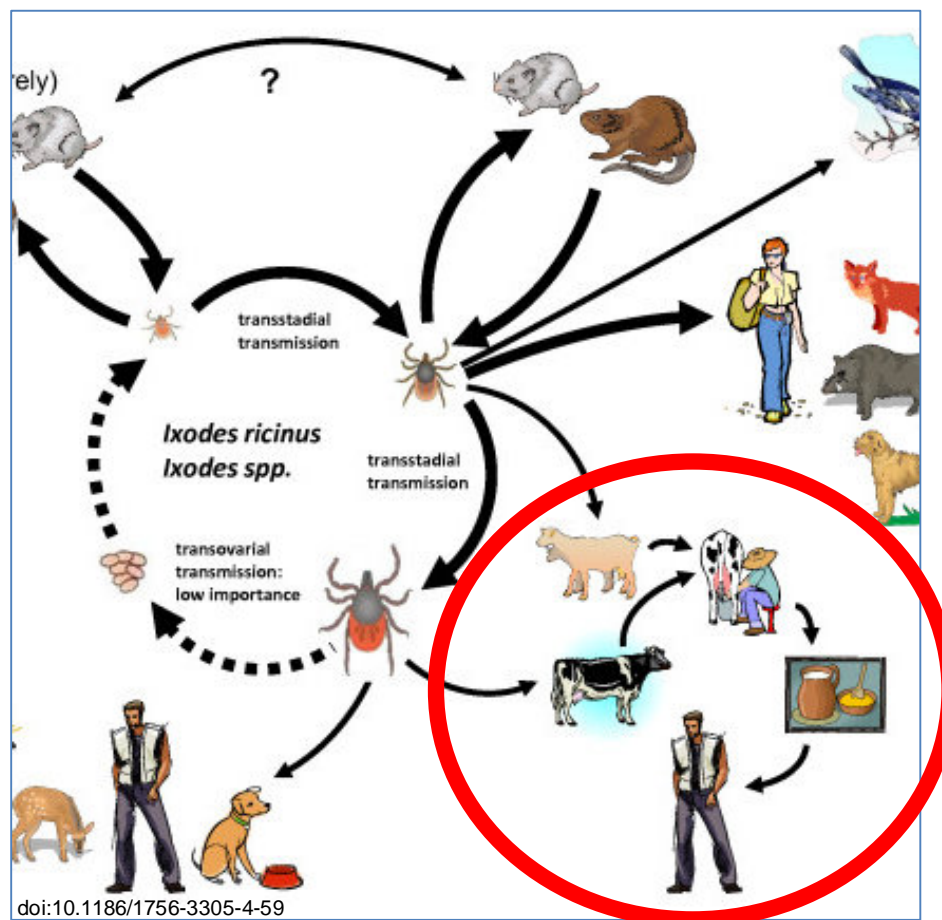


- 3 Entwicklungsstadien: Larve, Nymphe, Adult-Tier
- Zecken werden in L & N Stadien infiziert durch virämische Wirtstiere (Kleinsäuger)
- Für die Wirtstiere ist das FSMEV nicht pathogen





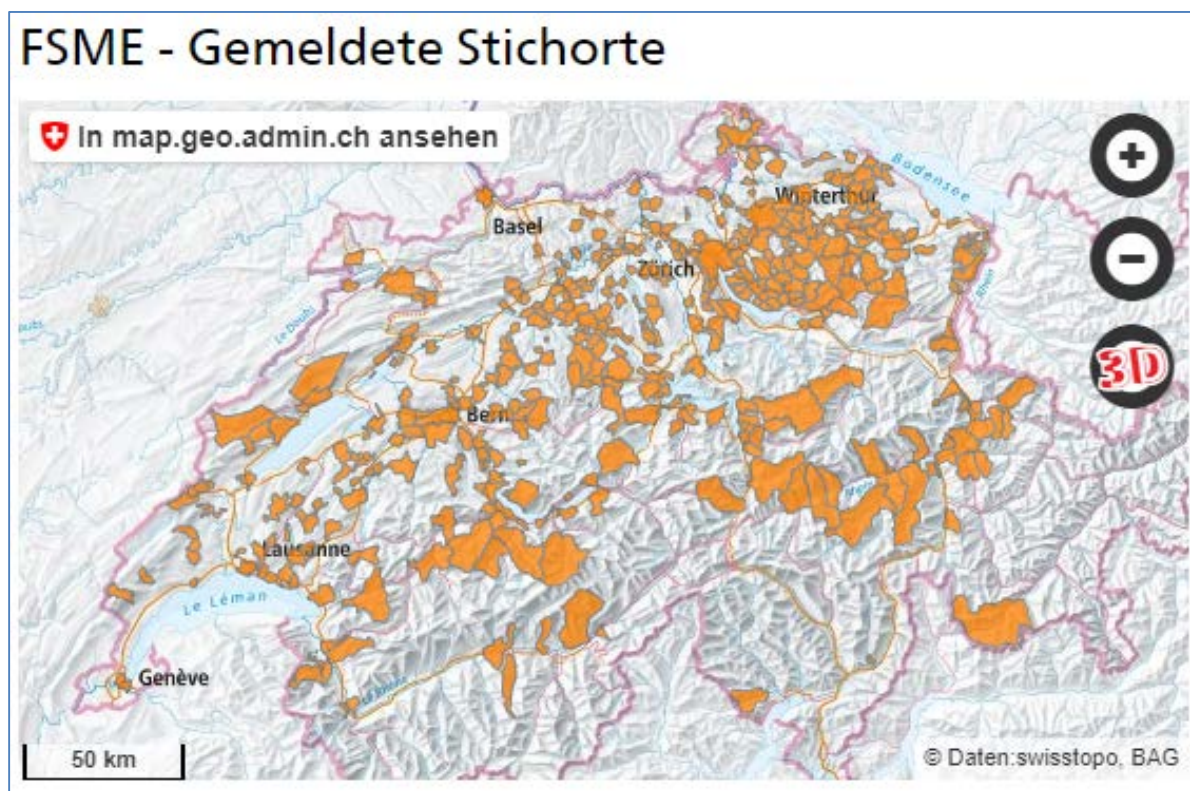
- Lebensraum: Wälder, Gebüsch, Grasland
- Aktivität abhängig von klimatischen Faktoren (Temperatur, Feuchtigkeit)
- FSMEV Übertragungsweg



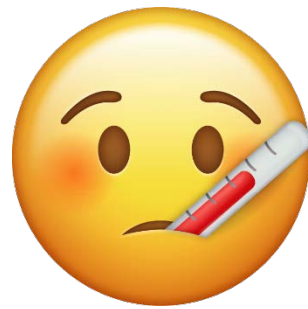
Alimentäre Route



- Verbreitung von FSMEV in der Schweiz: Nordost → Südwest
- Risikogebiet: gesamte Schweiz, Ausnahme Kantone Genf & Tessin (?)
- FSMEV-infizierte Zecken gehäuft in «natural foci» (m² bis km²)



<https://www.bag.admin.ch/bag/de/home/krankheiten/krankheiten-im-ueberblick/fsme.html>



FSME Krankheit

- Inkubationszeit: zirka 7 Tage (4-28 Tage)
- 2/3 der Infektionen verlaufen asymptomatisch
- Zweiphasiger Krankheitsverlauf
- Virämische Phase: Grippe-ähnliche Symptome, zirka 5 Tage (Fieber, Müdigkeit, Kopf-, Gliederschmerzen, Übelkeit)
- Asymptomatische Zwischenphase, zirka 7 Tage
- Zweite Phase: zentrales Nervensystem → neurologische Schäden (Hirnhaut-, Gehirn-, Rückenmarkentzündung, Lähmung), 3 Tage, Wochen, Monate

- Zweiphasiger Verlauf in 20-30% der Fälle (Europäischer Subtyp)
- Schwere neurologische Komplikationen bei zirka 10%
- Mortalitätsrate 0.5-2%



Biphasisches Milchfieber

- Alimentäre Übertragung von FSMEV
- Kürzere Inkubationszeit, 2-4 Tage
- 50% der Fälle einphasiger Krankheitsverlauf:
erhöhter Hirndruck, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Schwäche,
Schwindel, Schläfrigkeit, Lichtempfindlichkeit, etc.
- Zweiphasiger Verlauf
 - erste Phase: visuelle Störungen, Doppelsehen, Fieber
 - zweite Phase: Meningismus (Nackenstarre), Enzephalitis



Alimentäre Übertragung

- Anzahl FSMEV-infizierte Tiere (Ziegen, Schafe, Kühe) in einer Herde ist stark variabel
- FSMEV ist 2-6 Tage nach der Infektion von Tier in der Milch nachweisbar
- FSMEV wird in virämischer Phase während zirka 7 Tagen ausgeschieden
- Infizierte Tiere zeigen keine Symptome
- Serokonversion nach erstmaliger Infektion: spezifische Antikörper
- Wahrscheinlichkeit von FSMEV-kontaminierter Milch sehr gering (0.024%)
[Ingenhoff et al., J Food Safety & Food Quality 71 \(2020\) 110-114](#)
- Inaktivierung durch Pasteurisierung der Milch

Prävalenz von FSMEV / Antikörper

- in Zecken in der Schweiz: 0.46%
- in Ziegen im Kanton Wallis: 4.3%
- in Ziegen im Kanton Tessin: 14.6%



Methodenentwicklung FSMEV-Nachweis in Milch

- **NRL Slowakei:** Zentrifugation, Extraktion mit QIAamp Viral RNA Kit
- **NRL Frankreich (ANSES):** Lyse in TGBE-Puffer, Proteinase K Verdau
[Hennechart-Collette et al., Food Microbiology 61 \(2017\) 113-119](#)

Methodenentwicklung BLV

- **Proben-Matrix:** Ziegenrohmlch (und Frischkäse)
- **Virus-Extraktion:** Zentrifugation
Trizol/Chloroform Extraktion
- **Positiv-Material:** Lysat von FSMEV-infizierter Zellkultur
Natürlich kontaminierte Ziegen- und Schafmilch



Virus-Extraktion

Step	Centrifugation	Trizol/Chloroform extraction
1	300 uL goat milk 10 uL mengovirus → mixing	300 uL goat milk 10 uL mengovirus 300 uL TRI-Reagent Solution 200 uL PBS (for cheese extraction) → mixing
2	centrifugation, 10 min, 6'000 g, 4°C	centrifugation, 15 min, 10'000 g, 4°C
3	aqueous interphase in new EP-tube (ca. 300 uL)	upper, aqueous phase in new EP-tube (ca. 600 uL)
4	RNA-extraction	100 uL Chloroform → mixing → incubation 10 min, RT
5		centrifugation, 15 min, 10'000 g, 4°C
6		upper, aqueous phase in new EP-tube (ca. 500 uL)
7		RNA-extraction
Process control	300 uL PBS 10 uL mengovirus	600 uL PBS 10 uL mengovirus



Resultate

Proben: FSMEV-positive Ziegenrohmilch

RNA-Extraktion: QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen)

RT-qPCR Mix: AqPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Thermo Fisher)
 GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega)

PCR-Assay: TBE-FLI → Klaus et al., 2010, PMID: 21771521
 TBEE → Gäumann et al., 2010, PMID: 20453126
 TBEV → Achazi et al., 2011, PMID: 20933016

Cq-Werte: Mittelwerte von PCR-Duplikaten (*kursiv*: nur 1 Cq-Wert)

	Zentrifugation						Trizol/Chloroform					
	AgPath-ID			GoTaq			AgPath-ID			GoTaq		
	TBE-FLI	TBEE	TBEV	TBE-FLI	TBEE	TBEV	TBE-FLI	TBEE	TBEV	TBE-FLI	TBEE	TBEV
Milch 1	30.88	30.21	39.13	<i>45.00</i>	33.31		26.87	27.13	33.53	30.98	27.75	35.54
Milch 2	34.13	32.74			37.42		30.49	30.62	38.14	36.91	30.37	44.08
Milch 3	<i>40.17</i>			<i>42.55</i>			33.94	33.27	40.99	41.88	33.89	42.58



Proben: FSMEV-positive Ziegenrohmlch, seriell verdünnt (in negativer Milch)

Extraction method	Zentrifugation		Trizol/Chloroform	
	AgPath-ID	AgPath-ID	GoTaq	
RT-qPCR Mix				
PCR-Assay	TBE-FLI	TBE-FLI	TBEE	
Milch unverd.	30.77	28.12	28.71	
Milch 1:4	33.74	29.17	29.32	
Milch 1:16	38.69	31.50	31.82	
Milch 1:64	37.98	33.51	34.11	
Milch 1:256		35.71	34.80	
Milch 1:1024		38.80	37.08	
NTC				

Extraction method	Zentrifugation		Trizol/Chloroform	
	MeV WFR [%]	Amp.Eff. [%]	MeV WFR [%]	Amp.Eff. [%]
Milch unverd.	4.8	69.3	63.1	57.4
Milch 1:4	6.5	72.4	62.6	44.6
Milch 1:16	1.1	86.2	31.5	52.3
Milch 1:64	0.3	89.8	31.2	73.2
Milch 1:256		76.6	32.0	81.2
Milch 1:1024	0.01	75.5	54.5	84.1



Ziegenmilch-Monitoring 2021

- Kontakt zu Firmen die Ziegenmilch verarbeiten:
Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer (BGK)
- 6 grosse Ziegenmilch-Verarbeiter
- 2 Ziegenzüchter (Jura, Kanton Bern)
- Probenerhebung: April-Juli 2021, unpasteurisierte Tankmilch,
2-6 Probenahmen/Woche, Lagerung im Gefrierschrank
- Herdengrösse < 100 Ziegen



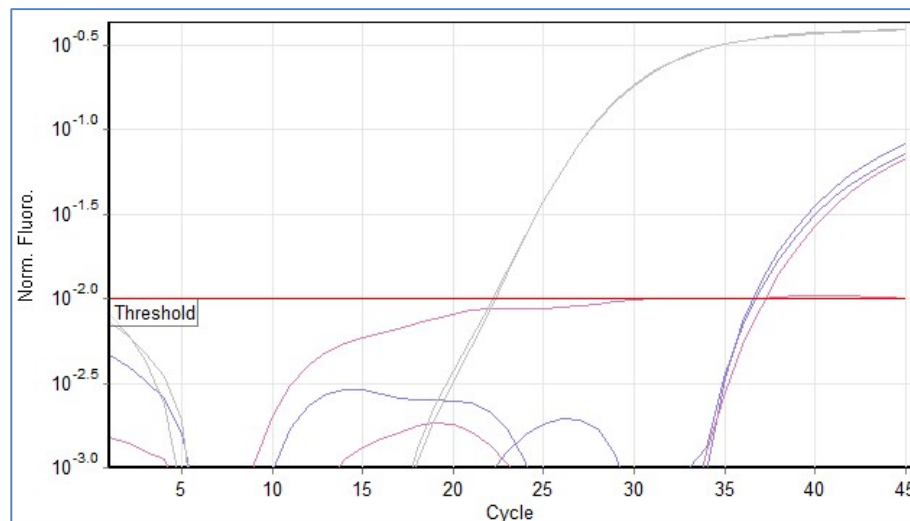
Ergebnisse

Sampling April-Mai: 2 von 89 Proben FSMEV-positiv (2.2%)

Sampling Mai-Juli: 3 von 141 Proben FSMEV-positiv (2.1%)

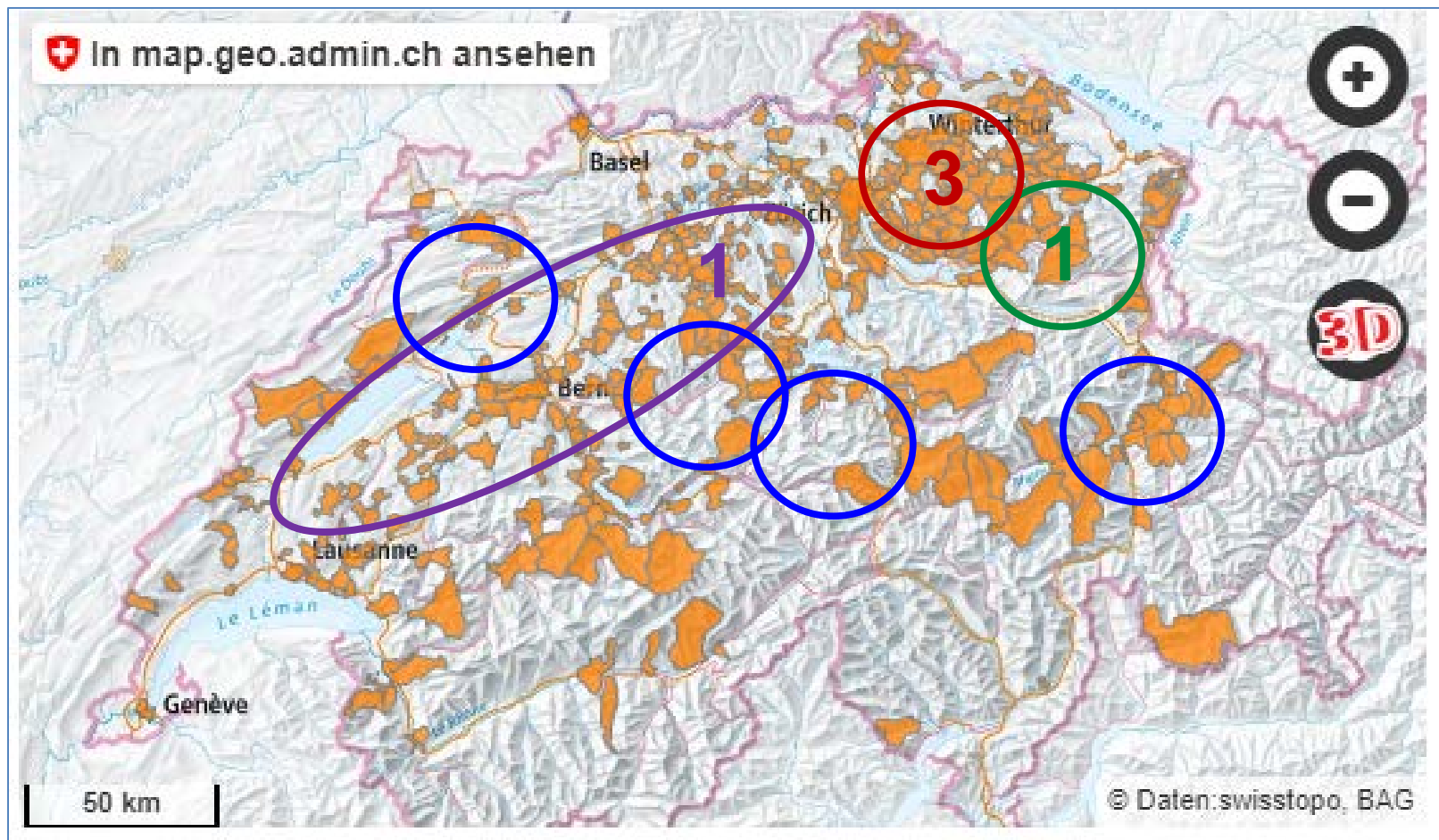
→ **total 5 von 230 Proben FSMEV-positiv (2.2%)**

Hohe Cq-Werte (>36) → tiefe Kopienzahl von Virus-RNA





FSME – Gemeldete Stichorte



Datum Probenahme: **10.05.2021** **20.05. / 28.06. / 29.06.2021** **07.06.2021**



Schlussfolgerungen

- Die entwickelte Methode zum Nachweis von FSMEV in Ziegenrohmilch (und Frischkäse) funktioniert
- FSMEV wurde in Schweizer Ziegenrohmilch nachgewiesen
- Eine Infektion mit FSMEV durch den Konsum von kontaminierter Rohmilch ist möglich
- Die Prävalenz von FSMEV in Ziegenrohmilch ist höher als erwartet
- Die FSMEV-positiven Milchproben stammen aus Regionen mit hoher Anzahl gemeldeter Stichorte
- Die meisten Milchverarbeiter verwenden pasteurisierte Ziegenmilch → kein Risiko für Konsumenten
- «Haushaltmilch» direkt vom Bauernhof wird nicht hitzebehandelt oder getestet
- Über die Infektiosität von FSMEV in positiver Milch ist keine Aussage möglich → weitere Forschungsarbeiten sind notwendig
- Eine wirksame Impfung gegen FSME ist verfügbar



Vielen Dank!

Thomas Manser, Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer (BGK/SSPR)

Mathias Koch, Appenzeller Ziegenprodukte AG

Georg Summer, Bio Käserei Prättigau

Stefan Liem, Emmi Schweiz AG

Hansueli Neuenschwander, Käserei Gohl AG

Patrick Odermatt, Odermatt Käserei AG

Koni Schuppli, Schuppli's Geisse-Chäsi

Christian Criblez

Françoise Härring, Rémy Junod

Rahel Ackermann, Labor Spiez

Lucia Šulejová, State Veterinary and Food Institute, Dolny Kubin, Slovakia

Thomas Berger, Jan-Erik Ingenhoff, Marc Mühlemann, Agroscope

Reimar Johne, Eva Trojnar, Nadine Althof, Bundesinstitut für Risikobewertung BfR

Nadja Peduto, BIO-Labor, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV