

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**HEPATITIS-E-INFektION IN DEUTSCHLAND:  
SEROPRÄVALENZ, MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE UND DIAGNOSTIK**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Maria Preiß

2014



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**HEPATITIS-E-INFEKTION IN DEUTSCHLAND:  
SEROPRÄVALENZ, MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE UND DIAGNOSTIK**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Maria Preiß

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Jilg  
2. Berichterstatter: PD Dr. Kilian Weigand  
Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Entdeckung des Hepatitis-E-Virus.....	1
1.2. Molekularbiologie des Hepatitis-E-Virus.....	2
1.3. Die Hepatitis E.....	5
1.3.1. Pathogenese.....	7
1.3.2. Histologie .....	8
1.3.3. Diagnostik .....	8
1.3.4. Therapie und Prävention .....	9
1.4. Verbreitung und bekannte Infektionswege des Hepatitis-E-Virus .....	10
1.4.1. Bekannte Infektionswege .....	11
1.4.2. Hepatitis E in Deutschland.....	12
1.4.3. Hepatitis E bei Tieren.....	13
1.5. Ziel der Arbeit.....	15
<b>2. Material.....</b>	<b>17</b>
2.1. Geräte.....	17
2.2. Verbrauchsmaterial.....	17
2.3. Chemikalien, Puffer und Reagenzien .....	18
2.4. Kits.....	19
2.5. Enzyme .....	20
2.6. Laborinterne Herstellung .....	20
2.7. Software und Internetressourcen .....	20
2.8. Oligonukleotide .....	21
<b>3. Methoden.....</b>	<b>22</b>
3.1. Direktnachweis von HEV-RNA in Schweineleberproben.....	22
3.1.1. Probengewinnung.....	22
3.1.2. Probenaufarbeitung .....	22
3.1.3. Nukleinsäureisolation.....	22
3.1.4. Isolationskontrolle .....	23
3.1.5. Real-time PCR .....	24
3.1.5.1. Reverse Transkription der RNA .....	25
3.1.5.2. Nachweis von Hepatitis-E-Virusgenom .....	26
3.1.5.3. Nachweis von Enterovirusgenom .....	27
3.1.6. Nested PCR und Genomsequenzierung .....	28
3.1.6.1. Sequenzanalyse.....	31
3.1.7. Speziesspezifizierung des Lebergewebes anhand von mitochondrialer DNA .....	32
3.2. Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus.....	34
3.2.1. Auswahl der Serumproben .....	34
3.2.1.1. Serumproben der regionalen Bevölkerung .....	34
3.2.1.2. Serumproben von Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E .....	34
3.2.2. Nachweissysteme .....	34
3.2.2.1. MP ELISA .....	35
3.2.2.2. Axiom ELISA .....	36
3.2.2.3. Mikrogen recomLine HEV .....	37
3.2.3. Statistische Berechnungen.....	38

---

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1. Untersuchung der Schweineleberproben .....	39
4.1.1. Probengewinnung.....	39
4.1.1.1. Daten zur Probengewinnung.....	39
4.1.1.2. Geographische Verteilung der Supermärkte und Metzgereien .....	40
4.1.2. Anwendung des Isolationskontrollverfahrens .....	42
4.1.3. Speziesspezifizierung der Nukleinsäure anhand von mitochondrialer DNA .....	44
4.1.3.1. Entwicklung .....	44
4.1.3.2. Testergebnisse.....	47
4.1.4. Nachweis von HEV-RNA .....	47
4.1.4.1. Ergebnisse der real-time PCR.....	48
4.1.4.2. Ergebnisse der nested PCR .....	49
4.1.4.3. Analyse der Nukleotidsequenz der Hepatitis-E-Viren.....	50
4.1.4.4. Vergleich der Nukleotidsequenz mit einem Virusstamm eines Patienten .....	56
4.2. Untersuchung der Serumproben .....	57
4.2.1. Auswahl der Serumproben .....	57
4.2.1.1. Serumproben der regionalen Bevölkerung .....	57
4.2.1.2. Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E .....	59
4.2.2. Die Prävalenz der Antikörper gegen HEV in der regionalen Bevölkerung .....	61
4.2.2.1. Testergebnisse nach Zweifachtestung.....	61
4.2.2.1.1. MP ELISA.....	61
4.2.2.1.2. Axiom ELISA IgG .....	63
4.2.2.1.3. Axiom ELISA Ab.....	65
4.2.2.1.4. Mikrogen recomLine HEV IgG .....	67
4.2.2.1.5. Mikrogen recomLine HEV IgM.....	69
4.2.2.2. Darstellung divergenter Ergebnisse .....	69
4.2.2.2.1. MP ELISA IgG .....	70
4.2.2.2.2. Axiom ELISA IgG .....	73
4.2.2.2.3. Axiom ELISA Ab.....	75
4.2.2.2.4. Mikrogen recomLine HEV IgG .....	76
4.2.2.3. Darstellung der Übereinstimmung der Testergebnisse .....	77
4.2.2.3.1. Übereinstimmung einzelner Tests .....	79
4.2.2.3.2. Untersuchung der Faktoren „Alter“ und „Geschlecht“ .....	81
4.2.3. Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus bei Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E .....	85
4.2.3.1. MP ELISA .....	85
4.2.3.2. Axiom ELISA .....	86
4.2.3.3. Mikrogen recomLine HEV .....	87
4.2.3.4. Sensitivität der Testsysteme.....	88
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>89</b>
5.1. Nahrungsmittel als mögliche Infektionsquelle für Hepatitis E in Regensburg.....	89
5.2. Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus in Regensburg.....	96
5.3. Beurteilung der verschiedenen Testsysteme .....	99
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>104</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>8. Eigene Publikationen .....</b>	<b>118</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ggf	gegebenenfalls
HEV	Hepatitis-E-Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ORF	Open reading frame
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Rpm	revolutions per minute
sog	sogenannt
z.B.	zum Beispiel

## **1. Einleitung**

### **1.1. Entdeckung des Hepatitis-E-Virus**

In Delhi erkrankten zwischen 1955 und 1956 über 29000 Menschen an einer fäkal-oral übertragbaren Hepatitis-erkrankung, die durch Ikterus gekennzeichnet war und über das Trinkwasser verbreitet wurde. 25 Jahre später, als verlässliche Tests für Hepatitis A und B zur Verfügung standen, wurden die damals tiefgefrorenen Proben untersucht. Die Ergebnisse deuteten auf ein Virus hin, welches bis dahin unbekannt war, da beide bisher bekannten Hepatitiden als Ursache ausgeschlossen werden konnten.<sup>1</sup>

Zwischen November 1978 und April 1979 kam es in Kashmir ebenfalls zu einem Hepatitisausbruch. Alle Dörfer, in denen Erkrankungen auftraten, bezogen ihr Wasser aus dem gleichen Fluss, Ningli Nallah. Khuroo et al.<sup>2</sup> untersuchten alle Hepatitisfälle und fanden eine komplette Durchseuchung der Bevölkerung bezüglich des Hepatitis-A-Virus, wobei die fehlenden IgM-Antikörper darauf hindeuteten, dass der Kontakt mit diesem Virus schon länger zurückliegen musste und deshalb nicht die Ursache für diese Erkrankungswelle sein konnte. Bis auf das Alter der Betroffenen und die Inkubationszeit ähnelten alle anderen Aspekte der Epidemie bekannten Hepatitis-A-Ausbrüchen.<sup>2</sup>

Diese neue virale Hepatitis wurde also der non-A, non-B Hepatitis zugeordnet, wobei diese zuerst in Zusammenhang mit Bluttransfusionen oder Langzeitdialyse bekannt wurde. Man bekam somit Anhaltspunkte dafür, dass es mindestens zwei unklassifizierte Viren in dieser Gruppe geben musste; die parenteral und die enteral übertragbare Variante.<sup>1,2</sup>

Mikhail Balayan<sup>3</sup>, ein russischer Virologe, wies 1983 in einem Freiwilligenexperiment das Virus elektronenmikroskopisch im Stuhl eines Infizierten nach. Das infektiöse Material bestand aus einer gepoolten Stuhlsuspension von non-A-, non-B-Hepatitis-Erkrankten aus Taschkent. Die Versuchsperson hatte serologisch und anamnestisch eine Hepatitis A durchgemacht und während des Infektionsversuches stiegen weder die spezifischen infektionsserologischen Marker für Hepatitis A noch für Hepatitis B an. In einem zweiten Schritt wurde Makaken das Virus, das im Stuhl des Freiwilligen gefunden wurde, inokuliert, worauf die Affen Infektionszeichen zeigten und ihre Leberwerte anstiegen. Somit war klar, dass die Ursache der Erkrankung ein Virus sein musste, dass enteral übertragbar ist und sich vom Hepatitis-A-Virus und vom parenteral übertragbaren non-A-, non-B-Hepatitis-Virus unterscheiden musste.<sup>3</sup>

Ein entscheidender Schritt bezüglich der Diagnostik des Hepatitis-E-Virus, wie man es nun bezeichnete, wurde 1991 von Reyes et al.<sup>4</sup> und Tam et al.<sup>5</sup> geleistet, indem das Genom eines Hepatitis-E-Virusisolats aus Burma zum ersten Mal kloniert und sequenziert wurde. In den

Jahren 1992, 1997 und 1999 wurden in Mexiko, den USA und in China die Erbinformationen von drei weiteren Virustypen entschlüsselt, die sich stark voneinander und vom Burmatyp unterschieden. Somit waren alle bis jetzt bekannten Genotypen charakterisiert worden.<sup>6,7</sup> Die neuen Erkenntnisse widerlegten eine Verwandtschaft mit den bisher bekannten viralen Hepatitiserreger und ermöglichen die Entwicklung von serologischen und molekularen Nachweismethoden.<sup>4</sup>

## 1.2. Molekularbiologie des Hepatitis-E-Virus

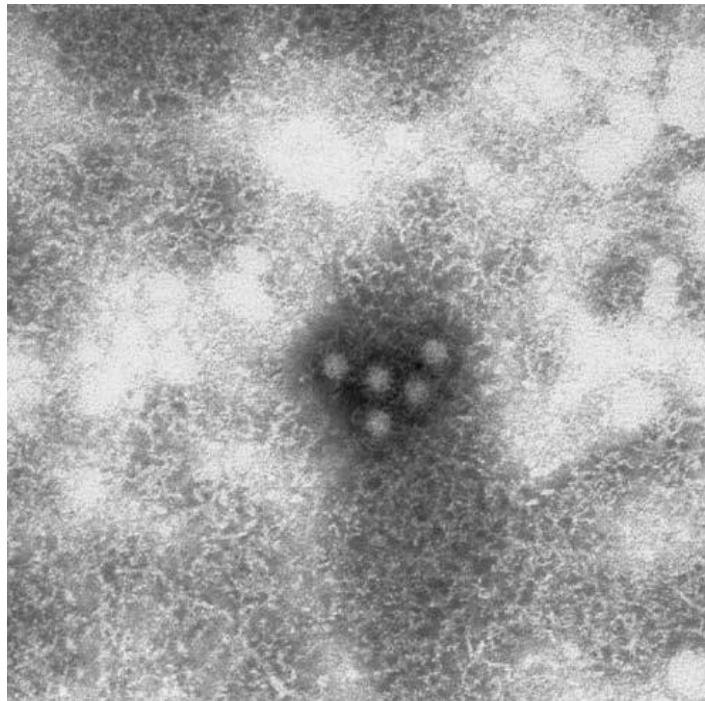
Das Hepatitis-E-Virus (HEV) ist der einzige Vertreter der Gattung *Hepevirus* in der Familie der *Hepeviridae*.<sup>8,9</sup>

Das Virus besteht aus einem unbehüllten ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 27–34 nm und einem einsträngigen, polyadenylierten RNA-Molekül von positiver Polarität mit ~7200 bp Länge. Das Genom besteht aus einer kurzen untranslatierten Region von 27 bp am 5'-Ende gefolgt von drei offenen Leserahmen (ORF), die sich teilweise überlappen, und einer weiteren nicht kodierenden Region von 65 bp am 3'-Ende, die mit einem Poly(A)-Schwanz endet.<sup>5,7</sup>

ORF1 erstreckt sich von Nukleotidposition 28 bis einschließlich 5106 (Isolatname: B1, Genotyp: 1, GenBankAcc.: M73218) und umfasst somit 5079 bp. ORF2 beginnt an Position 5147 und endet an Position 7127, was einer Länge von 1980 bp entspricht. ORF3 überlappt mit den beiden anderen ORFs und erstreckt sich über 369 bp von Position 5106 bis einschließlich Position 5474.<sup>5</sup>

ORF1 kodiert für verschiedene Proteine, die zur Genom-Replikation nötig sind. Darunter befinden sich eine Guanylyltransferase, Methyltransferase, eine Papain-ähnliche-Protease, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und eine RNA-Helikase.<sup>7,10,11</sup> ORF2 kodiert für ein großes Strukturprotein, das Kapsid-Protein, und ORF3 für ein Protein unbekannter Funktion, welches die zelleigenen Signalwege und die immunologische Antwort zu beeinflussen scheint.<sup>10–12</sup>

Die genaue Art und Weise der Expression der genannten Proteine ist noch nicht bestätigt worden, sie ist jedoch durch die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern während einer Infektion sichergestellt.<sup>12</sup> Es gibt Hinweise darauf, dass ORF1 direkt von der genomischen RNA abgelesen wird, wohingegen ORF2 und ORF3 die funktionalen Komponenten des ORF1 benötigen, um überhaupt von derselben subgenomischen RNA, die 2200 Basenpaare lang ist, transskribiert werden zu können.<sup>7</sup>



**Abbildung 1** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Immunaggregates von HEV, isoliert aus der Galle eines experimentell infizierten Makaken (Hepatitis E Virus, Bundesgesundheitsblatt 2008<sup>13</sup>).

Nachdem die Nukleotidsequenzen mehrerer Viren unterschiedlicher Herkunft entschlüsselt waren, wurden verschiedene Einteilungen in Serotypen und Genotypen diskutiert. Man einigte sich schließlich auf einen Serotyp, der vier Genotypen (1–4) beinhaltet.<sup>7,14</sup> Die Zuordnung zu den vier Genotypen beruht meist auf der Analyse des gesamten Genoms<sup>15</sup> oder der Analyse einer 371 bp-langen Region des ORF1.<sup>14,16</sup> Der Hepatitis-E-Vogelvirostyp, der oft bei Hühnern auftritt und zu zirka 50 % Übereinstimmung im Genom zu den anderen vier Genotypen aufweist, wird von manchen Autoren als fünfter Genotyp bezeichnet<sup>17</sup> und von anderen in eine eigene Gattung<sup>18–20</sup> eingeordnet. Neuere Studien haben genetisch gesehen neue Virusstämme in Ratten und Wildschweinen gefunden, die bislang nicht in das bestehende System der vier Genotypen einzuordnen sind.<sup>21,22</sup>

Die vier Gruppen, die bei Säugetieren vorkommen, haben charakteristische geographische Verteilungsmuster, wie Abbildung 2 zeigt:

Genotyp 1 wird in Asien und Afrika vorgefunden, Genotyp 2 in Mexiko und Afrika, Genotyp 3 hauptsächlich in industrialisierten Ländern wie den USA, Japan und europäischen Ländern (aber auch im Rest der Welt) und Genotyp 4 in Asien und vereinzelt in Europa.<sup>7,14</sup>

Die Genotypen werden wiederum in mehrere Subtypen unterteilt, wobei Genotyp 1 durch fünf (a-e) und Genotyp 2 durch zwei (a,b) Subtypen gekennzeichnet ist. Die Genotypen 3 und 4 sind sehr verschiedenartig und in zehn (a-j) bzw. sieben (a-g) Subtypen unterteilt.<sup>15</sup>

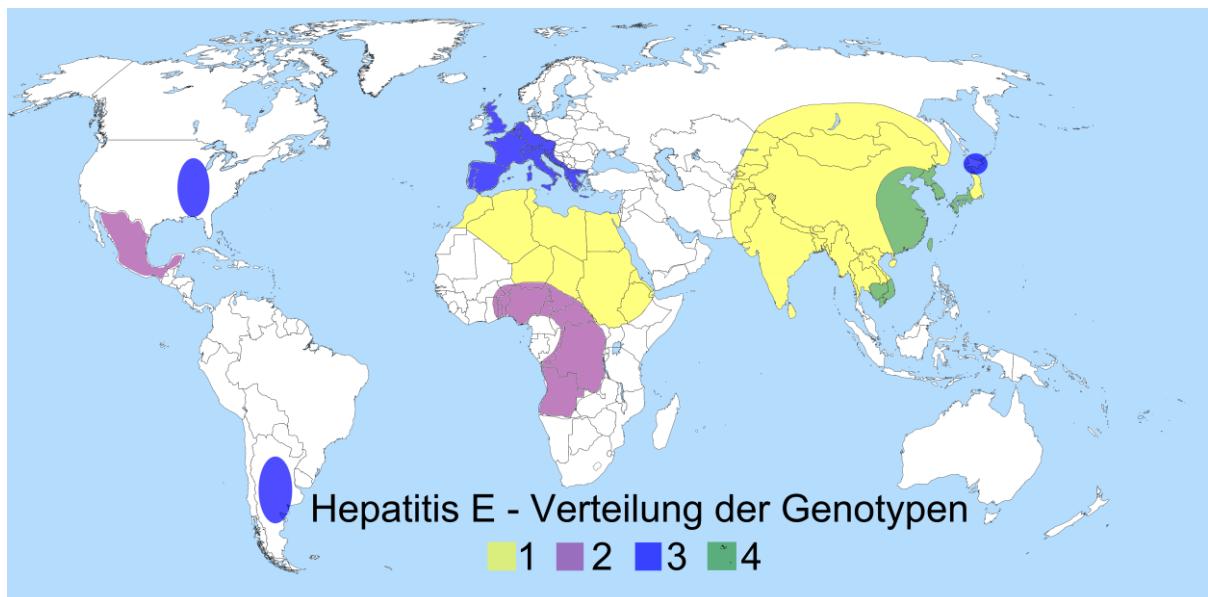


Abbildung 2 Geographische Verteilung der vier Genotypen des Hepatitis-E-Virus (Quelle der Weltkarte: wikipedia.de).

### 1.3. Die Hepatitis E

Eine Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus zeigt sich durch das Auftreten klinischer Symptome, wobei ein nicht zu unterschätzender Anteil der Erkrankungen subklinisch verläuft und somit nicht diagnostiziert wird.<sup>23,24</sup> Die höchste Zahl von ikterischen Erkrankungen in Endemiegebieten wird bei jungen Erwachsenen und Erwachsenen mittleren Alters angegeben; die niedrige Erkrankungsrate bei jüngeren Altersgruppen könnte durch einen höheren Anteil von symptomfreien Infektionen verfälscht werden. Warum jedoch die Zahl der symptomatischen Männer die der Frauen übersteigt, ist noch unklar.<sup>25–27</sup>

Der Infektionsweg ist meist fäkal-oral durch kontaminiertes Trinkwasser (Genotyp 1) oder Nahrungsmittel, wobei auch der perinatale und der parenterale Übertragungsweg beschrieben wurde.<sup>28–31</sup>

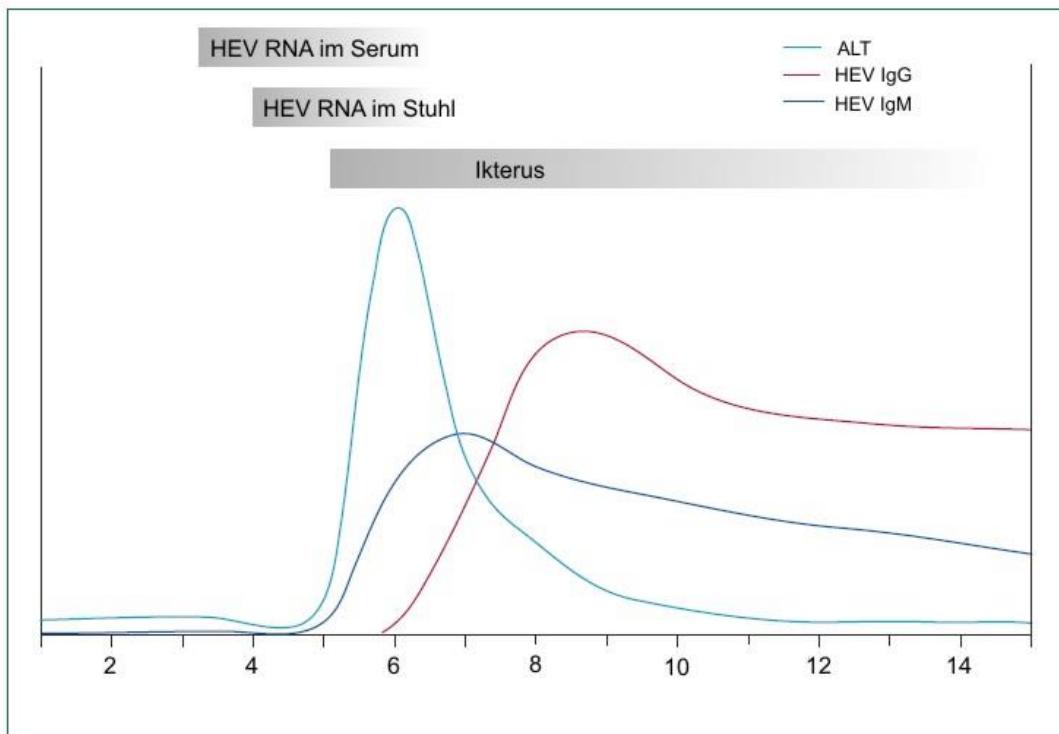
Der Krankheitsverlauf ist meist akut und selbstlimitierend, kann aber auch fulminante Verläufe annehmen und bei bestehender Immunsuppression, hämatologisch Erkrankten und HIV-positiven Personen chronifizieren.<sup>2,17,22,32</sup> Die Letalität in der Allgemeinbevölkerung liegt bei 1–4%, bei Schwangeren kann sie jedoch bis zu 20% betragen und bei vorgeschädigter Leber bis zu 70%.<sup>17,33</sup>

Die Symptome reichen von Gelbsucht, dunkel gefärbtem Urin, Hepatomegalie und Pruritus über Abdominalbeschwerden, Übelkeit und Erbrechen bis zu Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Fieber und Kopfweh.<sup>34–37</sup> In manchen Fällen wird auch von Exanthemen, Arthralgien, Splenomegalie und neurologischen Symptomen berichtet.<sup>22,25</sup> Bei Patienten mit schwerem Verlauf können sich eine Enzephalopathie ausbilden und Gerinnungsstörungen auftreten.<sup>33</sup>

Die charakteristischen klinischen Eckdaten der Infektion wurden hauptsächlich durch Experimente mit Makaken und Menschen, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt haben, entdeckt. Im Folgenden sind die Ergebnisse aufgeführt und in Abbildung 3 veranschaulicht, die bei der Untersuchung von infizierten Menschen gewonnen wurden:

Die ikterische Phase der Erkrankung begann um den Tag 36–38 nach der Infektion und dauerte bis Tag 120, wobei die prodromale Allgemeinsymptomatik mit Appetitlosigkeit, Oberbauchbeschwerden und verfärbtem Urin bereits an Tag 30 auftrat. Die Alanin-Aminotransferase-Spiegel erreichten um den Tag 46 ihr Maximum und blieben bis drei Monate nach der Infektion erhöht. Die RNA des Virus konnte von Tag 22 bis Tag 46 im Serum nachgewiesen werden und von Tag 28–38 bis Tag 46 im Stuhl, wobei die RNA-Konzentration im Serum in der präikterischen Phase am höchsten war. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Zeitspanne, in der das Virus im Stuhl ausgeschieden wurde, die virämische Phase um zwei Wochen überschritt. Der Anstieg der IgM-Antikörper begann

vor dem Erreichen des ALT-Maximums, wobei die IgM-Antikörper mehrere Monate im Serum des Patienten nachgewiesen werden.<sup>25</sup> An Tag 41 traten die ersten IgG-Antikörper im Blut auf und konnten zwei Jahre später immer noch nachgewiesen werden.<sup>3,38</sup> Es wird diskutiert, ob die IgG-Antikörper lebenslang im Serum detektiert werden können, ein Persistieren bis zu 14 Jahren konnte bereits nachgewiesen werden. Solange ein IgG-Antikörpertiter besteht, geht man davon aus, dass eine neuerliche Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus nicht stattfinden kann.<sup>39-41</sup>



**Abbildung 3** Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes nach Wochen post infectionem (modifiziert nach Dalton et al. 2008<sup>24</sup>).

Kürzlich wurde entdeckt, dass bei Immunsupprimierten, wie z.B. Empfängern von Organtransplantaten, eine Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus einen chronischen Verlauf mit anhaltend erhöhten ALT-Werten, verlängerter Virämiedauer und histologisch gesicherter Hepatitis bis zur Zirrhose nehmen kann. Die Patienten, bei denen die Infektion chronisch wurde, wurden vergleichsweise früher nach der Transplantation infiziert, hatten eine spätere Serokonversion und eine stärkere Immunsuppression, als Patienten bei denen die Infektion akut und selbstlimitierend verlief.<sup>32,42</sup>

### 1.3.1. Pathogenese

Das Virus vermehrt sich nach der oralen Aufnahme zuerst im Gastrointestinaltrakt und gelangt daraufhin über das Blut in die Leber. Die Virionen werden ins Blut freigegeben und über Galle und Stuhl ausgeschieden.<sup>13</sup>

Der Mechanismus, über den das Virus vom Intestinaltrakt in die Leber gelangt, ist noch ungeklärt. In Experimenten mit Makaken waren Antigene des Virus, als Zeichen der Replikation, sieben Tage nach der Infektion in Hepatozyten zu finden. Kurz darauf konnte Virusgenom in Stuhl und Galle nachgewiesen werden, was zeitlich vor dem ALT-Anstieg und den morphologischen Veränderungen in der Leber lag. Die Viruslast erreichte 70–90 % in den Leberzellen und sank nach dem ALT-Spitzenwert rasch wieder ab.<sup>25</sup>

Da der ALT-Spiegel, als Marker für die Leberschädigung, nach Beginn der Virämie ansteigt und vor Ende der Virämie wieder zu sinken beginnt und die histologischen Veränderungen der Leber der Virämie folgen, wird angenommen, dass die Leberschädigung nicht nur durch die Virusvermehrung entstehen kann. Entweder verlassen die replizierten Virionen die Leberzellen ohne die Leberzellen irreversibel zu schädigen oder die Virionen vermehren sich auch in anderen Geweben.<sup>25,37</sup> Hinweise darauf konnten bei infizierten Schweinen gefunden werden, wo das Virus auch in Magen, Darm, Milz, Niere und Lunge repliziert wurde.<sup>18</sup>

Die Inokulationsdosis und die Eigenschaften des jeweiligen Virus haben Einfluss darauf, ob es zu einer Virusreplikation, einer Leberschädigung oder zu einer verspäteten Antikörperproduktion kommt.<sup>25</sup>

Die Ursache der Krankheitserscheinungen durch das Hepatitis-E-Virus ist noch nicht geklärt, wobei es zwei Theorien dazu gibt. Entweder liegt das Auftreten der Krankheit an der Leberzellenschädigung durch immunologische und zytopathische Effekte der exprimierten Genprodukte oder an einer Vaskulitis, die durch die viralen Antigen-Antikörper-Komplexe verursacht wird.<sup>30,43</sup>

### 1.3.2. Histologie

Die akute Leberentzündung bei der autochthonen Hepatitis E gleicht anderen akuten viralen Hepatitiden und zeichnet sich durch morphologische Unregelmäßigkeiten in den lobulären Strukturen aus. Diese Unregelmäßigkeit entsteht durch Anisokaryose, ballonierte Zellen, zweikernige Zellen, Degeneration der Hepatozyten und Kupffer-Zell-Knötchen. Die Portalfelder sind durch ein granulozytäres und lymphozytäres Infiltrat erweitert, wobei sich die Granulozyten in der Läppchenperipherie und der Grenzzone befinden und die zentrale Infiltration durch Lymphozyten entsteht. Zusätzlich können intralobuläre Nekrose und Cholangitis beziehungsweise Cholestase auftreten. Typischerweise zeigt sich die Hepatitis-E-assoziierte Cholestase mit pseudoglandulärer Transformation und Proliferation der Gallengänge.<sup>25,44,45</sup>

Die Abgrenzung der autochtonen Hepatitis E erfolgt histologisch dadurch, dass die importierte Hepatitis E und die Hepatitiden anderer Genese durch eine geringere Menge entzündlichen Infiltrats mit fehlender geographischer Verteilung und durch weniger Kupffer-Zell-Aggregate auffallen.<sup>44</sup>

Manche Autoren unterscheiden zwischen einem „klassischen“ und einem „cholestaticischen“ Typ der histopathologischen Veränderungen, wobei beim Ersten die Anisokaryose im Vordergrund steht und beim Zweiten die Cholestase in den Canaliculi und Parenchymzellen.<sup>25,46</sup>

Die chronische Infektion bei immunsupprimierten Patienten zeigt sich als ausgedehnte Fibrose und portale und lobuläre Hepatitis.<sup>32,42</sup>

### 1.3.3. Diagnostik

Bevor molekulare Nachweismethoden wie die PCR verfügbar waren, konnte der Virusnachweis ausschließlich über die elektronenmikroskopische Darstellung in einer Stuhlprobe erbracht werden, wie in Abbildung 1 auf Seite 3 zu sehen ist.<sup>13</sup>

Derzeit ist der sicherste Weg eine akute Hepatitis E nachzuweisen die HEV-RNA-PCR, die zwischen Tag 6 und Tag 40 nach der Infektion bei Blut- oder Stuhlproben das Virus finden sollte. Da es bei fast allen Patienten zu einer Virämie kommt, aber nicht immer zur fäkalen Ausscheidung, sollte bei einer Untersuchung mittels PCR nicht nur eine Stuhlprobe sondern auch eine Serumprobe untersucht werden.<sup>13,30,37</sup>

Als serologische Nachweismethoden stehen kommerzielle Antikörpernachweissysteme wie ELISA oder Immunoblots auf der Basis rekombinanter Antigene zur Verfügung.<sup>13,30</sup> Die Sensitivität und die Spezifität der vorhandenen Testsysteme variieren in unterschiedlichen

Studien sehr stark<sup>47,48</sup>, deswegen sollten die Testergebnisse im Zweifel hinterfragt, mit einem anderen Test bestätigt und im klinischen Zusammenhang objektiviert werden.

Die Diagnose sollte gestellt werden, wenn zum ersten Mal positive Antikörperspiegel gemessen werden, die entsprechenden Symptome vorliegen und die Hepatitiden A, B und C ausgeschlossen wurden. Zur Bestätigung sollte der Antikörperspiegel in einer zweiten Probe im Abstand von 10 Tagen weiter angestiegen sein.<sup>13</sup>

Nach wie vor wird das Hepatitis-E-Virus als Ursache für eine akute Leberentzündung eher selten in Betracht gezogen, sofern keine entsprechende Reiseanamnese vorliegt.<sup>35,49</sup> So zeigten Dalton et al.<sup>50</sup>, dass die Diagnose einer medikamentös induzierten Leberschädigung ohne Ausschluss einer Hepatitis E zu oft gestellt wird.

Besonders in Fällen von ungeklärten Leberentzündungen bei Immunsupprimierten sollte eine Untersuchung des Blutes auf HEV-RNA erfolgen, da die Antikörper aufgrund der unterdrückten Immunantwort erst spät auftreten können.<sup>42,51–53</sup>

#### *1.3.4. Therapie und Prävention*

Abgesehen von allgemeinen Hygieneverbesserungen und Verbesserung der Trinkwasserreinheit könnte einer HEV-Infektion nur durch eine Impfung vorgebeugt werden. Bisher haben zwei Impfstoffe (rHEV, HEV 239) die Phase II- und III-Studien abgeschlossen.<sup>25,54</sup> HEV 239 ist seit Kurzem für den Gebrauch in China lizenziert.<sup>55</sup> Besonders für die Gruppen der Bevölkerung, bei denen eine Hepatitis-E-Erkrankung oft sehr schwer verläuft, wie Schwangere, chronisch Leberkranke und Transplantations-Patienten, wäre eine Impfung sinnvoll.<sup>36</sup>

Die aktuelle Therapie dieser Infektion bei leichten Verläufen ist rein symptomatisch. Bei fulminanten Verläufen, die sich zum Leberversagen weiterentwickeln können, sollte rasch eine Lebertransplantation erwogen werden, um den Patienten adäquat zu therapieren.<sup>24</sup> Neuere Entwicklungen zeigen, dass sowohl pegyliertes Interferon alfa als auch Ribavirin bei transplantierten Patienten eine Therapieoption darstellen.<sup>22</sup>

#### 1.4. Verbreitung und bekannte Infektionswege des Hepatitis-E-Virus

Um Unterschiede in der Verbreitung des Hepatitis-E-Virus zu verstehen, muss zunächst einmal zwischen der endemischen Verbreitung, wie sie in Zentralamerika, Asien, Afrika und im Mittleren Osten vorkommt, und dem sporadischen Auftreten in Industrieländern, wie in den USA und in europäischen Ländern, unterschieden werden.<sup>25</sup>

Die endemischen Regionen sind durch regelmäßige Ausbrüche von Hepatitis-E-Epidemien gekennzeichnet. Hierbei erfolgt die Übertragung des Virus fäkal-oral über kontaminiertes Trinkwasser, selten auch über kontaminierte Nahrungsmittel. Die weitere Verbreitung von Mensch zu Mensch ist sehr selten, kann aber unter sehr schlechten hygienischen Bedingungen gelegentlich vorkommen.<sup>25,31,56</sup>

Der erste untersuchte Ausbruch von Hepatitis E ereignete sich zwischen 1955 und 1956 in Delhi (Indien). Zu dem Zeitpunkt wurde die Infektion noch als non-A, non-B Hepatitis deklariert. Von da an wurden viele Ausbrüche aufgezeichnet – viele im Abstand von wenigen Jahren –, die mehrere Tausend Fälle aufwiesen. Im Nordwesten Chinas waren zwischen 1986 und 1988 über 100000 Personen von der Infektion betroffen.<sup>25</sup>

In den Ländern, in denen Hepatitis E nicht endemisch auftritt, handelt es sich, sofern das Virus nicht bei einem Aufenthalt in einem endemischen Gebiet aufgenommen wurde, um einzelne autochthone Fälle, die zu keiner Mensch-zu-Mensch Verbreitung in der Bevölkerung führen.<sup>16,40,57</sup> Die niedrige Zahl von akuten Hepatitis-E-Fällen in diesen Ländern steht im Kontrast zum relativ hohen Prozentsatz von Personen (bis zu 33 %), die Antikörper gegen das Virus in ihrem Blut aufweisen. Deshalb geht man davon aus, dass etliche Hepatitis-E-Erkrankungen symptomlos verlaufen und somit nicht in den Statistiken auftauchen.<sup>25,58</sup>

So wurden bei Untersuchungen von Blutspendern in Japan bei 7,1 % HEV-spezifische Antikörper gefunden, in den Niederlanden bei 2,0 %, in Spanien 2,8 %, in Frankreich 3,2 %, in Neuseeland 4,0 % und in Deutschland 6,8 %.<sup>13,30,59</sup>

In endemischen Ländern liegt die Rate an Antikörper-positiven Blutspendern tendenziell höher, so z.B. im Iran bei 7,8 %, in Albanien bei 12,1 %, in China bei 43 % und in Ägypten bei 45,2 %.<sup>30</sup>

Auch die Altersverteilung der Infizierten weist einen Unterschied zwischen endemischen Ländern und nicht endemischen Ländern auf. So erkranken in endemischen Ländern eher die jungen Erwachsenen, wobei die sporadischen Infektionen mit den Genotypen 3 und 4 vor allem Personen ab 50 Jahren oder Immunsupprimierte betreffen.<sup>17</sup>

#### *1.4.1. Bekannte Infektionswege*

Das Hepatitis-E-Virus gehört, wie das Hepatitis-A-Virus, zu den klassischen enteral übertragbaren Hepatitiserregern. Es ist jedoch noch nicht geklärt, wie und wo das Virus zwischen den großen Ausbrüchen in endemischen Ländern persistiert.<sup>30,31</sup>

Eine Möglichkeit wäre ein Reservoir in der Umwelt, so z.B. die Verbreitung des Virus im Tierreich.

Die zweite Theorie besagt, dass unerkannte sporadische Fälle zwischen den Ausbrüchen für die Kontinuität des Virus in der Bevölkerung sorgen. Hierfür würde auch die mit dem Alter ansteigende Antikörperprävalenz der Kinder und Jugendlichen in endemischen Ländern sprechen, die bis zum Erwachsenenalter 40 % erreicht.<sup>25,31,60,61</sup> Die anti-HEV Seroprävalenz erreicht jedoch nicht die typischen Charakteristika eines enteral übertragbaren Virus, wie z.B. das Hepatitis-A-Virus, bei dem die Infektion im frühen Kindesalter auftritt und nahezu alle Personen im Erwachsenenalter bereits einmal Kontakt hatten.<sup>17</sup>

Als in Frankreich und im Vereinigten Königreich zwei Personen durch Erythrozytenkonzentrate von erkrankten Spendern infiziert wurden, zeigte sich, dass ein weiterer Übertragungsweg durch Bluttransfusionen gegeben ist.<sup>28,29,62,63</sup> Untermauert wird dies durch die erhöhte anti-HEV Antikörpertyp bei Hämodialysepatienten und mehrfach transfundierten Patienten.<sup>30</sup>

Kumar et al.<sup>64</sup> zeigten als letzte Möglichkeit die perinatale Übertragung von der Mutter auf ihr Kind auf, wobei 26 von 26 Kindern von infizierten Müttern nach der Geburt Hepatitis-E-Virusgenom im Blut hatten.

#### *1.4.2. Hepatitis E in Deutschland*

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts gab es auch in Deutschland epidemische Ausbrüche einer enteral übertragbaren Virushepatitis. Die Tatsache, dass hierbei hauptsächlich junge Erwachsene betroffen waren und Schwangere eine hohe Sterblichkeit aufwiesen, lässt den Schluss zu, dass damals Hepatitis E auch in Deutschland endemisch verbreitet war.<sup>17</sup>

Seit Nachweissysteme für das Hepatitis-E-Virus zu Verfügung stehen, wurden in Deutschland immer mehr Infektionen diagnostiziert. Die anfängliche Annahme, es handle sich hierbei ausschließlich um importierte Fälle aus endemischen Ländern, wurde bald fallengelassen und ein Zusammenhang zwischen der Infektion und dem Konsum von Innereien und Wildschweinfleisch gefunden. Seither steigt die Zahl der gemeldeten Fälle konstant an, da seit 2001 in Deutschland Meldepflicht besteht. Im Jahr 2009 wurden 108 Fälle gemeldet, von denen 81 % der Patienten Deutschland als Ort der Infektion angegeben hatten und somit als autochtone Infektionen gelten.<sup>34,35,58,65</sup> Im Jahr 2013 wurden schon 442 Fälle gemeldet.<sup>66</sup>

Die größte Zahl dieser Infektionen erfolgt durch Viren des Genotyps 3.<sup>17,34</sup> Diese sind im Tierreich weit verbreitet, so dass dies auf einen möglichen zoonotischen Ursprung der Infektionen hindeutet.<sup>27,67</sup>

Untermauert wird diese These durch die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die bei 14,9–64,8 % der Haus- und Wildschweine Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus nachgewiesen haben.<sup>47,68,69</sup> Als Übertragungswege für diese Infektionen kommen somit nicht durchgegartes Fleisch und Innereien, selten infizierte Blutprodukte oder bisher unbekannte Wege in Frage.<sup>23,30,34,67</sup>

#### 1.4.3. Hepatitis E bei Tieren

Es wird zunehmend wahrscheinlicher, dass die durch den Genotyp 3 des Hepatitis-E-Virus hervorgerufene Infektion eine Zoonose ist. 1997 wurde zum ersten Mal Hepatitis E des Genotyps 3 in Schweinen nachgewiesen. Seither ist bekannt, dass Schweine in vielen Regionen der Welt eine hohe anti-HEV Seroprävalenz (in Japan bis zu 100 % der Schweine im Alter von 6 Monaten) aufweisen und die Ähnlichkeit der Viren, die aus Schweinen isoliert wurden, zu denen, die bei Menschen gefunden wurden, sehr groß ist.<sup>30,70–76</sup>

Auch die Möglichkeit von Kreuzinfektionen zwischen verschiedenen Spezies besteht, da eine Infektion durch das identische Virus bei Primaten und Schweinen und bei Schweinen und Menschen schon früh bewiesen wurde.<sup>77,78</sup>

Bisher wurden Antikörper gegen HEV in Katzen, Hunden, Schafen, Ziegen, Pferden, Affen, Eseln und Mäusen detektiert.<sup>18,24,71</sup>

Der Nachweis von HEV-RNA gelang neben Hausschweinen in Wildschweinen, Hirsch, Mungos, Ratten, Hasen, Rindern, Hühnern, Schafen und Muscheln. In allen Tieren wurde bisher Genotyp 3 oder 4 bzw. bisher nicht klassifizierte Typen nachgewiesen.<sup>21,24,27,80</sup> Die Ursachen für die unterschiedlichen Wirtseigenschaften der verschiedenen Genotypen sind bis jetzt noch nicht geklärt.<sup>7,17,24</sup>

Die meisten Anhaltspunkte aus diversen Studien sprechen im Moment bei Genotyp-3- und Genotyp-4-Infektionen für einen Übertragungsweg, der mit Schweinen und Wild assoziiert ist:

Untersuchungen in Spanien, Frankreich und Dänemark zeigen, dass zu einem beliebigen Zeitpunkt zwischen 20 % und 55 % der Schweine in einem Schweinemastbetrieb HEV-RNA ausscheiden und dadurch das Virus in die Umwelt gelangt.<sup>75,80–82</sup> Zudem haben Tiermediziner und Personen, die in der Schweinemast und im schweineverarbeitenden Gewerbe tätig sind, eine höhere Antikörperprävalenz und scheinen daher ein höheres Risiko aufzuweisen sich mit HEV zu infizieren.<sup>71,74,83,84</sup> Im Tierreich scheint sich die Infektion sehr effektiv auszubreiten. Bouknegt et al.<sup>85</sup> berechneten unter experimentellen Bedingungen eine Basisreproduktionsrate  $R_0$  von 8,8 pro infiziertem Tier, d.h. ein erkranktes Tier kann bis zu neun weitere anstecken und so die Infektion in einer Herde verbreiten.

Mittlerweile steht nicht nur der Kontakt mit Tieren sondern auch der Verzehr von Nahrungsmitteln, die Fleisch enthalten, als mögliche Infektionsquelle in Verdacht, da in Japan das fast identische Virus in Patienten und in schlecht gebratenem Fleisch von Hirsch und Wildschweinen gefunden wurde.<sup>24,86–88</sup> Die Übertragung des Virus zwischen den Spezies findet in der Wildbahn vermutlich häufiger statt, so dass eine hohe Ähnlichkeit der Virustypen bei Wildtieren besteht.<sup>88</sup>

Der Konsum von Schweineleber und Innereien geht mit einem erhöhten Risiko einer Hepatitis-E-Infektion einher, wie einzelne Fälle vermuten lassen.<sup>89,90</sup> Wichmann et al.<sup>34</sup> wies in einer in Deutschland durchgeföhrten Fall-Kontroll-Studie nach, dass der Konsum von Innereien und Wildschweinfleisch ein Risikofaktor für eine autochton HEV-Infektion ist. Weitere Analysen zeigten den Zusammenhang von Schweinefleischgenuss und der Letalität bei chronischen Lebererkrankungen und bewiesen, dass Schweineleberkonsum das Risiko für eine HEV-Infektion erhöht, da keine der beobachteten Personen, die an einer Hepatitis anderer Genese litten, vor Krankheitsbeginn Schweineleberprodukte gegessen hatten im Gegensatz zu den HEV-Patienten.<sup>24,91</sup>

Eine amerikanische Forschergruppe entdeckte, dass kommerziell erhältliche Schweinelebern zu 11 % mit dem Virus infiziert waren und diese ausreichend infektiöses Material enthielten, um bei Schweinen die Erkrankung hervorzurufen.<sup>92</sup> Daraufhin wurde auch in Schweineleberproben aus dem Einzelhandel in Indien, in Japan und in den Niederlanden HEV-RNA des Genotyps 3 und 4 nachgewiesen.<sup>91,93,94</sup> Colson et al.<sup>95</sup> fand in traditionellen Schweineleberwürstchen in Frankreich das Virus.

In einer Untersuchung zeigten Feagins et al.<sup>96</sup>, dass, obwohl das Hepatitis-E-Virus hitzeempfindlicher ist als das Hepatitis-A-Virus, erst durch Erhitzen der Leberprodukte auf über 71° C für fünf Minuten das Virusmaterial soweit inaktiviert wurde, dass keine Infektiosität mehr gegeben war.

Bisher wurde nicht untersucht, ob auch andere Tiere, die Fleischquellen für uns darstellen, als Überträger dienen könnten.<sup>17</sup>

Durch die wachsende Zahl der Genomanalysen von Viren aus Tieren und Menschen, die große Übereinstimmungen liefern, wird es immer deutlicher, dass die ständige Präsenz des Virus im Tierreich eine Quelle – wenn auch nicht die einzige – für die sporadischen Infektionen in industrialisierten Ländern der Welt ist.<sup>27,57</sup>

## 1.5. Ziel der Arbeit

Hepatitis-E-Infektionen und die daraus entstehenden Erkrankungen werden in Deutschland und anderen europäischen Ländern in den letzten Jahren immer relevanter. Gerade die bisher nicht vollständig geklärten schweren Verläufe der Erkrankung bei Patienten, die immunsupprimiert sind, und bei Schwangeren stellen in Zukunft neue Ansprüche an Prävention und Therapie.

Andererseits ist bis jetzt das bestehende Infektionsrisiko in Deutschland noch unzureichend untersucht. Im Gegensatz zur regional unterschiedlichen Inzidenz der Hepatitis E findet sich überall auf der Welt eine beachtliche Prävalenz die Antikörper betreffend, wobei diese in endemischen Gebieten am höchsten ist.<sup>17</sup> Auch in europäischen Nachbarländern weist die Bevölkerung hohe Antikörperprävalenzen gegen das Virus auf (siehe 1.4., Seite 10). Diese Untersuchungen legen eine große Zahl an Infektionen nahe, die bis jetzt nur zu einem kleinen Bruchteil erkannt werden.

Woran liegt das?

Zum einen wird das Hepatitis-E-Virus in der Routine-Diagnostik kaum untersucht und die bestehenden Nachweissysteme weisen oft unterschiedliche Testergebnisse auf, wenn sie an identischen Proben angewendet werden.

Die Testsysteme variieren stark in Sensitivität und Spezifität<sup>17</sup> und können schlecht miteinander verglichen werden, da kein serologischer „Goldstandard“ für die Evaluation zur Verfügung steht. Die beste Möglichkeit zur sicheren Identifikation einer akuten Infektion besteht derzeit darin, in einer Serum- oder Stuhlprobe das Virusgenom mittels eines PCR-Systems nachzuweisen.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die in Deutschland erhältlichen serologischen Nachweissysteme anhand eines Kollektivs von 200 Personen aus der Bevölkerung in Regensburg und einer kleineren Gruppe von 30 Patienten mit bestätigter Hepatitis E zu vergleichen und somit einen Hinweis auf die bestmögliche Vorgehensweise für die Testung von anti-HEV Antikörpern zu erhalten. Zudem sind die vorhandenen Untersuchungen bezüglich der Antikörperprävalenz in der deutschen Bevölkerung sehr widersprüchlich. Dies könnte an der Verwendung unterschiedlicher Testsysteme liegen und sollte geklärt werden.

Die zweite Problematik, die zur Unterdiagnostizierung führt, besteht in der unzureichenden Untersuchung der möglichen Infektionswege in Deutschland. Oft ist den behandelnden Ärzten nicht klar, wann sie eine HEV-Infektion in Betracht ziehen müssen. Abgesehen von einer Reise in ein Endemiegebiet sind bis jetzt keine Risikofaktoren ausreichend bewiesen worden.

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass das Hepatitis-E-Virus bei Schweinen dauerhaft zirkuliert und dass eine hohe Ähnlichkeit zwischen Hepatitis-E-Viren bei Schweinen und Menschen besteht. Der Schluss, dass es eine direkte Übertragungsroute zwischen diesen beiden Spezies gibt, liegt also nahe. Die meisten Hinweise für den Infektionsweg zwischen dem bestehenden Tierreservoir und dem Menschen deuten auf Nahrungsmittel aus Schweineprodukten hin.

Diese Arbeit versucht nun die Möglichkeit einer Infektion durch heimische Schweinelebern in derselben geographischen Region, aus der die Serumproben der Bevölkerung gewonnen wurden, zu untersuchen. Hierfür wurden Schweinelebern, die für den Verzehr gedacht sind, von lokalen Einzelhandelsbetrieben gekauft und auf das Vorhandensein von Hepatitis-E-Virusgenom getestet.

Die Ergebnisse der beiden Teile der Arbeit sollen – zusammen betrachtet – eine Einschätzung der aktuellen Situation der Hepatitis E und des bestehenden lebensmittelassoziierten Infektionsrisikos im Großraum Regensburg ermöglichen.

## **2. Material**

### **2.1. Geräte**

Biofuge 15	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Brand Handy Step	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Reference Pipetten (10, 1000)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten (100, 200)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA
Heizblock	Gebrüder Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Heraeus BB6220 CU CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Laminar Flow Einheit	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Mikrobiologischer Brutschrank B6120	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Mikrowelle Quelle Privileg 7517	Quelle, Hamburg, Deutschland
Milli-Q Plus PF	Millipore, Billerica, USA
NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Plattformschüttler Promax 2020	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
ProfiBlot 48	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Rotanta P	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa Typ 4200	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Sartorius Competence CP224S-PCE Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
SLT Spectra Photometer	SLT Labinstruments GmbH, Deutschland
Step One Plus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stromversorger Consort E 425	LTf, Konstanz, Deutschland
UV-Schirm 312nm	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA

### **2.2. Verbrauchsmaterial**

BD Discardit II (2 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Microlance 3 20 G	BD, Heidelberg, Deutschland

---

Biosphere Filter Tips (10/200/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Disposable Scalpell Standard No.22	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Eppendorf Cups (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Cups (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Micro Amp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Foster City, USA
Micro Amp 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR Soft Tubes (0,5 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
PCR Tubes (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
PD-Tips (2,5/5,0 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10/1000 µl)	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner; Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Trays für ProfiBlot 48	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
VWR Pestle & Microtubes (1,5 ml)	VWR International, Ismaning, Deutschland
Zellkulturflaschen BD Falcon (175 cm <sup>2</sup> )	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.3. Chemikalien, Puffer und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
DNA Molekular Weight Marker VIII	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
dNTP Mix (100 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA
dNTPs (10 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ethanol 100 %	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Poly N (6mer), SP 200	Operon, Köln, Deutschland
RNA later Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland

---

Wasser für die Molekularbiologie	Carl Roth GMbH+ Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
1 x TBE Puffer	
0,89 M TRIS	USB Corporation, Cleveland, USA
0,02 M EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,89 M Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
6 x Gelauftragspuffer	
40 g Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
250 mg Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
250 mg Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
ad 100 ml H <sub>2</sub> O	
10 x PCR Buffer II	Applied Biosystems, Foster City, USA
10 x TaqMan Buffer A	Applied Biosystems, Foster City, USA

Zur Herstellung der Puffer wurde entsalztes Wasser aus der Anlage Milli-Q Plus PF verwendet.

## 2.4. Kits

BigDye Terminator cycle sequencing kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
HEV Ab ELISA	Axiom Diagnostic, Worms, Deutschland
HEV ELISA	MP Diagnostics, Illkirch Cedex, Frankreich
HEV IgM ELISA 3.0	MP Diagnostics, Illkirch Cedex, Frankreich
HEV IgG ELISA	Axiom Diagnostic, Worms, Deutschland
QIAquick Gel-extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
recomLine HEV	Mikrogen Diagnostik, Neuried, Deutschland
Ribo Max large scale RNA Production System Sp6 bzw. T7	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy mini kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq PCR core kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 2.5. Enzyme

MuLV Reverse Transkriptase (50 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq Polymerase AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Foster City, USA

## 2.6. Laborinterne Herstellung

Plasmide mit cDNA von Coxsackie-B-Viren  
Plasmide mit cDNA von Hepatitis-E-Virus  
Standardgelelektrophoresekammer  
Transkripte von Coxsackie-B-Viren  
Transkripte von Hepatitis-E-Viren  
Zellkulturüberstand mit Coxsackie-B-Viren ( $8,8 \times 10^9$ / ml)

## 2.7. Software und Internetressourcen

Die Dissertation wurde mit *Microsoft Office Word 2003, 2007 bzw. 2010* angefertigt. Die Tabellen und Grafiken wurden mit *Microsoft Office Exel 2003, 2007 bzw. 2010, Microsoft Office Word 2003, 2007 bzw. 2010, Microsoft Power Point 2002, Corel Draw X4 oder Corel Photo-Paint 12* erstellt. Zur Literaturarchivierung diente das Programm *Citavi 3.0*. Die Auswertung der recomLine Blotstreifen wurde mit *recomScan 3.4.52* durchgeführt und zur Auswertung der DNA-Sequenzen, für die Erstellung der Alignments und phylogenetischen Bäume wurden die Programme *CodonCode Aligner 3.7.1.1, ClustalW, PHYLIP 3.69, fasta-3.5* und *HUSAR Biocomputing Service* der DKFZ Heidelberg herangezogen. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR wurden mit Hilfe der *Step One Software Version 2.1* ermittelt. Die statistischen Berechnungen wurden mit *IBM SPSS Statistics Version 19* durchgeführt. Für Literaturrecherche und DNA-Sequenzrecherche wurde die *Medline Datenbank* verwendet. Für die Stadtpläne und erstellten Karten wurde [www.google.de](http://www.google.de) oder [www.gpsies.de](http://www.gpsies.de) verwendet.

## 2.8. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und entsprechend den Angaben verdünnt.

Test und Zielgen	Primer oder Sonde	Amplifikatgröße	Primer oder Sondensequenz (5'-3')	Konzentration	Nukleotid Position oder Zugangsnummer
HEV RT-qPCR					NC_001434
ORF3	HEV-Forward (Orf3 11/06f)	83 bp	AGCGCGGTACCGGGTGGT	8 µM	5222-5242
ORF3	HEV-Reverse (5'385 1)		GGGTTGGTTGGATATAAGG	8 µM	5283-5304
ORF3	HEV-Sonde (5332-S0)		FAM-TGACMGGGTTGATTCTAGGCCCTTC-TAMRA	8 µM	5251-5275
Enter RT-qPCR					M33854
	Enter-Foward (EQ-1)	495 bp	ACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT	8 µM	411-436
	Entero-Reverse (EQ-2)		CCAAAGTAGTCGGTCCGC	8 µM	449-471
	Entero-Sonde (EP)		FAM-TCCGGCCTCTGAATGGGCTAAT-TAMRA	8 µM	534-552
Sequenzierung					
ORF1	HEV-O1-F1	418 bp	CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC	50 µM	32-55
ORF1	HEV-O1-R1		CCATCRARRCAGTAAGTGGTTC	50 µM	427-449
ORF1	HEV-O1-F2	287 bp	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	50 µM	80-100
ORF1	HEV-O1-R2		GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC	50 µM	343-366
ORF2	HEV-O2-F1	364 bp	GAGGCAGGGYACWACTAARGC	50 µM	6767-6786
ORF2	HEV-O2-R1		AAGAAGGGGGCACAAG	50 µM	7114-7130
ORF2	HEV-O2-F2	216 bp	GCAYCGGGTBGCCTATYTC	50 µM	6850-6867
ORF2	HEV-O2-R2		TGРАAGCTCAGCGACAGTAGA	50 µM	7046-7065
Speziespezifizierung					NC_000845.1
ND3	MT-CYB_Pig_F	116 bp	CGACAAAGCAACCTTCACAGATT	25 µM	15851-15874
ND3	MT-CYB_Pig_R		TAGGGTTGTGGATCCGGTTTCGT	25 µM	15943-15966
ND3	MT-CYB_Cow_F	173 bp	AATGCATTCTACGACCTTCAGGC	25 µM	14559-14582
ND3	MT-CYB_Cow_R		ACGTCCTGGCAGATGGTAACA	25 µM	14708-14731

**Tabelle 1 Verwendete Oligonukleotide (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**

### **3. Methoden**

#### **3.1. Direktnachweis von HEV-RNA in Schweineleberproben**

##### *3.1.1. Probengewinnung*

Für die Untersuchung von Schweineleberproben auf das Vorhandensein von HEV-spezifischer RNA wurden 200 frische Schweinelebern in lokalen Metzgereien und Supermärkten eingekauft. Ausgewählt wurden alle Metzgereien und Supermärkte, die in den Telefonverzeichnissen „Das Örtliche“, „Das Telefonbuch“ und im Branchenverzeichnis „Gelbe Seiten“ (Ausgaben des Jahres 2010) unter Stadt Regensburg aufgelistet wurden und sich im Telefonvorwahlbereich 0941 befanden. 97 Metzgereien und Supermärkte im erweiterten Stadtkreis von Regensburg wurden besucht. Bei 15 Geschäften war keine Schweineleber oder lediglich Schweineleber in tiefgefrorenem Zustand erhältlich. In den Übrigen wurden im Zeitraum von 06.04.2010 bis 27.08.2010, jeweils Montag bis Freitag, Leberproben von 200–500 Gramm gekauft und sofort weiterverarbeitet.

##### *3.1.2. Probenaufarbeitung*

Die Lebern wurden unter anderem zum Schutz vor Kontamination unter einer biologischen Sicherheitswerkbank ausgepackt und mit Hilfe von Pinzette und Skalpell jeweils fünf unterschiedlich große Proben (0,008 g bis 0,3 g) entnommen. Anschließend wurde das Gewicht jeder Probe auf einer Laborfeinwaage bestimmt.

Um RNA vor enzymatischem Abbau durch RNasen zu schützen, wurden die Proben entsprechend dem jeweiligen Gewicht in 2 ml Eppendorf Cups nach Herstellerangaben mit je 10 µl RNA later pro 1 mg Lebergewebe versetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden bei 2–8°C wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung für maximal 2 Monate gelagert.

##### *3.1.3. Nukleinsäureisolation*

Für die Nukleinsäureisolation der in RNA-later-gelagerten Proben wurde das RNeasy mini kit der Firma Qiagen verwendet. Im ersten Schritt wurde ein Stück des Lebergewebes, das nicht schwerer als 20 mg war, in ein 1,5 ml Eppendorf Cup mit 595 µl RLT Puffer (von Qiagen) gegeben. Schwerere Proben wurden vorher mit dem Skalpell zerteilt.

Zur Kontrolle des Isolationsvorganges wurden 5 µl eines Coxsackie-B-Virus-positiven Zellkulturüberstandes in der Konzentration von  $5 \times 10^5$  Virusgenomkopien/5 µl zugegeben.

Mit Hilfe eines Mikropistills wurde die Gewebeprobe im Puffer mechanisch zerkleinert und die Flüssigkeit anschließend mit einer 20 Gauge Kanüle und einer 2 ml Spritze unter mehrmaligem Aufziehen der Spritze homogenisiert.

Gewebereste, die nach der Zerkleinerung noch vorhanden waren, wurden 5 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Cup überführt. Nach der 1:1 Verdünnung des Überstandes mit 70 % Ethanol wurden 700 µl des Gemisches in die im Kit enthaltenen Filterrörchen überführt und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Schritt solange wiederholt, bis das gesamte Gemisch das Filterrörchen durchlaufen hatte.

Anschließend wurde das Filterrörchen mit 700 µl RW1 Puffer (von Qiagen) und danach mit 500 µl RPE Puffer (von Qiagen) unter 15 sekündiger Zentrifugation bei 10.000 rpm gespült. Nach dem dritten Waschschritt mit 500 µl RPE Puffer wurde 2 Minuten zentrifugiert und das Filterrörchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase freiem Wasser und einminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm.

Das Filterrörchen wurde verworfen und die eluierte RNA bei -80°C gelagert.

#### *3.1.4. Isulationskontrolle*

Unter der Annahme, dass keine Isolutionsmethode eine Extraktion der DNA von 100 % ermöglicht, wurde eine Methodik zur Kontrolle der Ausbeute der Nukleinsäureisolation eingeführt. Zusätzlich ermöglicht diese Methodik die Erkennung potenziell in den Proben vorhandener PCR-Inhibitoren. Hierfür wurden Verozellen, die in DMEM mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10 mg/ml) kultiviert wurden, mit Coxsackie-B3-Viren infiziert. Nach eintägiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Überstand abgenommen und in 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei der anschließenden Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 rpm wurde der Überstand vom Zellmaterial getrennt und mittels quantitativer real-time PCR die Virusgenomkonzentration bestimmt. Im Folgenden wurde eine Verdünnungsreihe berechnet und mit oben genanntem Medium erstellt.

Zur Kontrolle des Isolations- und Amplifikationserfolges wurde ein definiertes Volumen von Coxsackie-B3-Virus haltigem Puffer ( $5 \times 10^5$  Virusgenomkopien) zum selben Zeitpunkt wie die Leberprobe zum Isolationsansatz zugegeben und später die Nukleinsäuremenge mit der quantitativen Enterovirus-Taqman-PCR (siehe 3.1.5.3.) bestimmt.

### 3.1.5. Real-time PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Nukleinsäure des Hepatitis-E-Virus und des Coxsackie-B-Virus in den isolierten Leberproben wurde das Taqman real-time PCR-System verwendet. Dieses System ermöglicht es, während der Vervielfältigungsphase der Nukleinsäure mit Hilfe eines fluorogenen Farbstoffes (z.B. FAM, 6-Carboxyfluorescein) unmittelbar die Vervielfältigung der DNA beziehungsweise cDNA zu verfolgen.

Der Farbstoff befindet sich kovalent gebunden am 5'-Ende eines Oligonukleotids, genannt (Hydrolyse-)Sonde, das die korrespondierende Basensequenz der zu detektierenden DNA beziehungsweise cDNA aufweist. Durch Anregung des fluorogenen Farbstoffs mit Licht der spezifischen Absorptionswellenlänge (z.B. 495 nm bei FAM) wird Licht mit einer Emissionswellenlänge von 500–800 nm ausgestrahlt und von einer Detektionseinheit (CCD Kamera) kontinuierlich detektiert.<sup>97</sup>

Um die Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts messen zu können, befindet sich am 3'-Ende der Sonde ein weiteres kovalent gebundenes Molekül, der sog. Quencher (z.B. TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin), der bei intakter Sonde Licht im Emissionswellenlängenbereich des Fluorophors absorbiert. Bindet jedoch die Sonde an den komplementären Nukleotidstrang zwischen zwei Primern, wird sie durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase, die vom Primer aus den DNA-Strang elongiert, hydrolytisch degradiert und das Fluorophor emittiert – nun räumlich vom Quencher getrennt – Lichtwellen im Emissionswellenlängenbereich des Fluorophors.<sup>97</sup>

Da die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur exponentiellen Vermehrung der Nukleinsäure ist und dadurch die Möglichkeit besteht, auf die Menge der zu Anfang enthaltenen Nukleinsäure zu schließen, wurde bei jedem kompletten Durchlauf der Amplifikationszyklen eine Reihe von RNA-Kalibratoren bekannter Konzentration mitvervielfältigt. Der Vergleich des Fluoreszenzanstiegs der untersuchten Proben mit dem der Kalibratoren ermöglicht somit eine absolute quantitative Bestimmung der Ausgangsmenge an viraler RNA je PCR-Ansatz.

Für die Herstellung der RNA-Kalibratoren wurden RNA-Standards *in vitro* transkribiert. Hierfür wurden Teile der viralen RNA mit Hilfe der spezifischen Primer (HEV-Forward und HEV-Reverse, bzw. Entero-Forward und Entero-Reverse; siehe Tabelle 1) amplifiziert; zum einen RNA aus einem infizierten Zellkulturüberstand für die Kalibratoren der Enteroviren und zum anderen RNA von einem infizierten Patienten für die Kalibratoren des Hepatitis-E-Virus. Die PCR-Produkte wurden mit einem Agarosegel separiert und mit dem QIAquick Gel-extraction Kit gereinigt. Anschließend wurden die Amplifikate mit pCRII-TOPO Plasmid

Vektoren ligiert und in kompetente E. coli (TOP10, Qiagen) kloniert. Die rekombinanten Plasmide wurden zur Kontrolle bidirektional sequenziert (siehe 3.1.6) und auf die korrekte Basensequenz überprüft. Die mittels spezifischer Nukleasen linearisierten Plasmide wurden mit dem Ribo MAX kit (Promega) transkribiert und anschließend gereinigt. Nach einem DNase I Verdau (RNase-Free DNase Set) wurde per spektrophotometrischer Quantifizierung (NanoDrop ND-1000) die vorhandene Konzentration der RNA-Transkripte bestimmt und eine RNA-Verdünnungsreihe erstellt, welche als RNA-Kalibrator zur Quantifizierung dient.<sup>98</sup> Die gereinigten Plasmide wurden bei jedem PCR-Lauf als Positivkontrolle eingesetzt, um bei eventuell auftretenden Signalausfällen zwischen einer fehlerhaften Reversen Transkription oder einer fehlerhaften PCR unterscheiden zu können.

### *3.1.5.1. Reverse Transkription der RNA*

Um RNA mit Hilfe des Taqman-PCR-Systems nachweisen zu können, musste die isolierte RNA zuerst in cDNA revers transkribiert werden. Hierfür wurde die MuLV Reverse Transkriptase aus dem Maus-Leukämie-Virus (Moloney-Murine-Leukemia-Virus) verwendet. Die isolierte Nukleinsäure wurde vor der Zugabe zum Mastermix drei Minuten im Heizblock bei 65°C erhitzt und im Eiswasser anschließend abgekühlt, um potentiell vorhandene RNA-Sekundärstrukturen aufzubrechen.

Reagenz	Menge
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)	2 µl
10 x PCR Buffer II	4 µl
Poly N (6mer)	1 µl
dNTP Mix (100 mM)	1 µl
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
Isolierte Nukleinsäure	10 µl
Gesamt	20 µl

**Tabelle 2 Reaktionskomponenten für die Reverse Transkription im Rahmen der Taqman-PCR.**

Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 42°C inkubiert und die enzymatischen Reaktionskomponenten anschließend 10 Minuten bei 95°C denaturiert.

### 3.1.5.2. Nachweis von Hepatitis-E-Virusgenom

Für den Nachweis von Hepatitis-E-Virusgenom wurde ein bereits etabliertes System von Primern und dazugehöriger Sonde von Wenzel et al.<sup>99</sup> übernommen.

Bei jeder Testreihe wurden sowohl die oben beschriebenen RNA-Kalibratoren in den Konzentrationen  $1 \times 10^1$  Kopien pro Ansatz,  $1 \times 10^2$  Kopien pro Ansatz und  $1 \times 10^4$  Kopien pro Ansatz als auch die Plasmide und eine Negativkontrolle mitvervielfältigt.

Der in Tabelle 3 aufgeführte Mastermix wurde in eine 96-well Mikrotiterplatte zu je 20 µl pro Well überführt. Von jeder Probe, dem cDNA-Standard, bestehend aus oben beschriebenen klonierten Plasmiden, und den RNA-Kalibratoren wurden 10 µl Reaktionsgemisch zum Mastermix zugegeben. Sowohl Probe als auch Kalibratoren wurden im Doppelansatz getestet.

Reagenz	Menge
DEPC H <sub>2</sub> O	10,7 µl
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)	4 µl
10 x TaqMan Buffer A	2 µl
Primer Forward (Orf3 11/06f; 8 µM)	1,14 µl
Primer Reverse (5385 r; 8 µM)	1,14 µl
Sonde (5332-So; 8 µM)	0,73 µl
Taq Polymerase AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0,25 µl
Reaktionsgemisch aus RT	10 µl
Gesamt	29,96 µl

**Tabelle 3 Reaktionskomponenten für die Taqman-PCR zum Nachweis von HEV-RNA.**

Die Taqman-PCR wurde mit folgendem Temperaturschema durchgeführt und nach kurzem Abzentrifugieren gestartet.

Stufe 1	1 Zyklus Schritt 1: Denaturierung und Enzymaktivierung      95°C 10.00 min
Stufe 2	45 Zyklen Schritt 1: Denaturierung      95°C 0.15 min Schritt 2: Primer Annealing und Primer Extension 60°C 1.00 min

**Tabelle 4 Temperaturschema für die Taqman-PCR zum Nachweis von HEV-RNA.**

Die Bestimmung der absoluten quantitativen Ergebnisse erfolgte mit der *Step One Software Version 2.1* (Applied Biosystems) unter Berücksichtigung der Reihe der RNA-Kalibratoren.

### *3.1.5.3. Nachweis von Enterovirusgenom*

Für den Nachweis von Enterovirusgenom wurde ein bereits etabliertes System von Primern und dazugehöriger Sonde von Dierssen et al.<sup>100</sup> übernommen.

Bei jeder Testreihe wurden sowohl die oben beschriebenen RNA-Kalibratoren in den Konzentrationen  $1 \times 10^1$  Kopien pro Ansatz,  $1 \times 10^2$  Kopien pro Ansatz und  $1 \times 10^4$  Kopien pro Ansatz als auch die Plasmide und eine Negativkontrolle mitvervielfältigt.

Der in Tabelle 5 aufgeführte Mastermix wurde in eine 96-well Mikrotiterplatte zu je 20 µl pro Well überführt. Von jeder Probe, dem cDNA-Standard, bestehend aus oben beschriebenen klonierten Plasmiden, und den RNA-Kalibratoren wurden 10 µl Reaktionsgemisch zum Mastermix zugegeben. Sowohl Probe als auch Kalibratoren wurden im Doppelansatz getestet.

Reagenz	Menge
DEPC H <sub>2</sub> O	9,8 µl
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)	5,32 µl
10 x TaqMan Buffer A	2 µl
Primer Forward (EQ-1; 8 µM)	1,14 µl
Primer Reverse (EQ-2; 8 µM)	1,14 µl
Sonde (EP; 8 µM)	0,375 µl
Taq Polymerase AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0,25 µl
Reaktionsgemisch aus RT	10 µl
Gesamt	30,025 µl

**Tabelle 5 Reaktionskomponenten für die Taqman-PCR zum Nachweis von Enterovirus-RNA.**

Die Taqman-PCR wurde nach dem gleichen Temperaturschema wie in Tabelle 4 beschrieben durchgeführt und nach kurzem Abzentrifugieren gestartet.

Die Bestimmung der quantitativen Ergebnisse erfolgte mit der *Step One Software Version 2.1* (Applied Biosystems) unter Berücksichtigung der Reihe der RNA-Kalibratoren.

### 3.1.6. Nested PCR und Genomsequenzierung

Für die Sequenzierung und anschließende Genotypisierung des Hepatitis-E-Virus wurden zwei Bereiche des Virusgenoms mit Hilfe einer nested PCR amplifiziert. Die Zielbereiche befinden sich im ORF1 und im ORF2, wobei die Produkte jeweils 287 und 216 Basenpaare lang sind.

Die nested PCR ist ein Detektionsverfahren, das die analytische Sensitivität im Vergleich zur konventionellen PCR erhöht. Hierbei wird in der ersten PCR ein Primerpaar verwendet, das außerhalb des zu amplifizierenden Gensegmentes bindet. In einem zweiten PCR-Schritt, der sog. nested PCR, werden dann die Primer eingesetzt, die zur Vervielfältigung des gewünschten Genomabschnittes gebraucht werden.<sup>97</sup>

Im ersten Schritt wurde die virale RNA in unten beschriebenen Ansatz 30 Minuten bei 42°C revers transkribiert und anschließend zur Enzymdeaktivierung 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Reagenz	Menge
MgCl <sub>2</sub> Stock Solution (Expand High Fidelity PCR System; 25 mM)	4 µl
Expand High Fidelity Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	2 µl
Primer Forward (HEV-O1-F1 oder HEV-O2-F1; 50 µM)	1 µl
Primer Reverse (HEV-O1-R1 oder HEV-O2-R1; 50 µM)	1 µl
dNTP Mix (100 mM)	1 µl
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
Isolierte Nukleinsäure	10 µl
Gesamt	21 µl

Tabelle 6 Reaktionskomponenten für die Reverse Transkription zur HEV-Genotypisierung.

Anschließend folgte die erste PCR, bei der folgender Mastermix zum Ansatz der RT zugegeben wurde, mit folgendem Temperaturprofil:

Reagenz	Menge
DEPC H <sub>2</sub> O	67,5 µl
MgCl <sub>2</sub> Stock Solution (Expand High Fidelity PCR System; 25 mM)	4 µl
Expand High Fidelity Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	8 µl
Expand High Fidelity Enzyme Mix (3,5 U/µl)	0,5 µl
Gesamt	80 µl+20 µl RT-Ansatz

**Tabelle 7 Reaktionskomponenten für die erste PCR zur HEV-Genotypisierung.**

Stufe 1	1 Zyklus Schritt 1: Denaturierung	95°C 5.00 min
Stufe2	35 Zyklen Schritt 1: Denaturierung Schritt 2: Primer Annealing Schritt 3: Primer Extension	95°C 0.30 min 55°C 0.30 min 72°C 1.00 min
Stufe3	1 Zyklus Schritt 1: Komplettierung der Elongation	72°C 7.00 min

**Tabelle 8 Temperaturschema für die nested PCR zur HEV-Genotypisierung.**

Die zweite nested PCR wurde mit folgendem Ansatz und dem gleichen Temperaturprofil wie in Tabelle 8 beschrieben durchgeführt.

Reagenz	Menge
DEPC H <sub>2</sub> O	36,7 µl
Expand High Fidelity Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl
Primer Forward (HEV-O1-F2 oder HEV-O2-F2; 50 µM)	1 µl
Primer Reverse (HEV-O1-R2 oder HEV-O2-R2; 50 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	4 µl
Expand High Fidelity Enzyme Mix (3,5 U/µl)	0,35 µl
Erstes Amplifikat	2 µl
Gesamt	50,05 µl

**Tabelle 9 Reaktionskomponenten für die zweite nested PCR zur HEV-Genotypisierung.**

Ein Teil des Reaktionsprodukts der zweiten nested PCR wurde auf ein Agarosegel (1–2 %) mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) aufgetragen, um die Menge der amplifizierten DNA zu beurteilen. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mit dem QIAquick PCR Purification kit gereinigt und zirka 200 ng der DNA im Doppelansatz mit jeweils einem Primer der zweiten nested PCR (10 µM) bei der Firma Geneart (Regensburg) mit Hilfe des BigDye Terminator cycle sequencing kit auf dem 3730 DNA Analyzer aufgetrennt.

### 3.1.6.1. Sequenzanalyse

Die Analyse der Nukleotidsequenz erfolgte mit dem Programm *CodonCode Aligner*. Die Elektropherogramme wurden auf Fehlinterpretationen des automatischen Basendetektionsalgorithmus (sog. Basecaller) überprüft und ggf. korrigiert. Alle PCR-Produkte wurden bidirektional sequenziert, so dass durch Zusammensetzen der Plus- und Minusstrangsequenzen eine Konsensussequenz gebildet werden konnte. Diese besteht aus dem sequenzierten Bereich abzüglich der Nukleotide, an denen die Primer binden.

Mit Hilfe des FASTA Algorithmus, implementiert am HUSAR Biocomputing Service des DKFZ Heidelberg (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>), wurde eine Datenbank mit allen viralen Nukleotidsequenzen aus der GenBank nach ähnlichen Sequenzen durchsucht. Als Suchsequenzen wurden die neu charakterisierten HEV-ORF1- und HEV-ORF2-Sequenzen verwendet. Folgende Programmparameter kamen zur Anwendung: Datenbank "Viral (Viral Seqs Geall)"; Erwartungs-Wert <0,0001; Smith-Waterman Algorithmus für das endgültige Alignment. Die Suchergebnisse wurden als Alignment dargestellt und manuell ausgewertet. Eine Liste mit den ähnlichsten Sequenzeinträgen wurde erstellt und um Detailinformationen zu den einzelnen Isolaten ergänzt (Land, Isolationsquelle (Mensch, Schwein, Wildschein etc.), falls verfügbar Jahr). Zusätzlich wurde mit dem Programm FASTA eine lokale HEV-Datenbank des Konsiliarlabors am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg nach denselben ORF1- und ORF2-Sequenzen durchsucht. Die lokale Datenbank enthielt auch eine Auswahl von HEV-Referenzsequenzen nach Lu et al.<sup>15</sup> Die Suchergebnisse wurden manuell ausgewertet und die ähnlichsten Sequenzeinträge in einer Liste zusammengefasst. Eine vorläufige Aussage über die Genotyp-Zuordnung der neuen HEV-Isolate wurde bereits aufgrund der ähnlichsten Referenzsequenzen getroffen.

Die endgültige molekulare Subgenotypisierung der neuen HEV-Isolate wurde mittels phylogenetischer Analyse durchgeführt. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe des Programmes *ClustalW* ein multiples Alignment erstellt, bestehend aus der neuen ORF1-HEV-Nukleotidsequenz, einer Auswahl sehr ähnlicher Sequenzen aus der GenBank-Suche und einer Reihe von Referenzsequenzen, die die HEV-Subgenotypen und HEV-Genotypen repräsentieren (Ref. Lu et al.<sup>15</sup>). Das multiple Sequenzalignment wurde manuell überprüft und – falls nötig – editiert. Mit Hilfe des Programmes *PHYLIP 3.69* (<http://www.phylo.com>) wurde ein phylogenetischer Baum nach der sog. "Rooted maximum likelihood" Methode berechnet. Für das "Bootstrapping" als Maß für die Robustheit des phylogenetischen

Modelles wurden 100 verschiedene Iterationen berechnet. Auf dieser Datenbasis wurde ein Konsensusstammbaum erstellt und in Form eines Dendrogrammes dargestellt. Zur Verankerung des Baumes wurde als Außengruppe mit großer phylogenetischer Distanz eine ORF1-Sequenz eines aviären HEV-Isolates benutzt (GenBank Nr. AY535004).

### *3.1.7. Speziesspezifizierung des Lebergewebes anhand von mitochondrialer DNA*

Die gekauften Lebern wurden zusätzlich zur eventuell vorhandenen Viruslast auch auf ihre tatsächliche Herkunft überprüft. Es wurde angenommen, dass die in Metzgereien erhältlichen Lebern von Rindern (*Bos taurus*) stammen könnten, obwohl beim Kauf ausdrücklich nach Schweineleber gefragt wurde.

Zur Identifikation der Spezies, von der die gekaufte Leber stammte, wurde eine konventionelle PCR-Methode zur Amplifizierung von mitochondrialer DNA etabliert. Als zu amplifizierendes Zielgen wurde eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase ausgewählt. Es wurde parallel jede Nukleinsäureprobe mit einem Primerpaar passend zum Zielgen bei Rindermitochondrien und einem Primerpaar passend zum Zielgen bei Schweiñemitochondrien amplifiziert. Die Primersequenzen hierzu wurden von Schill et al.<sup>101</sup> übernommen. Die Reagenzien stammen aus dem Taq PCR core kit (Qiagen).

In den nachfolgenden Tabellen finden sich die Reaktionskomponenten und das Temperaturschema, welche beide in Vorversuchen optimiert wurden.

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O	18,35 µl
10 x Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer Forward (MT-CYB_Pig_F oder MT-CYB_Cow_F; 25 µM)	0,5 µl
Primer Reverse (MT-CYB_Pig_R oder MT-CYB_Cow_R; 25 µM)	0,5 µl
Isolierte Nukleinsäure	2,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
Gesamt	25 µl

**Tabelle 10 Reaktionskomponenten für die konventionelle PCR zur Speziesspezifizierung.**

Stufe 1	1 Zyklus			
	Schritt 1: Denaturierung	94°C	4.00 min	
Stufe 2	35 Zyklen			
	Schritt 1: Denaturierung	94°C	0.30 min	
	Schritt 2: Primer Annealing und Primer Extension	72°C	0.40 min	
Stufe 3	1 Zyklus			
	Schritt 1: Komplettierung der Elongation	72°C	10.00 min	
	Schritt 2: Kühlung	4°C	hold	

**Tabelle 11 Temperaturschema für die konventionelle PCR zur Speziesspezifizierung.**

Die PCR-Produkte, mit Gel-Auftragspuffer versetzt, und ein DNA-Standard (Roche), zur anschließenden Größenbestimmung der DNA-Banden, wurden auf ein Agarosegel (1–2 %) mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) aufgetragen. Daraufhin wurde 20 Minuten lang eine Spannung von 100 V (500 mA) angelegt wobei die negativ geladene DNA zur Anode wanderte. Die Nukleinsäurebestandteile trennen sich hierbei ihrer Größe nach auf, da kleine DNA-Stücke in der Gelmatrix schneller wandern als große Stücke.<sup>97</sup>

Die Ethidiumbromid-Moleküle im Agarosegel interkalieren zwischen die Basen der DNA und erhöhen dadurch die Länge der Lichtwellen, die bei Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert werden. Unter einer UV-Lampe konnten somit die DNA-Banden sichtbar gemacht und mit Banden bekannter Größe der DNA-Leiter verglichen werden.<sup>97</sup>

### **3.2. Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus**

Die Antikörperprävalenz in der Bevölkerung wurde mit den vier kommerziell erhältlichen Testsystemen (MP ELISA, Axiom ELISA IgG, Axiom ELISA Ab, Mikrogen recomLine) auf Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus bestimmt. Als Untersuchungsgegenstand dienten hierbei 200 anonymisierte Restproben aus der Diagnostik, die im Rahmen von betriebsärztlichen Untersuchungen des Universitätsklinikums Regensburg an das Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg geschickt worden waren.

Zusätzlich wurden die vier Testsysteme an 30 Restproben der Diagnostik, die eine in der Taqman-PCR bestätigte Hepatitis E hatten, angewandt.

#### *3.2.1. Auswahl der Serumproben*

##### *3.2.1.1. Serumproben der regionalen Bevölkerung*

Die 200 anonymisierten Restproben wurden bei -20°C gelagert. Die Proben wurden im Zeitraum von Februar 2009 bis März 2010 gewonnen und stammten von Personen, die im Zeitraum von 1944 bis 1993 geboren wurden, wobei die Altersverteilung der einzelnen Gruppen an die in Deutschland im Jahr 2010 bestehende Altersverteilung angepasst wurde.

##### *3.2.1.2. Serumproben von Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E*

Die Restproben von Patienten mit bestätigter akuter Hepatitis E (PCR-positiv) wurden der Serumbank des Institutes für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg entnommen. Der Zeitraum der Abnahme der Serumproben lag zwischen 2007 und 2010.

#### *3.2.2. Nachweissysteme*

Das Testprinzip der vier Kits besteht darin, Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus aus dem Testmaterial an rekombinante virusspezifische Proteine auf einer festen Phase zu binden. In einem zweiten Schritt findet eine Reaktion mit einem Peroxidase-gekoppelten spezifischen anti-Immunglobulin Antikörper bzw. einem Peroxidase-gekoppelten rekombinanten HEV-Antigen statt. Die spezifische Bindung dieser Kojugate wiederum wird durch eine Peroxidase-katalysierte Farbreaktion nachgewiesen.

Die vier Tests unterscheiden sich in der Wahl der verwendeten Proteine und der Wahl der festen Phase, auf die die Proteine aufgetragen wurden. Bei den zwei ELISA Testformaten der Firmen Axiom und MP wurden Reaktionskavitäten von Mikrotiterplatten als Trägermaterial

für die Antigene verwendet, wogegen der Mikrogen recomLine eine Nitrozellulose-Membran verwendet. Zudem besteht das Konjugat beim Axiom ELISA nicht aus anti-Immunglobulin Antikörpern, sondern aus einem HEV-Antigen, das an die Fab-Region vorhandener Antikörper bindet und somit Antikörper jeder Spezies detektieren kann.

### 3.2.2.1. MP ELISA

Die Reaktionskavitäten („Wells“) der Polystyrol-Mikrotiterplatten des MP HEV ELISA IgG/IgM sind mit dem Protein des ORF2 (Genotyp 1 und 2) und mit dem kompletten Protein des ORF3 beschichtet.<sup>102</sup>

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt: Die Angaben in Klammern sind entsprechende Abweichungen im Protokoll des ELISAs zum Nachweis von IgM-Antikörpern. Pro untersuchte Serumprobe wurde eine Reaktionskavität mit 200 µl Verdünnungslösung gefüllt. Zusätzlich wurden zwei Wells für die Leerprobe, zwei Wells für die reaktive Kontrolle und drei Wells für die nicht reaktive Kontrolle gefüllt. Anschließend wurde in die Wells 10 µl der Probenflüssigkeit einpipettiert. Bei den Leerproben handelte es sich hierbei um Verdünnungspuffer. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde jedes Well sechs Mal mit 300 µl Waschpufferlösung, die aus 1:19 verdünntem Waschpufferkonzentrat besteht, gewaschen. Daraufhin wurde in jedes Well 100 µl der 1:500 (1:200) verdünnten Konjugatlösung gefüllt. Nach nochmaliger 30-minütiger Inkubation bei 37° C und erneutem Waschen wurden je 100 µl Substratlösung zugegeben, welche 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Farbreaktion wurde nach 10 Minuten mit je 100 µl Stopp-Lösung unterbrochen. Im Folgenden wurde die Absorption bei 450 nm im Photometer vermessen und nach Subtraktion des Mittelwerts der Leerproben vom Absorptionswert einer jeden Probe die Auswertung vollzogen.

Laut Hersteller sind folgende Qualitätsmerkmale einzuhalten: Die Leerproben und die nicht reaktiven Kontrollen müssen eine Absorption von kleiner gleich 0,1 und die reaktiven Kontrollen von größer gleich 0,7 (0,5) aufweisen. Zugleich darf die Absorption keiner reaktiven Kontrolle mehr als 30 % vom Mittelwert der reaktiven Kontrollen differieren und die Differenz der Absorption der Mittelwerte der reaktiven und der nicht reaktiven Kontrollen muss mindestens 0,6 betragen.

Wenn diese Kriterien zutrafen, konnte der Cut-off-Wert als mittlere Absorption der nicht reaktiven Kontrollen plus 0,5 (0,4) berechnet und die Proben bewertet werden. Lagen die Werte der Proben unter dem Cut-off-Wert, wurden sie als negativ gewertet. Bei einem Ergebnis größer gleich dem Cut-off-Wert wurden sie als initial reaktiv und nach

Wiederholung des Tests mit positivem Ergebnis als positiv eingestuft. Fiel das zweite Testergebnis nach positivem ersten Test negativ aus, wurde die Probe als negativ bewertet.

### 3.2.2.2. Axiom ELISA

Der Axiom HEV IgG und der Axiom HEV Ab bestehen ebenfalls aus Polystyrol-Mikrotiterplatten, auf deren Wells Teile des Strukturproteins des ORF2 eines Genotyp 1 Virus aufgetragen wurden.<sup>47</sup> Der Axiom ELISA Ab unterscheidet sich vom Axiom ELISA IgG durch die Detektionsfähigkeit aller Immunglobulinklassen (im Folgenden als „gesamt Antikörper“ bezeichnet).

Bei der Testdurchführung wurden die Angaben des Herstellers befolgt: Die Angaben in Klammern sind entsprechende Abweichungen im Protokoll des ELISAs zum Nachweis von gesamt Antikörpern.

Jedes Well, inklusive der drei Negativ-Kontrollen, der zwei Positiv-Kontrollen und der Leerprobe, wurde mit 100 µl (50 µl) Verdünnungspuffer (Diluent) gefüllt. In die Negativ-Kontrolle, die Positiv-Kontrolle und die Probenwells wurden 10 µl (50 µl) der Testflüssigkeit pipettiert. Nach Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde fünf Mal mit 1:20 verdünntem Waschpuffer gewaschen und in jedes Well, die Leerprobe ausgenommen, 100 µl HRP-Konjugat (Meerrettichperoxidase) einpipettiert. Daraufhin wurde die Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert und fünf Mal gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well je 50 µl Chromogen-A- und Chromogen-B-Lösung zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 50 µl Stopp-Lösung fixiert und die Proben mit dem Photometer bei 450nm gemessen (Referenzwellenlänge 630 nm).

Der Hersteller gibt einige Qualitätsmerkmale an, um valide Ergebnisse zu erhalten: Die Absorption der Leerprobe muss unter 0,08, die der Negativ-Kontrollen unter 0,1 und die der Positiv-Kontrollen größer oder gleich 0,8 sein.

Zur Bewertung der Ergebnisse wurde auch hier ein Cut-off-Wert errechnet, der sich aus dem Mittelwert der negativen Kontrollen plus 0,16 (0,12) ergibt. Dividiert man nun die Absorption eines jeden Wells durch den Cut-off-Wert, führt ein Ergebnis von kleiner 1 zu einem negativen Testergebnis und ein Wert von größer oder gleich 1 zu einem positiven Ergebnis, wobei ein Wert zwischen 0,9 und 1,1 als grenzwertig betrachtet werden sollte.

Alle positiven Ergebnisse wurden ein zweites Mal getestet und nur zweimalig positive Ergebnisse als positiv gewertet.

### 3.2.2.3. Mikrogen recomLine HEV

Der Mikrogen recomLine HEV IgG/IgM verwendet mehrere Antigene unterschiedlicher HEV-Genotypen auf den Membranstreifen. Sowohl der N-terminale Teil (O2N) und der C-terminale Teil (O2C) des ORF2 Proteins und das ORF3 Protein (O3) von Viren der Genotypen 1 und 3 als auch der mittlere Teil des ORF2 Proteins (O2M) vom Virus des Genotyps 1 wurden auf die Trägerstreifen aufgetragen.

Der Test wurde laut Handbuch mit dem Analysegerät „ProfiBlot 48“ (Tecan) durchgeführt: Je ein Streifen wurde in 2 ml Verdünnungspuffer eingelegt und 20 µl der Serumprobe einpipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung des Reaktionsansatzes wurde jeder Streifen dreimal mit 2 ml Waschpuffer, bestehend aus 5 g Magermilchpulver, 100 ml Waschpufferkonzentrat und 900 ml deionisiertem Wasser, 5 min gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Konjugatlösung, bestehend aus anti-IgG oder anti-IgM Konjugat-Konzentrat, welches mit Waschpuffer im Verhältnis 1+100 verdünnt wurde, wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Daraufhin wurden 1,5 ml der Substratlösung zugegeben, wodurch auf jedem Streifen sich eine deutliche Färbung der Reaktionskontrolle, der Konjugatkontrolle (für IgG und IgM unterschiedlich) und der Cut-off-Kontrolle entwickelte. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten durch dreimaliges Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt und die Streifen 2 Stunden auf Saugpapier getrocknet.

Die Auswertung wurde mit der *recomScan-Software 3.4.52* (Mikrogen) durchgeführt, wobei die Intensität einer jeden Proteinbande mit der Cut-off-Kontrolle verglichen wird und bei dunklerer Färbung der Proteinbande der Serumprobe ein Punktewert zugeschrieben wird.

Die positiv gewerteten Proteinbanden der Antigene O2N und O2M entsprechen jeweils 2 Punkten, die des Antigens O3 3 Punkten und die des Antigens O2C 4 Punkten. Die Summe der Punkte eines Streifens bestimmt das Ergebnis der Probe. Bis zu einem Punktewert von 2 gilt das Ergebnis als negativ, 3 Punkte gelten als fragliches Ergebnis und ab 4 Punkten wird die Probe als positiv gewertet.

Positive und fragliche Testergebnisse wurden ein zweites Mal kontrolliert und nur bei zweimaligem positivem Ergebnis als reaktiv gewertet.

### 3.2.3. Statistische Berechnungen

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen verschiedenen Risikofaktoren und der Antikörperprävalenz wurde mit dem Programm *IBM SPSS Statistics Version 19* die Odds-Ratio, das 95 %-Konfidenzintervall und die Signifikanz von Unterschieden mittels des Chi-Quadrat Tests berechnet.

Die Odds-Ratio gibt die Stärke eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen an und erlaubt somit einen Rückschluss, ob eine Variable einen Risikofaktor für die andere Variable darstellt. Das 95 %-Konfidenzintervall gibt den Bereich an, in dem die Odds-Ratio für die Grundgesamtheit mit einer Sicherheit von 95 % liegen kann, ausgehend von der Berechnung für die Stichprobe. Der Chi-Quadrat-Test berechnet den p-Wert, eine Irrtumswahrscheinlichkeit, die angibt, wie wahrscheinlich man sich irrt, wenn man die Hypothese „Es gibt keinen Zusammenhang zwischen den zwei Variablen in der Grundgesamtheit“ ablehnt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Untersuchung der Schweineleberproben**

Verschiedene Infektionswege zur Übertragung von Hepatitis E innerhalb Deutschlands sind denkbar. In dieser Studie sollte die Infektionsgefahr durch den Konsum von Schweineleber abgeschätzt werden.

#### *4.1.1. Probengewinnung*

Das Probenmaterial, bestehend aus 200 Schweinelebern, wurde im Zeitraum vom 06.04.2010 bis 27.08.2010 bei ortsansässigen Lebensmittelhändlern, deren Zulieferer laut Angaben die Lebern aus Deutschland bezogen haben, gekauft.

##### *4.1.1.1. Daten zur Probengewinnung*

Die Leberproben wurden in 82 Supermärkten und Metzgereien der Stadt Regensburg erworben. Insgesamt wurden noch 15 weitere Geschäfte besucht, die entweder jahreszeitlich bedingt keine Schweineleber im Angebot hatten oder nur bei einer Abnahme einer größeren Menge (zirka 3,5 kg) zu einer Vorbestellung bereit waren und deswegen ausschieden.

Es wurde darauf geachtet, Filialen einer Metzgerkette nicht am gleichen Tag zu besuchen, um das Risiko mehrere Teile einer Leber desselben Schweins zu kaufen möglichst gering zu halten. Die Leber eines Schweines wiegt zirka 3,5 kg und wird selten komplett in einer Filiale angeboten, da die Abnahme der Kunden in der Regel zu gering ist, um die Leber vor dem Verderben vollständig zu verkaufen.

Die Leberproben, die erstanden wurden, wogen zwischen 200 g und 500 g. Zur Weiterverarbeitung wurden pro Leber an verschiedenen Stellen jeweils fünf Proben zwischen 8 mg und 300 mg entnommen.

#### *4.1.1.2. Geographische Verteilung der Supermärkte und Metzgereien*

Die 82 Geschäfte, in denen Schweineleber eingekauft wurde, verteilten sich auf 16 Stadtteile Regensburgs, sowie Pentling, Lappersdorf, Sinzing und Zeitlarn, wie die folgende Tabelle 12 zeigt.

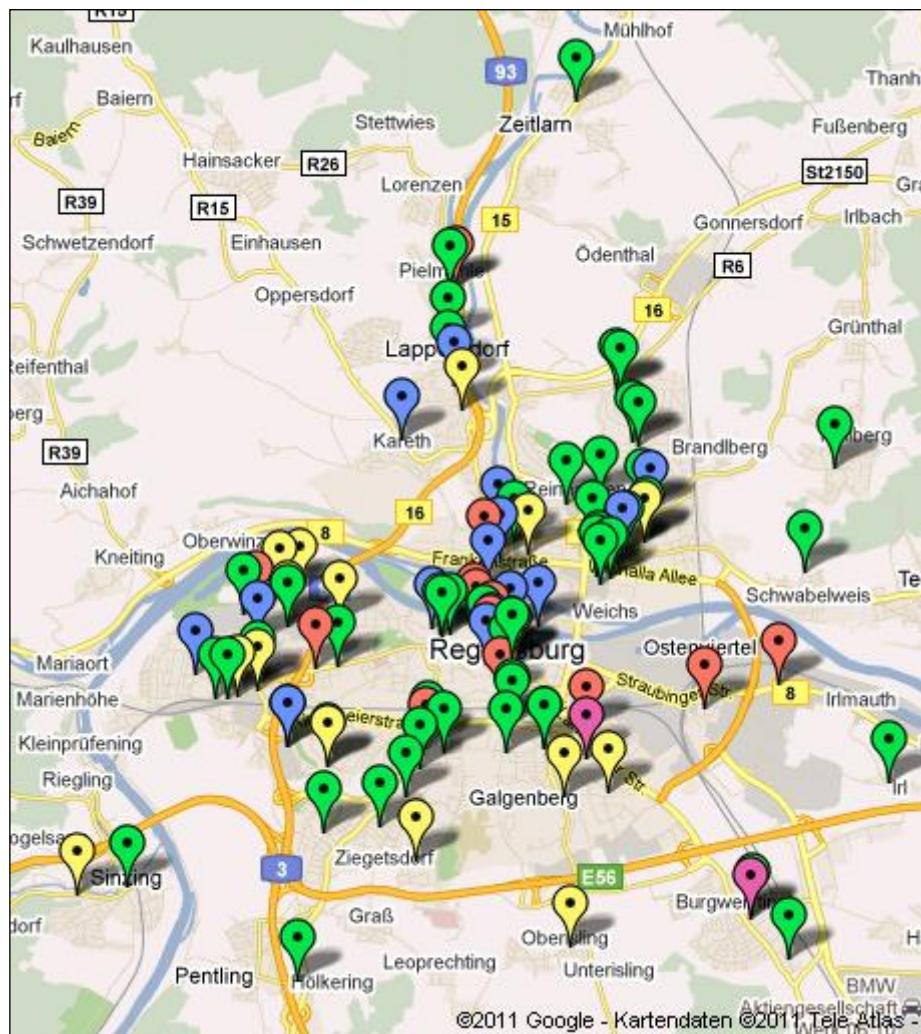
Stadtteil	Anzahl besuchter Metzgereien und Supermärkte
Brandlberg-Keilberg	1
Burgweinting-Harting	3
Galgenberg	3
Graß-Oberisling	1
Innenstadt	4
Kasernenviertel	11
Königswiesen-Dechbetten-Großprüfening	5
Konradsiedlung	5
Kumpfmühl-Ziegetsdorf	6
Ostenviertel	1
Reinhausen	10
Schwabelweis	1
Stadtamhof	1
Steinweg	2
Weichs	4
Westenviertel	14
Pentling	1
Lappersdorf	6
Sinzing	2
Zeitlarn	1
Gesamt	82

**Tabelle 12 Verteilung der besuchten Metzgereien und Supermärkte auf die Stadtteile Regensburgs.**

Die Supermärkte und Metzgereien wurden unterschiedlich oft besucht, je nachdem, ob diese regelmäßig Schweineleber im Angebot hatten oder ob dieses Produkt nur auf Vorbestellung erhältlich war. Deshalb wurde in 16 Metzgereien einmal, in 16 zweimal, in 48 dreimal und in zwei viermal eingekauft.

Die folgende Abbildung 4 zeigt die Verteilung der besuchten 97 Geschäfte auf einem Lageplan der Stadt Regensburg.

Die Metzgerei, die am weitesten vom Stadtzentrum entfernt liegt, war vom Alten Rathaus 6,8 km entfernt. Im Umkreis von 5,02 km um das Zentrum herum lagen 95 % der Geschäfte und in einem Umkreis von 2,41 km lagen 50 % der Geschäfte, in denen eingekauft wurde.



**Abbildung 4 Metzgereien in Regensburg (Markierung: gelb = ein Leberkauf, blau = zwei Leberkäufe, grün = drei Leberkäufe, pink = vier Leberkäufe, rot = keine Leber erhalten, Quelle der Abbildung: google.de).**

#### 4.1.2. Anwendung des Isolationskontrollverfahrens

Auf dem Weg von der Probe zum Nachweissystem gibt es einen Teil der Nukleinsäure, der verfahrensbedingt am Schluss nicht mehr detektiert werden kann. Wo dieser prozentuale Anteil verloren wird, ist nicht genau geklärt. Zum einen bleibt ein gewisser Teil bei der Elution in dem Material zurück, aus dem die Nukleinsäure gereinigt wird, und die Nukleinsäure – zumindest die RNA – ist in reinem Zustand stark abbauenden Enzymen (z.B. RNasen) ausgesetzt. Andererseits gibt es zusätzlich zum Nukleinsäureverlust noch Substanzen im Probenmaterial, die die Amplifikation in der PCR inhibieren können, und so zum Nachweis eines falsch niedrigen Gehalts an Nukleinsäure führen.

Zur Kontrolle des Verlustes an Nukleinsäure im Laufe des Verfahrens und um den Einfluss inhibierender Stoffe einschätzen zu können, wurde ein Isolationskontrollverfahren eingeführt. Eine bestimmte Menge RNA eines Enterovirus (siehe 3.1.4., Seite 23) wurde zum gleichen Zeitpunkt wie die Leberproben zum Lysepuffer hinzugefügt, um ein identisches Vorgehen für beide Nukleinsäurekomponenten zu garantieren. Ab diesem Zeitpunkt waren sie denselben Abbauprozessen unterworfen, ein etwa gleich großer Prozentsatz der Nukleinsäure ging im Isolationsverfahren verloren und es wirkten dieselben Inhibitoren auf die Amplifikation der Komponenten.

Die zugegebene Menge an Enterovirus-RNA entsprach bei jeder Probe  $5,0 \times 10^5$  Genomkopien. Nach der Elution in 50 µl RNase-freiem Wasser war die Konzentration  $1,0 \times 10^4$  Kopien pro µl. Daraus ergibt sich bei der Zugabe von 5 µl je Ansatz ein erwartetes PCR-Resultat von  $5,0 \times 10^4$  Genomkopien pro PCR-Ansatz.

Die Ergebnisse der Enterovirus-PCR aller Nukleinsäureisolale aus Schweinelebern sind in Abbildung 5 als Histogramm aufgetragen.

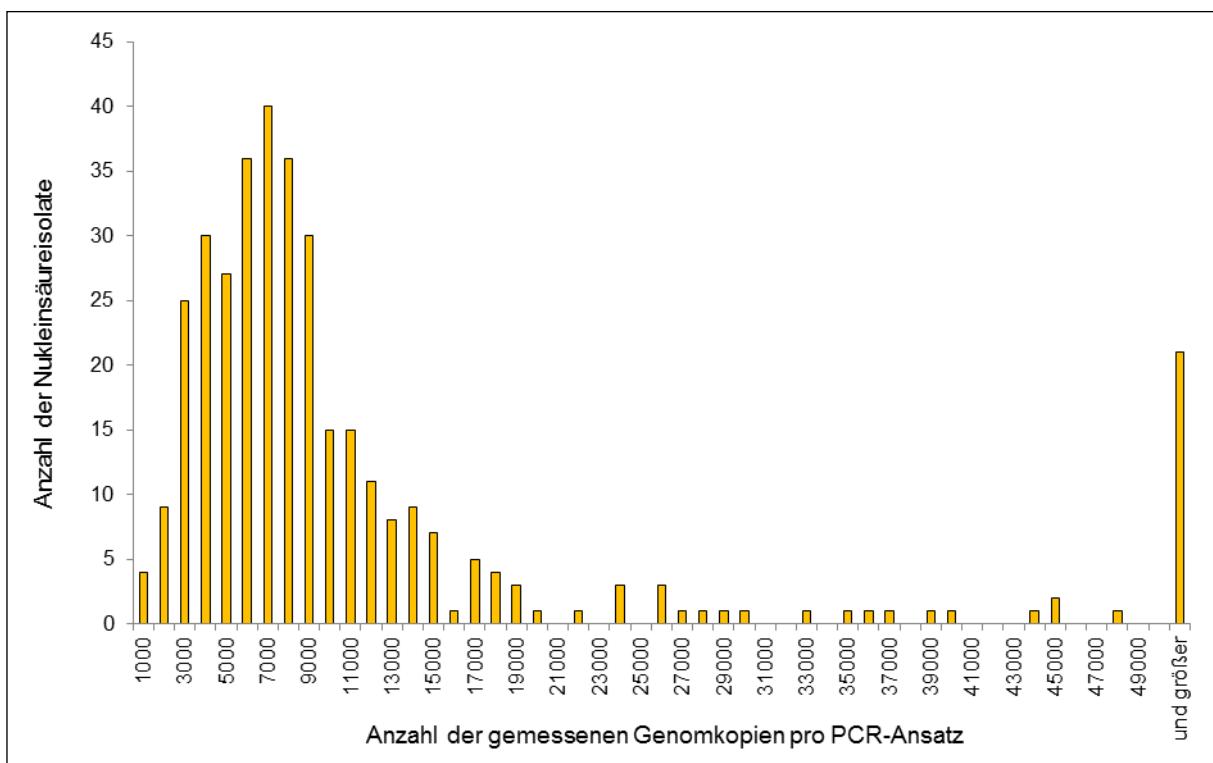


Abbildung 5 Verteilung der Ergebnisse der quantitativen Enterovirus-Taqman-PCR.

In der Abbildung 5 sind Abweichungen der detektierten von der berechneten Nukleinsäremenge zu erkennen. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde eine untere Kontrollgrenze für die Konzentration der Enterovirus-RNA pro PCR-Ansatz festgesetzt, die für die Akzeptanz des Ergebnisses für vorhandene HEV-RNA eingehalten werden musste. Fiel das Ergebnis der Enterovirus-Quantifizierung unter die Grenze von  $1 \times 10^3$  Genomkopien pro PCR-Ansatz, wurde auch das Ergebnis der HEV-PCR verworfen und RNA aus einem weiteren Stück derselben Leber isoliert, nach demselben Schema getestet und denselben Kriterien für die Annahme des Ergebnisses unterzogen.

#### *4.1.3. Speziesspezifizierung der Nukleinsäure anhand von mitochondrialer DNA*

Die Angaben über die Herkunft der Leberproben bestanden meist nur aus den Auskünften, zu denen die Metzger bereit waren. Die Annahme, dass alle Proben ausschließlich von Schweinen stammen, wurde überprüft.

##### *4.1.3.1. Entwicklung*

Die Überlegung bestand darin, mittels einer konventionellen PCR ein Stück Nukleinsäure zu vervielfältigen und anschließend die Amplifikationsprodukte ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür müsste sich das Amplifikationsprodukt je nach Spezies in der Anzahl der Basenpaare unterscheiden, um die Spezies differenzieren zu können.

Ein Gen, das diese Kriterien erfüllt, kodiert für eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase, und ist auf der mitochondrialen DNA lokalisiert. Die Unterscheidung zwischen den Spezies war hier möglich, da die DNA-Sequenz der NADH-Dehydrogenase des Schweins eine Größe von 116 Basenpaaren hat, wogegen die des Rinds mit 173 Basenpaaren deutlich größer ist.

Zur Etablierung des PCR-Verfahrens ließ man jeweils ein Primerpaar, dessen Sequenz von Schill et al.<sup>101</sup> veröffentlicht wurde, passend zur Genomsequenz der zwei Spezies synthetisieren.

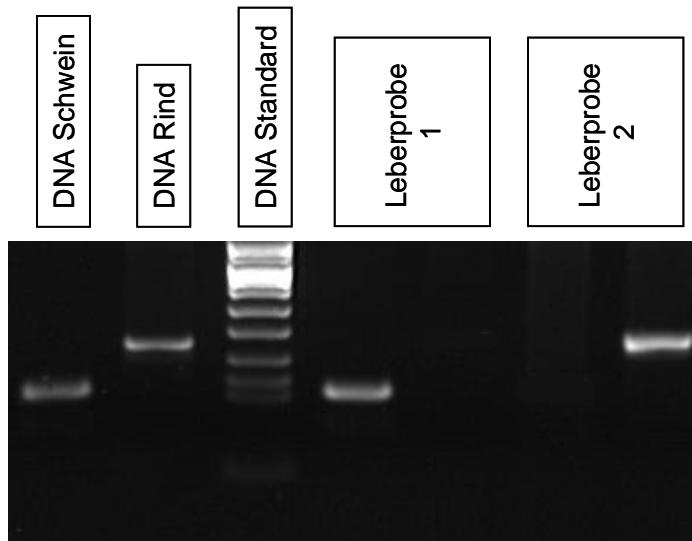
In den Vorversuchen wurde das PCR-Temperaturschema optimiert:

Anfangs wurde die Annealingtemperatur 2° C unter der Schmelztemperatur der Primer von 65,0° C, ein 3-stufiger Zyklus und eine Zyklusanzahl von 30 gewählt. Wegen nicht zufriedenstellender Ergebnisse wurden die Zyklusanzahl auf 35 und die Annealingtemperatur auf 72° C erhöht. Im zweiten Verbesserungsschritt wurde das Verfahren auf eine 2-Schritt-PCR umgestellt, bei der die Annealing- und die Elongationsphase bei der gleichen Temperatur ablaufen. Durch diese Modifikationen wurden die DNA-Fragmente bestmöglich vervielfältigt und bei der Auf trennung auf dem Agarosegel wurde ein klar abgrenzbares Muster mit Banden unterschiedlicher Länge sichtbar.

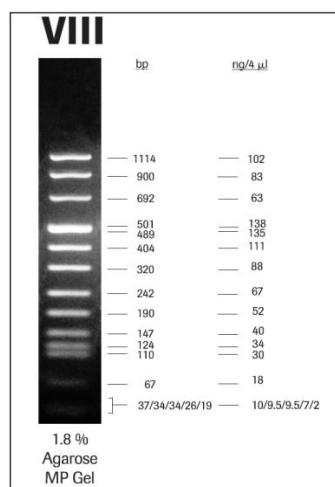
Das endgültige PCR-Schema wird unter Kapitel 3.1.7. auf Seite 33 aufgeführt.

Bei jeder Längenbestimmung wurde zusätzlich zu den Proben ein DNA-Standard auf das Gel aufgetragen. Die bekannten Basenpaarlängen der Nukleinsäureprodukte des DNA-Standards ermöglichen die Längenbestimmung der amplifizierten Produkte der Proben und somit die Zuordnung des Lebergewebes zu einer Spezies.

Die folgende Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Analyse von zwei unbekannten Leberproben. In Abbildung 7 ist die Auf trennung der DNA-Fragmente des DNA-Standards abgebildet.



**Abbildung 6** Gelelektrophorese der Produkte aus der konventionellen PCR zur Speziesspezifizierung zweier Leberproben. Die DNA eines Schweins und die DNA eines Rinds wurden als Kontrollen für das Testergebnis zugefügt. Der DNA-Standard wurde zur Größenbestimmung verwendet.



**Abbildung 7** Auf trennung von 1 µg DNA Molecular Weight Marker VIII auf einen Agarosegel (1,8 %) mit Ethidiumbromid (übernommen aus dem Informationsblatt zu Molecular Weight Marker VIII von Roche).

In den beiden ersten Taschen des Gels wurden jeweils das 116 bp lange DNA-Stück der NADH-Dehydrogenase des Schweins und das 173 bp lange DNA-Stück der NADH-Dehydrogenase des Rinds aufgetragen. Man kann hier die Bande mit DNA aus dem Schweinegenom im Bereich des DNA-Standards zwischen 110 bp und 124 bp Länge

erkennen. Die Bande mit DNA aus dem Rindergenom kommt deutlich weiter oben zwischen 147 bp und 190 bp zu liegen.

Leberprobe 1 und 2 stehen hier exemplarisch für zwei unbekannte Nukleinsäureisolate aus Leberproben. Diese wurden in der PCR einmal mit Primern passend für das Schweinegenomstück (aufgetragen in Tasche 1) und einmal mit Primern passend für das Rindergenomstück (aufgetragen in Tasche 2) vervielfältigt.

Für Leberprobe 1 erscheint nur eine Bande in der ersten Bahn, in der der PCR-Ansatz für Schweinegenom aufgetragen wurde. Diese Bande weist die gleiche Basenpaarlänge auf wie die Bande in der Bahn mit DNA des Schweines. Diese Beobachtungen passen zu der Diagnose, dass Leberprobe 1 von einem Schwein stammt.

Für Leberprobe 2 wurde ebenfalls nur eine Bande sichtbar; diese korrespondiert mit der Bande in der Bahn der Rinder-DNA und erscheint in der Bahn des PCR-Ansatzes für Rindergenom. Dies führt zu dem Schluss, dass es sich hierbei um eine Leberprobe eines Rindes handeln muss.

#### 4.1.3.2. Testergebnisse

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, konnte mit Hilfe der konventionellen PCR zur Speziesspezifizierung bei vier der 200 Schweinelebern ausschließlich DNA von Rindermitochondrien nachgewiesen werden. Alle übrigen Leberproben stimmten mit der Aussage der Metzger überein und stammten somit von Schweinen.

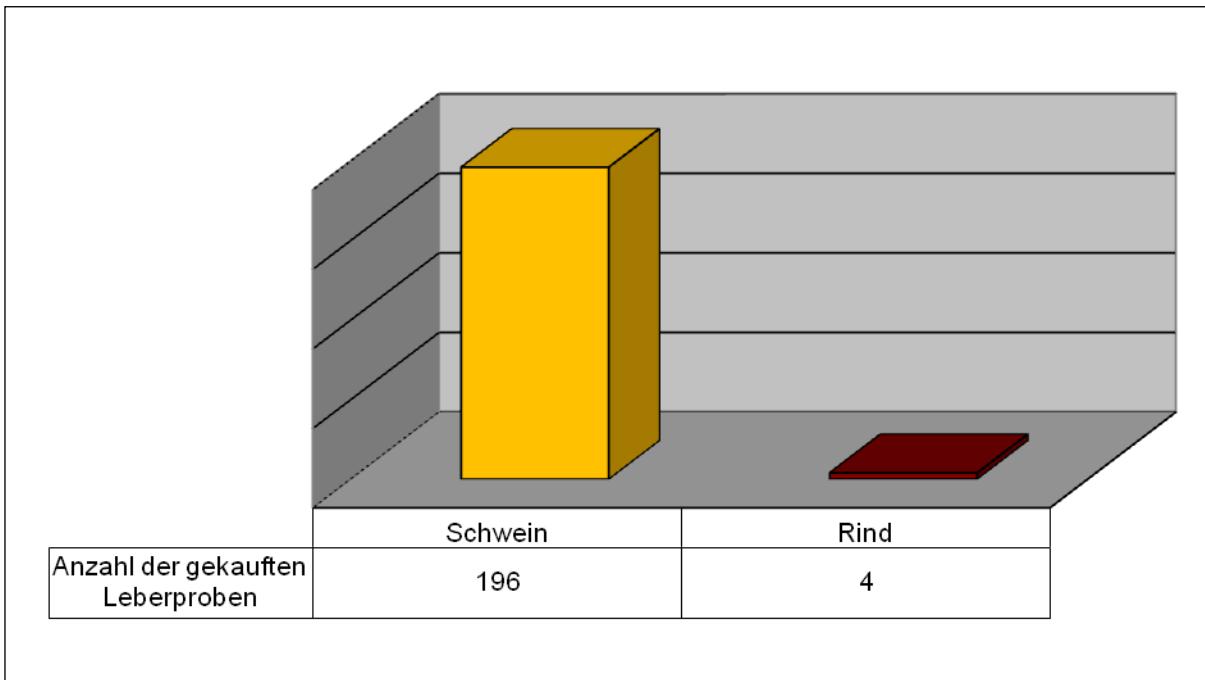


Abbildung 8 Ergebnis des Nachweises von Schweine- bzw. Rindergenom bei den gekauften Leberproben.

#### 4.1.4. Nachweis von HEV-RNA

Von jeder Schweineleber wurde aus zwei der fünf Proben RNA isoliert und diese anschließend auf HEV-RNA getestet. Beide Proben wurden zuerst mit dem Taqman-System auf HEV-RNA untersucht und bei einem positiven Nachweis wurde die RNA mit der nested PCR amplifiziert, um das Virus charakterisieren zu können.

#### 4.1.4.1. Ergebnisse der real-time PCR

Das Ergebnis der Taqman-PCR ist in Abbildung 9 und Tabelle 13 dargestellt. Bei 192 der 200 Leberproben konnte in keiner der beiden Proben HEV-RNA nachgewiesen werden. Bei sechs Lebern war mindestens in einer der beiden Proben, die immer im Doppelansatz getestet wurden, ein positiver Einzelwert detektierbar. Bei zwei Schweinelebern wurde in mindestens einer der beiden Proben HEV-RNA im Doppelwert gefunden.

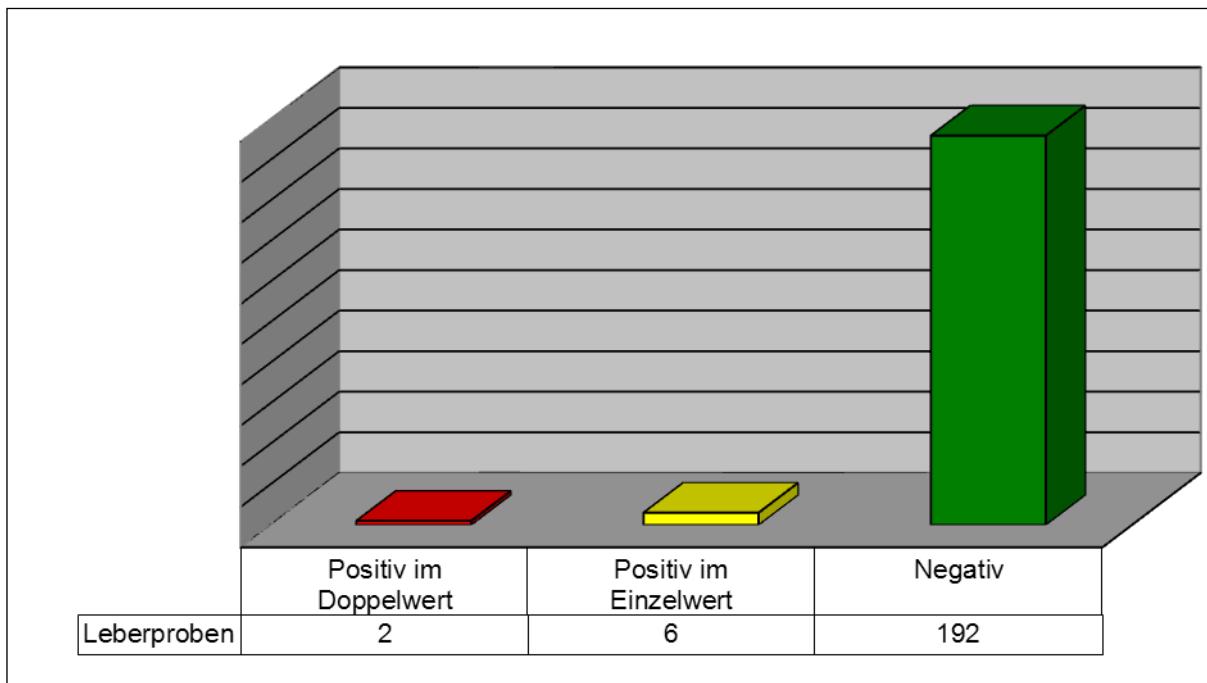


Abbildung 9 Ergebnisse der HEV-Taqman-PCR der 200 Leberproben.

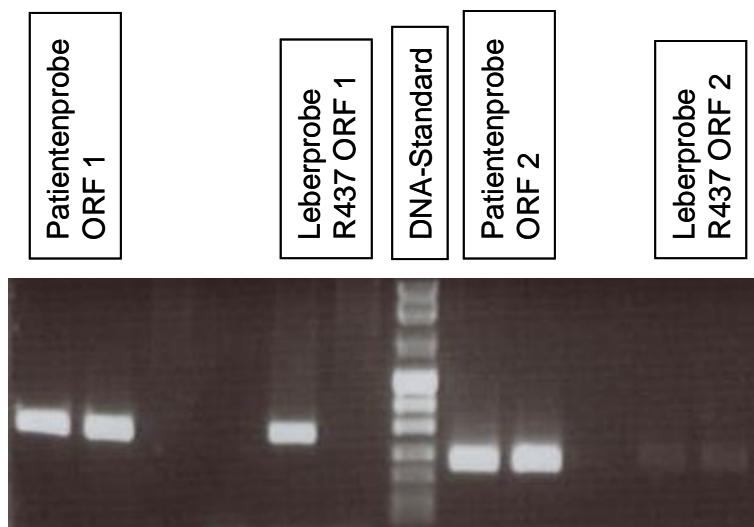
	Probe	Ansatz 1	Ansatz 2	Nested PCR
<b>Leber 1</b>	R 15	-	-	-
	R 19	+	-	-
<b>Leber 2</b>	R 43	-	-	-
	R 44	+	-	-
<b>Leber 3</b>	R 111	-	-	-
	R 113	+	-	-
<b>Leber 4</b>	R 267	+	-	-
	R 269	+	-	+ (Genotyp 3c)
<b>Leber 5</b>	R 371	+	-	-
	R 372	-	-	-
<b>Leber 6</b>	R 431	-	-	-
	R 432	+	+	-
<b>Leber 7</b>	R 436	+	-	-
	R 437	+	+	+ (Genotyp 3a)
<b>Leber 8</b>	R 906	+	-	-
	R 907	-	-	-

Tabelle 13 Darstellung der Ergebnisse der acht HEV-RNA-positiven Leberproben. Von jeder Leber wurden zwei Proben in zwei Ansätzen per Taqman-PCR und ein Ansatz per nested PCR untersucht. (+ = positiv, - = negativ)

#### 4.1.4.2. Ergebnisse der nested PCR

Alle Proben, die in der Taqman-PCR ein positives Ergebnis aufwiesen, sei es im Einzelwert oder im Doppelwert, wurden mit der nested PCR amplifiziert. Hierfür wurde die PCR solange wiederholt, bis jede Materialprobe der Leber getestet war.

Bei zwei der acht untersuchten Proben zeigten sich auf dem Agarosegel amplifizierte DNA-Teilstücke, die dem ORF1 entsprachen. Das ORF-2-Fragment konnte bei einer der beiden Proben vervielfältigt und analysiert werden. Bei den beiden Leberproben handelte es sich um eine Probe, die in der Taqman-PCR im Doppelwert positiv (R437) war, und um eine Probe, die im Einzelwert positiv (R269) war. Folgende Abbildung 10 zeigt das Bild des Agarosegels, auf dem das nested PCR-Produkt der Probe R437 aufgetragen wurde.



**Abbildung 10** Gelelektrophorese der Produkte der nested PCR zur HEV-Genotypisierung einer Probe eines infizierten Patienten und der Leberprobe R437. Die PCR wurde im Doppelansatz durchgeführt. Daraus ergeben sich zwei Bahnen pro Produkt. Als DNA-Standard wurde der DNA Molecular Weight Marker VIII von Roche verwendet.

Man kann sowohl bei der Patientenprobe als auch bei der Leberprobe links des DNA-Standards Banden gleicher Länge erkennen, die der Bande des DNA-Standards von 242 bp entsprechen. Rechts des DNA-Standards erkennt man Banden (bei der Leberprobe sehr schwach), die zwischen den Banden von 147 bp und 190 bp Länge des Standards liegen.

Die Banden links des Standards entsprechen den Amplifikaten des Virusgenoms im ORF-1-Bereich, die eine Länge von 287 bp aufweisen sollten, und die Banden rechts des Standards entsprechen den Amplifikaten des ORF-2-Fragments, welche 216 bp lang sein sollten.

Bei dem HEV-Isolat aus Leberprobe R437 konnten sowohl das Fragment des ORF1 in einem der zwei PCR-Ansätze, als auch das Fragment des ORF2 in beiden Ansätzen vervielfältigt werden und somit eine Analyse des Virusstamms erfolgen.

#### 4.1.4.3. Analyse der Nukleotidsequenz der Hepatitis-E-Viren

Die RNA-Bereiche der zwei Leberproben, die durch die nested PCR amplifiziert wurden, konnten erfolgreich sequenziert werden. Die Nukleotidsequenzen des ORF-1-Fragments der beiden Virusisolaten und die Nukleotidsequenz des ORF-2-Fragments der Probe R437 sind in den Abbildungen 11 bis 13 zu sehen.

```

1 TGGTCGGCC GTTTTATCT CGTGTACAAA CCGAGATCCT TATTAATTG
51 ATGCAACCCC GGCAGTTGGT TTTTCGCCCT GAGGTGCTT GGAATCATCC
101 TATTCAACGG GTTATACATA ATGAATTAGA ACAGTACTGC CGGGCCCGTG
151 CTGGCCGTTG TTTGGAGGTC GGAGCCCACC CGAGATCCAT TAATGATAAC
201 CCCAATGTTT TGCACCGGTG CTTCTTAGA CCAGTTGGTC GA

```

**Abbildung 11 Nukleotidsequenz des ORF-1-Fragments des Isolates R437 (Länge: 242 bp), GenBank Nr. FR846453.**

```

1 TACCTATACC ACTAGCCTGG GTGCCGGCCC TACCTCGATT TCTGCGGTG
51 GCGTACTAGC TCCCCATTCA GCCCTTGCTG TTCTCGAGGA TACTGTTGAT
101 TACCCCTGCC C GCGCTCATAC TTTGATGAT TTCTGCCCGG AGTGCCGTGC
151 CCTTGGTTTG CAGGGTTGTG CATTCCAG

```

**Abbildung 12 Nukleotidsequenz des ORF-2-Fragments des Isolates R437 (Länge: 178 bp), GenBank Nr. FR846453.**

```

1 TGGTCGGCC GTTTTATCT CGTGTGCAA CTGAGATTCT TATTAATTG
51 ATGCAACCCC GGCAGTTGGT TTTTCGACCT GAAGTGCTT GGAATCATCC
101 TATCCAACGG GTTATTCATA ATGAACTTGA ACAGTACTGT CGGGCCCGGG
151 CTGGTCGTTG TCTAGAGGTT GGGGCCACC CAAGATCCAT TAATGACAAC
201 CCAAATGTTT TGCACCGGTG CTTTCTACGA CCAGTTGGGA GA

```

**Abbildung 13 Nukleotidsequenz des ORF-1-Fragments des Isolates R269 (Länge: 242 bp), GenBank Nr. FR846455.**

Die sich anschließenden phylogenetischen Analysen beruhen auf dem Vergleich dieser kurzen Amplifikate mit der viralen Genbank und einer lokalen HEV-Datenbank des Konsiliarlabors für das Hepatitis-E-Virus (siehe 3.1.6.1., Seite 31), da phylogenetische Analysen von kurzen Abschnitten des Genoms vergleichbare Ergebnisse liefern wie Analysen, die auf dem gesamten Genom basieren.<sup>103</sup>

Die folgenden Tabellen 14 bis 19 zeigen die jeweils zehn ähnlichsten Sequenzen zu den neugefundenen Virusisolaten aus den Schweinelebern. Ähnliche Virusisolaten, die durch Experimente mit Zelllinien generiert wurden, wurden manuell aus der Liste entfernt.

Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsart	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R437 (ORF1)
005-10 SRB	2010	Serbien	Schwein	3	HM483380	94,2 %
V069076	2008	Deutschland	Mensch	3	EU879099	93,8 %
HUN-034	2009	Ungarn	Schwein	3a	EU718648	93,4 %
HUN-007	2009	Ungarn	Wild schwein	3a	EU718647	93,4 %
HEV/SW/NL/ 2005-1043	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372552	93,4 %
Kernow-C1	2009	UK	Mensch	3	HQ389543	93,3 %
HE-JANGP2	2005	Japan	Mensch	3	AB196842	92,6 %
HE-JA7	2001	Japan	Mensch	3a	AB082552	93,0 %
NLSW122	2001	Niederlande	Schwein	3a	AF336014	93,0 %
HUN-006	2009	Ungarn	Wild schwein	3a	EU718646	92,6 %

**Tabelle 14 Liste der GenBank-Einträge mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-1-Fragment des Isolates R437 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**

Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsart	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R437 (ORF2)
HEV-US1	1998	USA	Mensch	3a	AF060668	91,5 %
JKN-Sap	2003	Japan	Mensch	3a	AB074918	91,6 %
HE-JA10	1993	Japan	Mensch	3a	AB089824	90,4 %
HRC-HE104	2007	Japan	Mensch	3	AB630970	90,4 %
JMNG36-Oki08	2008	Japan	Mungo	3	AB591734	90,4 %
HEV-US2	1998	USA	Mensch	3a	AF060669	90,4 %
V09-26307	2009	Deutschland, München	Mensch	3	GU479458	91,0 %
swUS1	1997	USA	Schwein	3a	AF082843	89,3 %
G3-Chi	2006	Japan	Mensch	*	DQ079625	89,3 %
G3-pig-2712	2006	Japan	Schwein	*	DQ079627	88,8 %

**Tabelle 15 Liste der GenBank-Einträge mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-2-Fragment des Isolates R437 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**  
**\*Daten nicht verfügbar.**

Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsor	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R437 (ORF1)
V10-08184	2010	Deutschland, München	Mensch	3a	**	93,8 %
HE-JA7	2001	Japan	Mensch	3a	AB082552.1	93,0 %
NLSW122	2001	Niederlande	Schwein	3a	AF336014.1	93,0 %
NLSW22	2001	Niederlande	Schwein	3a	AF336002.1	92,6 %
V09-26307	2009	Deutschland, München	Mensch	3a	GU479457.1	92,1 %
V10-12238	2010	Deutschland, München	Mensch	3a	**	92,1 %
HE-JA10	1993	Japan	Mensch	3a	AB089824.1	91,3 %
JMY-Haw	2003	Japan	Mensch	3a	AB074920.3	91,3 %
HEV-US1	1998	USA	Mensch	3a	AF060668.1	91,3 %
HEV-US2	1998	USA	Mensch	3a	AF060669.1	90,5 %

**Tabelle 16 Liste der Einträge in der lokalen HEV-Datenbank des Konsiliarlabors (bestehend aus eigenen Isolaten und Referenzsequenzen nach Lu et al.<sup>15</sup>) mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-1-Fragment des Isolates R437 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**  
**\*\* Kein Eintrag in der GenBank vorhanden.**

Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsor	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R437 (ORF2)
HEV-US1	1998	USA	Mensch	3a	AF060668.1	92,1 %
JKN-Sap	2003	Japan	Mensch	3a	AB074918.2	91,6 %
HE-JA10	1993	Japan	Mensch	3a	AB089824.1	90,4 %
HEV-US2	1998	USA	Mensch	3a	AF060669.1	90,4 %
swUS1	1997	USA	Schwein	3a	AF082843.1	89,3 %
JMY-Haw	2002	Japan	Mensch	3a	AB074920.3	87,6 %
JJT-Kan	2003	Japan	Mensch	3b	AB091394.1	86,5 %
swJ570	2001	Japan	Schwein	3b	AB073912.1	85,9 %
Arkell	2002	Kanada	Schwein	3j	AY115488.1	85,4 %
JBOAR1-Hyo04	2004	Japan	Wild schwein	3b	AB189070.1	84,8 %

**Tabelle 17 Liste der Einträge in der lokalen HEV-Datenbank des Konsiliarlabors (bestehend aus eigenen Isolaten und Referenzsequenzen nach Lu et al.<sup>15</sup>) mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-2-Fragment des Isolates R437 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**

Wie aus diesen Tabellen hervorgeht, weist das aus Leberprobe R437 isolierte Virus die größte Ähnlichkeit zu Virustypen auf, die dem Genotyp 3 und dem Subgenotyp 3a zugehören. Aus diesem Grund wurde dieses Virusisolat auch dem Subgenotyp 3a zugeordnet.

Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsland	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R269 (ORF1)
HEV/SW/NL/2005-1055	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372556	99,6 %
V10-07999	2010	Deutschland, Regensburg	Mensch	3c	FN995000	99,2 %
V10-24549	2010	Deutschland, Ludwigburg	Mensch	3c	FR846450	98,8 %
HEV/SW/NL/2005-988	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372531	98,8 %
HEV/SW/NL/2005-994	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372533	98,8 %
V10-11293	2010	Deutschland, Brandenburg	Mensch	3c	FN985025	98,8 %
HEV/SW/NL/2005-1001	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372537	98,3 %
V10-25911	2010	Deutschland, Mainz	Mensch	3c	FR846451	98,3 %
HEV/SW/NL/2005-995	2005	Niederlande	Schwein	3	EF372534	98,3 %
V07-06586	2007	Deutschland	Mensch	3c	EU879111	98,3 %

**Tabelle 18 Liste der GenBank-Einträge mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-1-Fragment des Isolates R269 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**

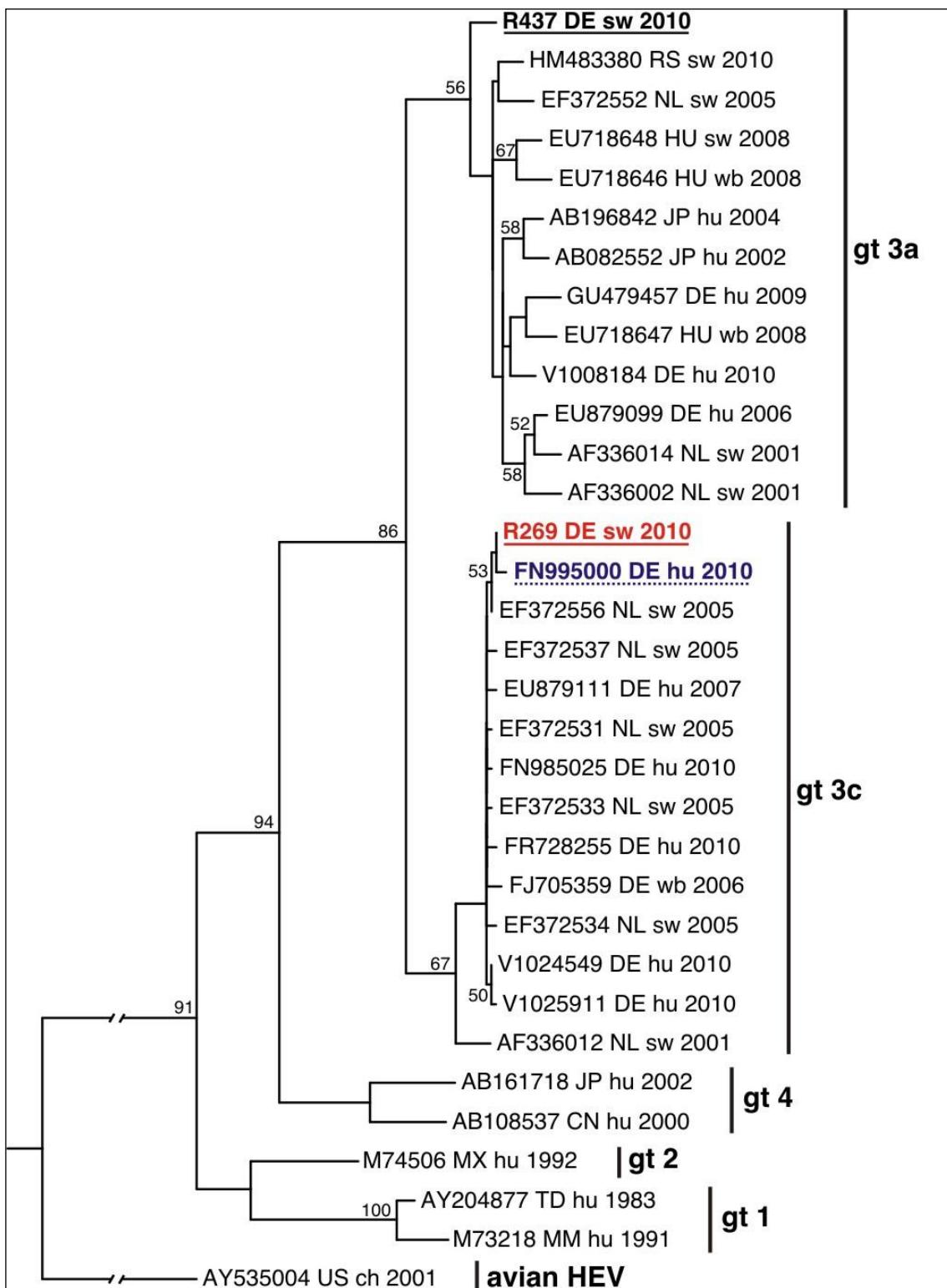
Name des HEV-Isolats	Jahr der Isolation bzw. Publikation	Herkunftsart	Spezies	HEV-Genotyp	Zugangsnummer	Übereinstimmung der Sequenz zu R269 (ORF1)
V10-07999	2010	Deutschland, Regensburg	Mensch	3c	FN995000	99,2 %
V10-24549	2010	Deutschland, Ludwigburg	Mensch	3c	FR846450	98,8 %
V10-11293	2010	Deutschland, Eberswalde	Mensch	3c	FN985025	98,8 %
V10-25911	2010	Deutschland, Mainz	Mensch	3c	FR846451	98,3 %
V10-23239	2010	Deutschland, Ulm	Mensch	3c	FR728255	98,3 ,%
V10-06699	2010	Deutschland, Hannover	Mensch	3c	FN994997	97,9 %
V10-20087	2010	Deutschland, München	Mensch	3c	FR728253	96,7 %
NLSW99	2001	Niederlande	Schwein	3c	AF336012.1	94,2 %
NLSW105	2001	Niederlande	Schwein	3c	AF336013.1	93,4 %
V10-15214	2010	Deutschland, Essen	Mensch	3c	FR728248	92,9 %

**Tabelle 19 Liste der Einträge in der lokalen HEV-Datenbank des Konsiliarlaboratoriums (bestehend aus eigenen Isolaten und Referenzsequenzen nach Lu et al.<sup>15</sup>) mit der größten Nukleotidsequenzähnlichkeit zum ORF-1-Fragment des Isolates R269 (Zugangsnummern beziehen sich auf die GenBank/ENA/DDBJ Datenbank).**

Das aus Leberprobe R269 isolierte Virus ist am ähnlichsten zu Viren des Genotyps 3 mit Subgenotyp 3c (siehe Tabellen 18 und 19).

Beide Isolate haben große Übereinstimmung mit Isolaten, die sowohl aus Menschen, als auch aus Schweinen oder Wildschweinen isoliert wurden. Alle diese Virusstämme stammen aus sehr unterschiedlichen Ursprungsländern.

Der folgende phylogenetische Baum (Abbildung 14) zeigt die Einordnung der zwei neu isolierten Viren in die verschiedenen Genotypen und Subgenotypen. Der Baum besteht aus einer Auswahl an unterschiedlichen Virusisolaten, die von diversen Spezies stammen. Es sind Isolate von Schweinen, Hühnern, Wildschweinen und Menschen aus unterschiedlichen Ländern aufgeführt.



**Abbildung 14 Phylogenetischer Baum der ORF-1-Nukleotidsequenzen von ausgewählten HEV-Isolaten, der nach der "Rooted maximum likelihood"-Methode berechnet wurde. Die Sequenzen der neu isolierten Hepatitis-E-Viren (swR437 und swR269) ordnen sich in den Gentotyp 3 ein. FN995000 repräsentiert ein kürzlich bei einem infizierten Menschen nachgewiesenes Virus mit hoher Ähnlichkeit zu swR269. Die ausgewählten Sequenzen bestehen aus den ähnlichsten Sequenzen in der GenBank und typischen Vertretern der Genotypen 1, 2 und 4. Als Außengruppe mit großer genetischer Distanz wurde das aviäre Hepatitis-E-Virus verwendet. Die Nummern an den Knotenpunkten zeigen Bootstrap-Werte über 50 % an. Die Sequenzen sind mit ID, Ländercode, Quelle und Jahr der Isolation (oder Jahr der Publikation) bezeichnet (Gt, Gentyp; hu, Menschenisolat; sw, Schweineisolat; wb, Wildschweinisolat; ch, Hühnerisolat).**

#### **4.1.4.4. Vergleich der Nukleotidsequenz mit einem Virusstamm eines Patienten**

Die größte genetische Verwandtschaft der ORF-1-Sequenz des Isolates R269 zeigt sich, abgesehen von einem Virusisolat aus einem niederländischen Schwein (EF372556, Tabelle 18), mit der ORF-1-Sequenz des Isolates FN995000. Dieser Virusstamm wurde aus dem Serum eines Patienten isoliert, der sich mit unspezifischen Symptomen, wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit, im Jahr 2010 im Universitätsklinikum Regensburg vorstellte. Erst später wurde unser Virusisolat aus den Schweinelebern isoliert und die große Ähnlichkeit deutlich. Abbildung 15 zeigt ein Alignment der ORF-1-Nukleotidsequenzen einer Subgenotyp-3c-Referenzsequenz (AF336012), des Isolats R269, des Virusstammes des Patienten und zweier weiterer sehr ähnlicher Virusisolale aus der GenBank. Es sind jeweils nur die sich von der Referenzsequenz unterscheidenden Basen aufgelistet.

	1		50				
AF336012	TGGTTCGGCC	GTTTTTATCT	CGTGTGCAAA	CTGAGATCCT	TATTAATCTG	NL	gt3c
R269	.....	.....	.....	.....	T..	.....	Regensburg
FN995000	.....	.....	.....	.....	T..	.....	Regensburg
FN985025	.....	.....	.....	.....	T..	.....	Eberswalde
EF372556	.....	.....	.....	.....	T..	.....	NL
	51		100				
AF336012	ATGCAACCTC	GGCAGCTGGT	TTTCCGACCT	GAAGTGCTCT	GGAATCATCC	NL	gt3c
R269	.....	C.	T....	...T	.....	T..	.....
FN995000	.....	C.	.....	..T..	.....	T..	.....
FN985025	.....	C.	T....	...T..	.....	.....	Eberswalde
EF372556	.....	C.	T....	...T..	.....	.....	NL
	101		150				
AF336012	TATCCAACGG	GTTATCCATA	ATGAACTAGA	ACAGTACTGT	CGGGCCCCGGG	NL	gt3c
R269	.....	.....	T....	...T..	.....	.....	Regensburg
FN995000	.....	.....	.....	..T..	.....	.....	Regensburg
FN985025	.....	.....	.....	.....	.....	.....	Eberswalde
EF372556	.....	.....	T....	...T..	.....	.....	NL
	151		200				
AF336012	CCGGTCGTTG	TCTAGAGGTT	GGTGCCCACC	CAAGATCCAT	CAATGATAAAC	NL	gt3c
R269	..T.....	.....	..G..	.....	T.....C...	.....	Regensburg
FN995000	..T.....	.....	..G..A	.....	T.....C...	.....	Regensburg
FN985025	..T.....	T.....	..G..	.....	T.....C...	.....	Eberswalde
EF372556	..T.....	.....	..G..	.....	T.....C...	.....	NL
	201		242				
AF336012	CCGAATGTTC	TGCACCGGTG	CTTTCTACGA	CCAGTTGGGC	GG	NL	gt3c
R269	..A.....	.....	.....	.....	A ..A	.....	Regensburg
FN995000	..A.....	.....	.....	.....	A ..A	.....	Regensburg
FN985025	..A.....	.....	.....	.....	A ..A	.....	Eberswalde
EF372556	..A.....	.....	.....	.....	A ..A	.....	NL

**Abbildung 15** Alignment des neuen HEV-Isolates R269 mit Sequenzen von großer Ähnlichkeit (GenBank) und einer Subgenotyp-3c-Referenzsequenz (AF336012). Die Herkunft eines jeden Isolates ist rechts bezeichnet (NL, Niederlande). FN995000 (blau) stammt von einem symptomatischen 56-jährigen Mann, der mit diesem Hepatitis-E-Virustyp infiziert war.

## 4.2. Untersuchung der Serumproben

Die Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus in Deutschland differiert in Studien je nach verwendetem Test stark.<sup>47,48</sup> Aus diesem Grunde sollte eine Stichprobe von 200 Mitarbeitern des Universitätsklinikums Regensburg mit den vier kommerziell erhältlichen Testsystemen auf Antikörper gegen Hepatitis E getestet werden und so einen Eindruck der Durchseuchung in der regionalen Bevölkerung liefern.

Zusätzlich wurden die vier Testsysteme auch bei Seren von 30 Patienten mit einer akuten Hepatitis E angewandt (positiver Direktnachweis mittels PCR), um die Sensitivität der Testsysteme beurteilen zu können.

### 4.2.1. Auswahl der Serumproben

Alle verwendeten Serumproben waren bereits vorhandene, anonymisierte Restproben aus der Serumbank (Lagerung bei -80° C) des Institutes für klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg.

#### 4.2.1.1. Serumproben der regionalen Bevölkerung

Zur Testung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus in der regionalen Bevölkerung in Regensburg wurde eine Stichprobe von 200 bereits vorhandenen Restproben aus der Serumbank entnommen. Alle Proben stammten von Angestellten des Universitätsklinikums Regensburg. Sie wurden im Rahmen von betriebsärztlichen Untersuchungen an das Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg geschickt und waren anonymisiert. Bei der Auswahl der Seren achtete man auf eine möglichst kurze Lagerung, so dass ausschließlich Seren verwendet wurden, die zwischen Februar 2009 und März 2010 von Patienten abgenommen wurden. Zudem wurde eine Auswahl der Seren vorgenommen, so dass das Alter der Serumspender zum Zeitpunkt der Blutabnahme dem Altersquerschnitt der deutschen Bevölkerung im Jahr 2010 am ehesten entsprach. Nachdem keine Proben von Spendern, die vor 1945 und nach 1993 geboren sind, vorhanden waren, beschränkte sich die Stichprobe auf diesen Zeitraum.

Die Abbildung 16 zeigt den Anteil der jeweiligen Geburtenjahrgänge an der Gesamtmenge der zwischen 1945 und 1993 geborenen Personen in Deutschland. Die Angaben beziehen sich auf die 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung des statistischen Bundesamtes<sup>104</sup>.

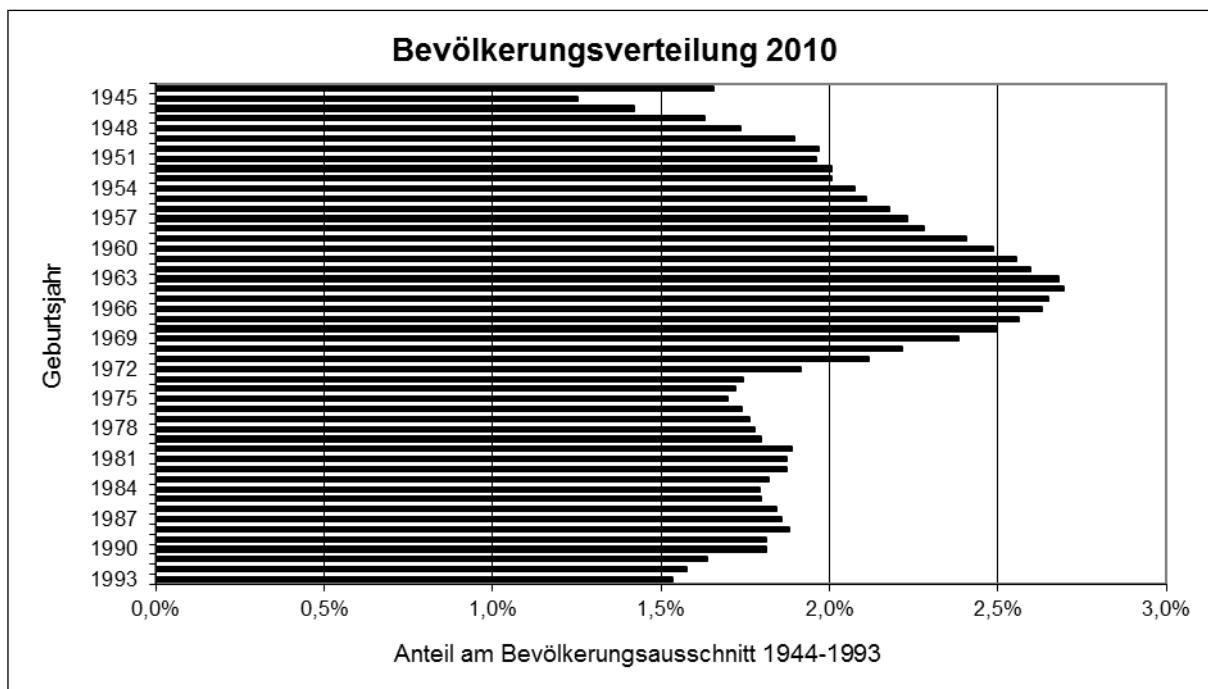


Abbildung 16 Altersverteilung der deutschen Bevölkerung im Jahr 2010 (Daten entnommen aus der 12. Koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des statistischen Bundesamtes<sup>104</sup>).

Abbildung 17 zeigt die Anzahl der mit der obigen Abbildung 16 abgeglichenen Serumproben, die für die Tests verwendet wurden. Die Anteile von Männern und Frauen wurden pro Jahrgang in etwa gleich groß gestaltet.

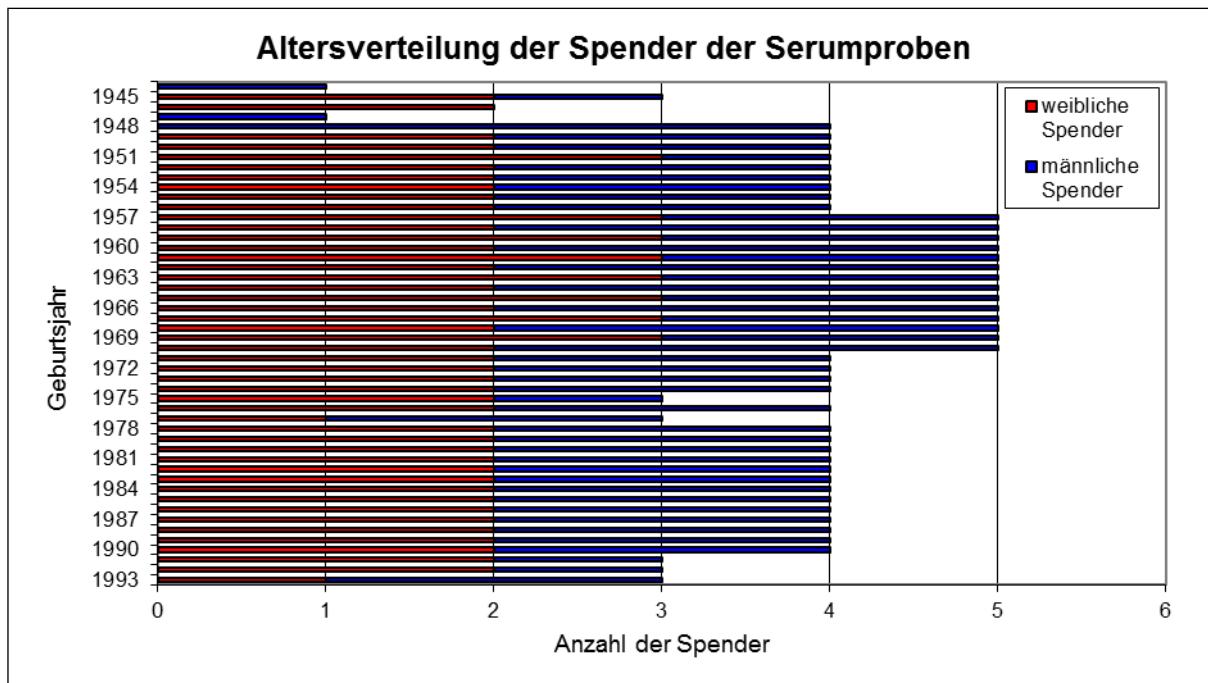


Abbildung 17 Verteilung der ausgewählten Serumproben nach Jahrgängen.

#### *4.2.1.2. Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E*

Für die Beurteilung der Sensitivität der Testsysteme suchte man aus der Serumbank des Institutes für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg alle Serumrestproben der Diagnostik von Patienten, die eine akute Hepatitis E hatten. Im Zeitraum von 2007 bis 2010 waren 30 Serumproben abgenommen worden, bei denen entweder in derselben Serumprobe, in einer Stuhlprobe vom gleichen Tag oder in einer früheren Serumprobe (im Folgenden „Vorserum“ genannt) HEV-RNA nachgewiesen werden konnte. Bei einem Nachweis des Virus in der identischen Probe wurde davon ausgegangen, dass schon Antikörper vorhanden waren und deshalb die Probe in den serologischen Testsystemen positiv sein müsste. Ein positives Vorserum bedeutet, dass in einer Serumprobe, die zu einem früheren Zeitpunkt abgegeben wurde, HEV-RNA detektiert wurde und der Patient somit in der verwendeten Serumprobe noch bestehende Antikörpertiter aufweisen müsste.

Alle Patienten, deren Seren verwendet wurden, hatten in Vorproben (welche jeweils im gleichen Jahr abgenommen wurden wie die getestete Probe) oder in derselben Probe, die verwendet wurde, ein positives Ergebnis für Hepatitis E in der Taqman-PCR oder in der nested PCR. Die folgende Tabelle 20 charakterisiert die 30 Testseren.

Proben ID	Abnahmedatum der Probe	Ergebnis in der Hepatitis-E-PCR in Kopien pro ml Serum	Genotyp des Virus, nachgewiesen mit nested PCR
1	2007	Positiv*	3
2	2007	Positiv*	1
3	2007	Positiv*	3
4	2007	$5,1 \times 10^7$	3
5	2007	$5,1 \times 10^5$	3
6	2007	$1,6 \times 10^4$	**
7	2008	$1,9 \times 10^3$	**
8	2008	$10^2\text{-}10^3$	**
9	2009	$1,9 \times 10^4$	**
10	2009	$3,3 \times 10^5$	3
11	2009	$10^2\text{-}10^3$	VS: $4,2 \times 10^6$
12	2009	Stuhlprobe: $7,6 \times 10^3$	**
13	2010	Vorserum: $4,4 \times 10^5$	3c
14	2010	$7,2 \times 10^3$	3f
15	2010	Vorserum: konventionelle nested PCR positiv	3e
16	2010	$2,4 \times 10^6$	1a
17	2010	$5,4 \times 10^3$	3
18	2010	$1,1 \times 10^3$	3f
19	2010	$5,3 \times 10^3$	3c
20	2010	Vorserum: $2,9 \times 10^6$	1a
21	2010	Stuhlprobe: $6,5 \times 10^3$	3
22	2010	Vorserum: $1,2 \times 10^3$	**
23	2010	$4,7 \times 10^3$	3c
24	2010	$1,6 \times 10^6$	3
25	2010	Vorserum: $6,3 \times 10^4$	3
26	2010	$1,4 \times 10^4$	3
27	2010	$2,6 \times 10^5$	3
28	2010	$6,0 \times 10^3$	3
29	2010	$4,8 \times 10^4$	3
30	2010	$2,6 \times 10^6$	3

**Tabelle 20 Übersicht über die Auswahl der Serumproben von Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E (\*keine quantitativen Ergebnisse verfügbar, \*\*keine Daten vorhanden).**

#### 4.2.2. Die Prävalenz der Antikörper gegen HEV in der regionalen Bevölkerung

Die Antikörperprävalenz in der regionalen Bevölkerung wurde an 200 Serumrestproben ermittelt.

##### 4.2.2.1. Testergebnisse nach Zweifachtestung

Die Auswahl der 200 Proben wurde in Kapitel 4.2.1.1. (Seite 57) erläutert. Alle positiven Ergebnisse wurden in einem zweiten Testdurchlauf verifiziert und nur im Falle von übereinstimmenden positiven Resultaten als positiv bewertet.

###### 4.2.2.1.1. MP ELISA

Die Testung der Serumproben mit dem MP ELISA IgG ergab in der Zweifachtestung bei neun der 200 Proben ein positives Ergebnis, wie Abbildung 18 zeigt.

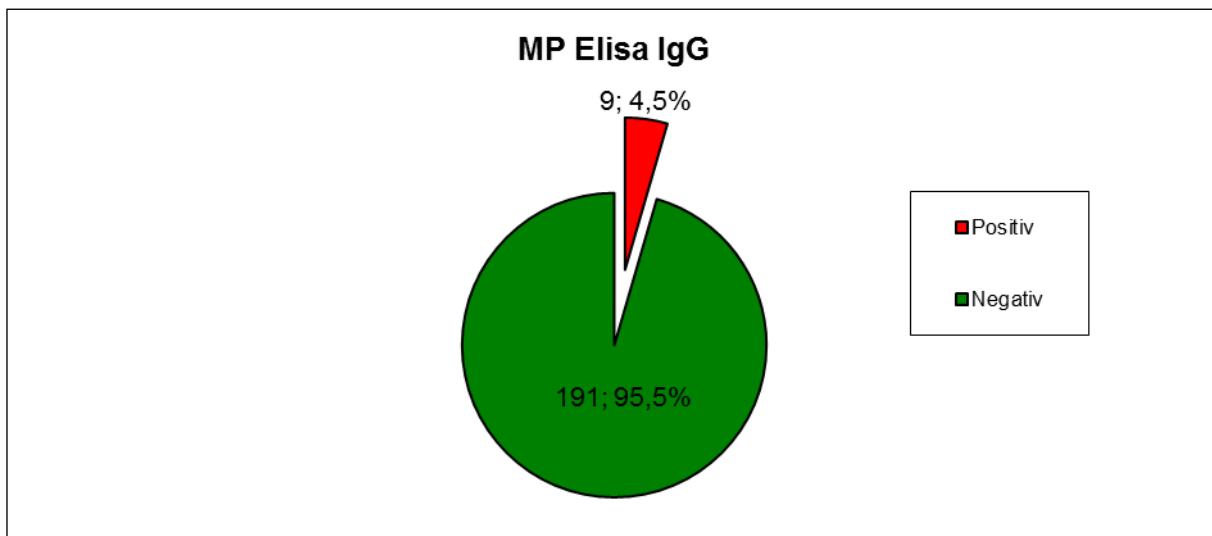


Abbildung 18 Testergebnis des MP ELISA IgG bei den Serumproben der regionalen Bevölkerung.

In Abbildung 19 wird die Verteilung der positiven und negativen Testergebnisse nach Geburtenjahrgängen dargestellt. Es sind hierbei jeweils fünf Geburtenjahrgänge in einem Balken dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die in den Jahrgängen zwischen 1944 und 1973 geborenen Personen häufiger Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus aufweisen, als die in den Jahrgängen nach 1974 geborenen Personen.

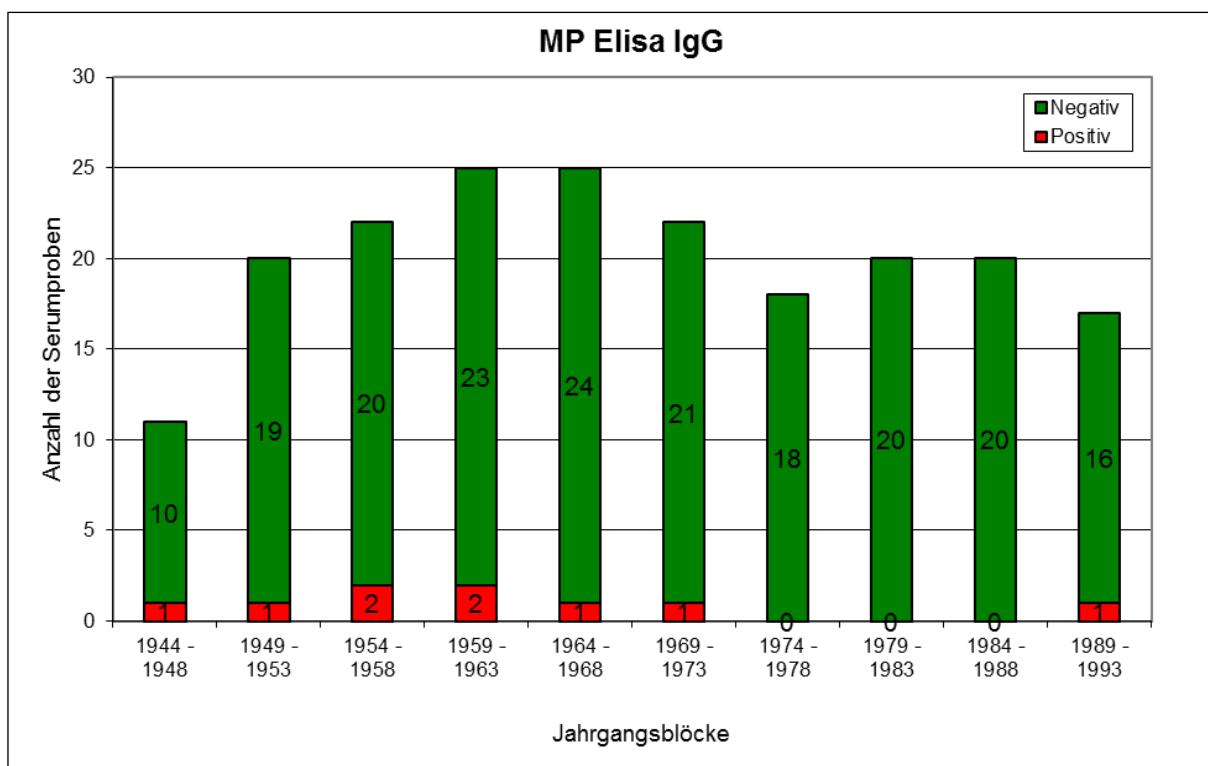


Abbildung 19 Verteilung der positiven Ergebnisse des MP ELISA IgG nach Geburtenjahrgängen.

Die positiven Ergebnisse sind in Abbildung 20, aufgeteilt nach Männern und Frauen, dargestellt. Der Anteil an positiven Ergebnissen bei Männern und Frauen ist bei diesem Test ausgeglichen und liegt bei beiden Geschlechtern bei zirka 5 %.

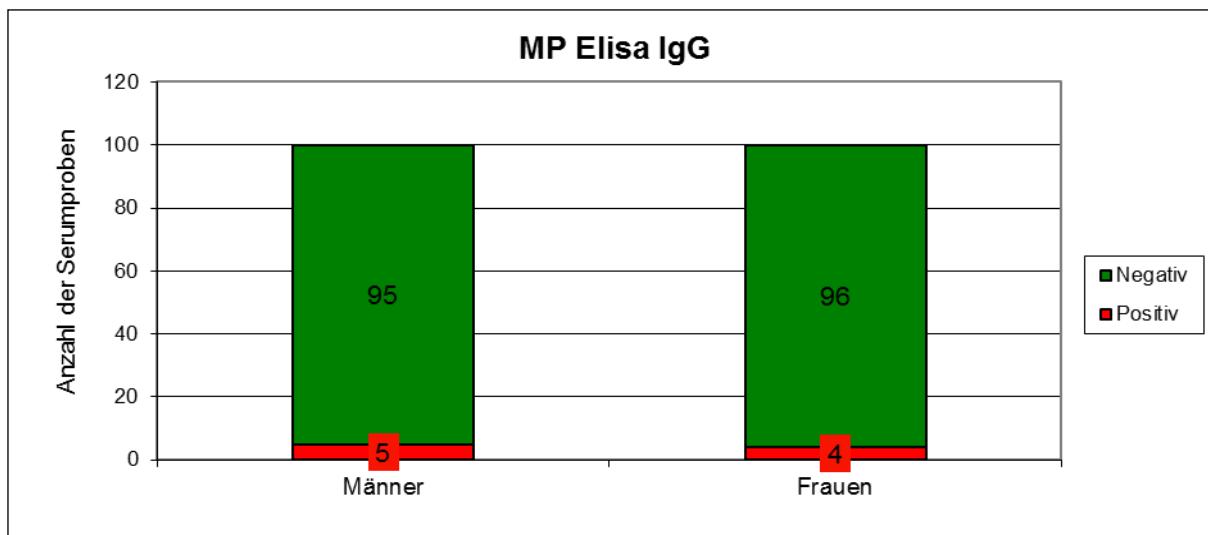


Abbildung 20 Antikörperprävalenz gemessen mit dem MP ELISA IgG, aufgeteilt nach Männern und Frauen.

#### 4.2.2.1.2. Axiom ELISA IgG

Wesentlich höher als beim MP ELISA fällt die Antikörperprävalenz beim Axiom ELISA IgG aus (Abbildung 21). Hier sind 60 der 200 Proben in der Zweifachtestung positiv. Dies entspricht einer anti-HEV Prävalenz von 30 %.

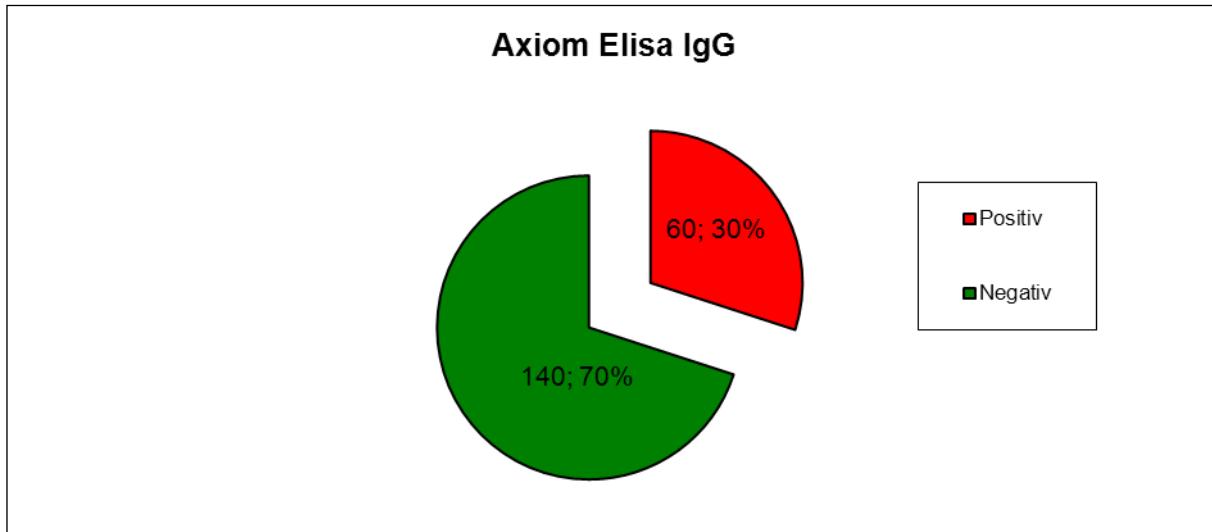


Abbildung 21 Testergebnis des Axiom ELISA IgG bei den Serumproben der regionalen Bevölkerung.

Bei der Verteilung nach dem Geburtsjahrgang zeigt sich hier der größte Anteil der Antikörper-positiven Spender in den Jahrgängen vor 1978 und einer Häufung zwischen 1949 und 1953 (siehe Abbildung 22). In den jüngeren Jahrgängen ist ein positives Ergebnis deutlich seltener vorzufinden.

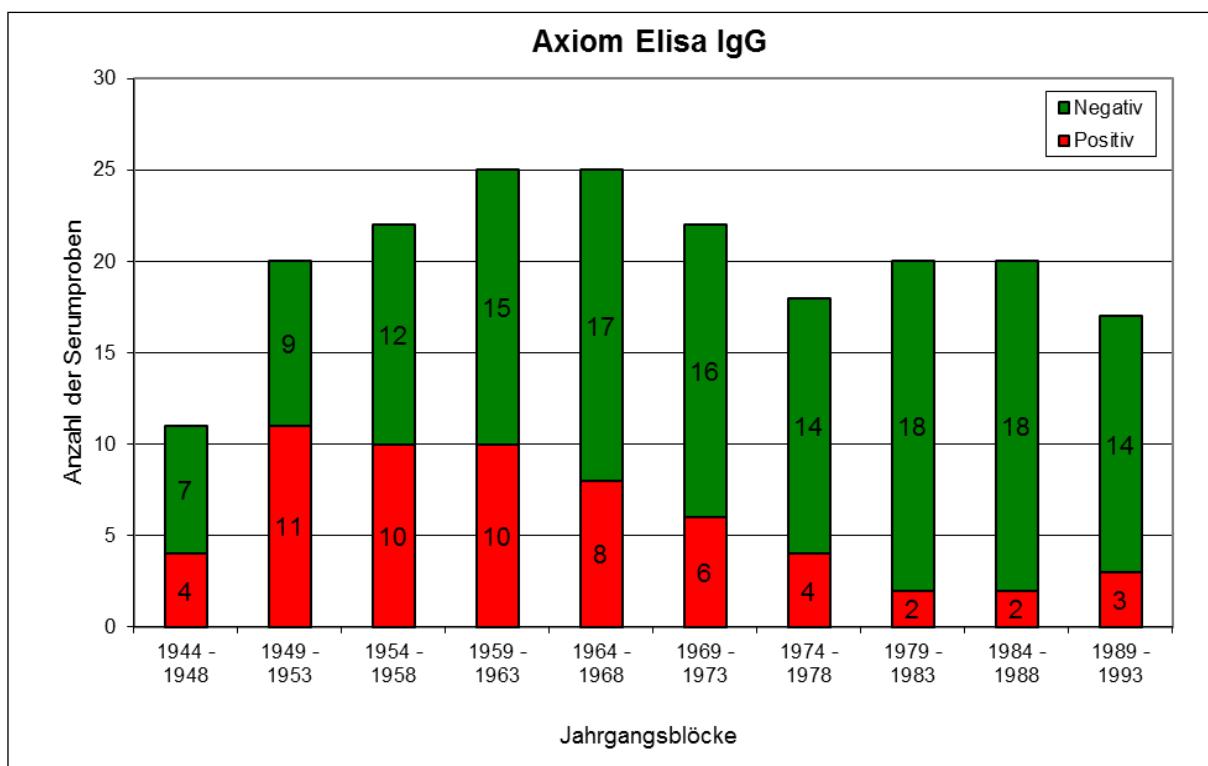


Abbildung 22 Verteilung der positiven Ergebnisse des Axiom ELISA IgG nach Geburtenjahrgängen.

Die Verteilung der positiven Testergebnisse nach Geschlecht zeigt beim Axiom ELISA IgG einen höheren Anteil an männlichen Spendern, die anti-HEV-positiv sind. Wie in Abbildung 23 dargestellt, weisen 34 % der Männer und 26 % der Frauen Antikörper auf.

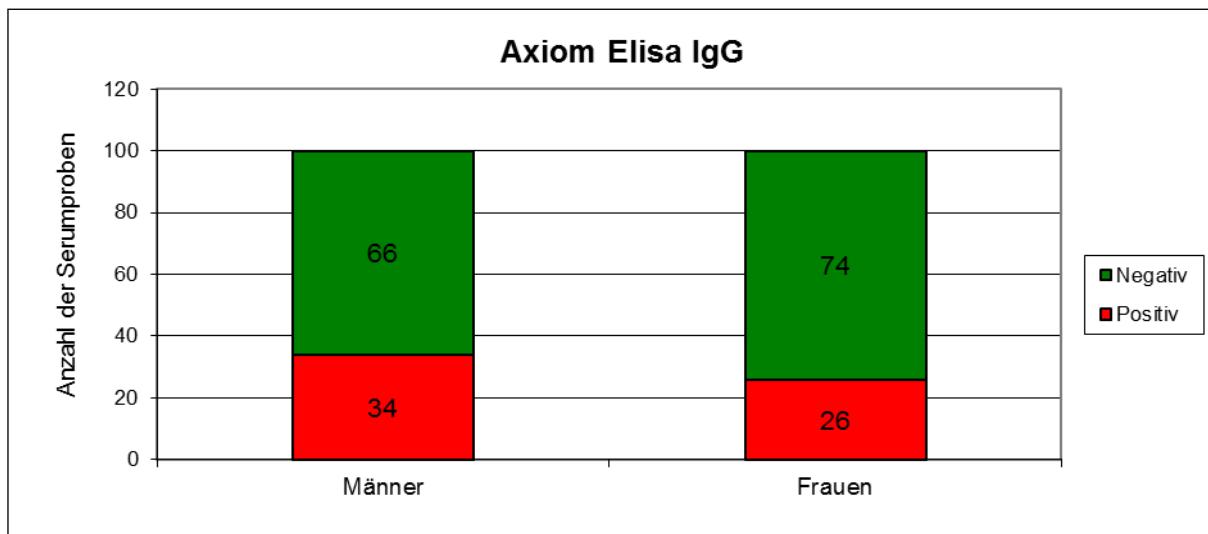


Abbildung 23 Antikörperprävalenz gemessen mit dem Axiom ELISA IgG, aufgeteilt nach Männern und Frauen.

#### 4.2.2.1.3. Axiom ELISA Ab

Der Axiom ELISA Ab weist die höchste Anzahl an positiven Ergebnissen in der Zweifachtestung der 200 Serumproben auf. Wie Abbildung x zeigt, wurden bei 69 Proben Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus nachgewiesen. Dies entspricht einer anti-HEV Prävalenz von 34,5 %.

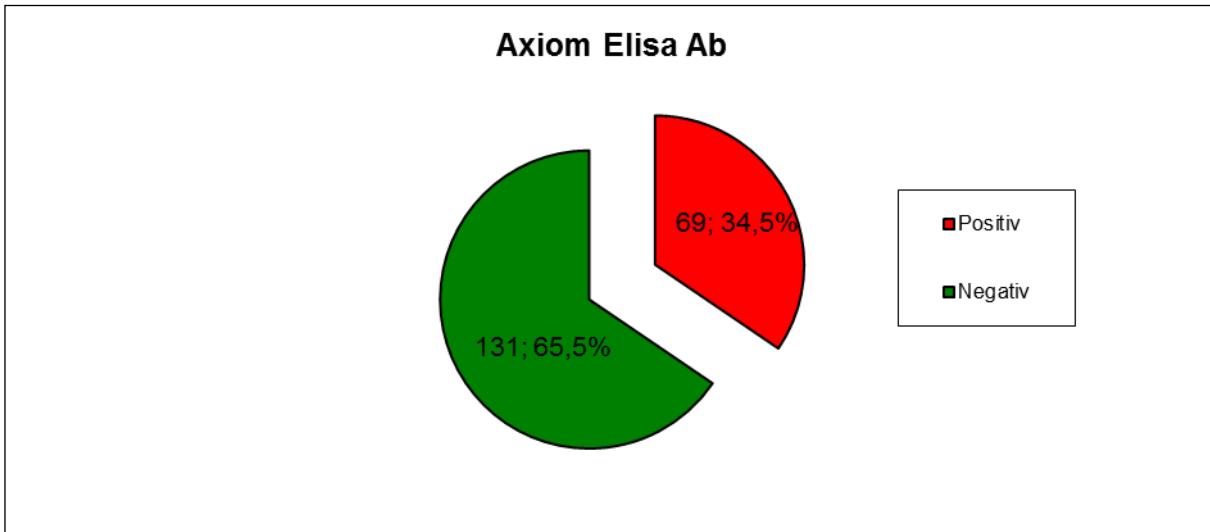


Abbildung 24 Testergebnis des Axiom ELISA Ab bei den Serumproben der regionalen Bevölkerung.

Auch bei diesem Testsystem zeigt sich eine Häufung der anti-HEV-positiven Spender in den älteren Jahrgängen, die vor 1978 geboren wurden. Aus Abbildung 25 wird zudem ersichtlich, dass die in den Jahrgängen 1949–1953 geborenen Personen, die in unserer Studie getestet wurden, zu mehr als 50 % anti-HEV Antikörper aufweisen.

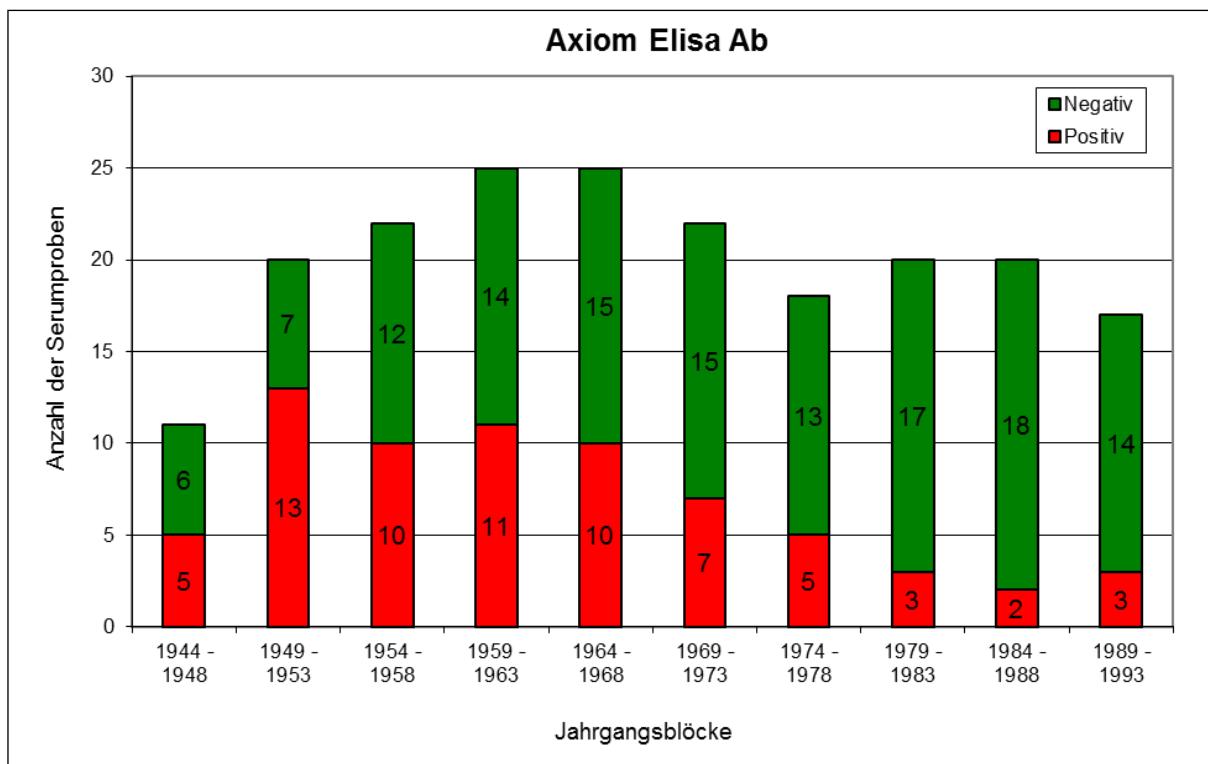


Abbildung 25 Verteilung der positiven Ergebnisse des Axiom ELISA Ab nach Geburtenjahrgängen.

Betrachtet man die Geschlechterverteilung der Ergebnisse des Axiom ELISA Ab (Abbildung 26) zeigt sich eine höhere Antikörperprävalenz von 38 % bei den Männern, im Vergleich zu 31 % bei den Frauen.

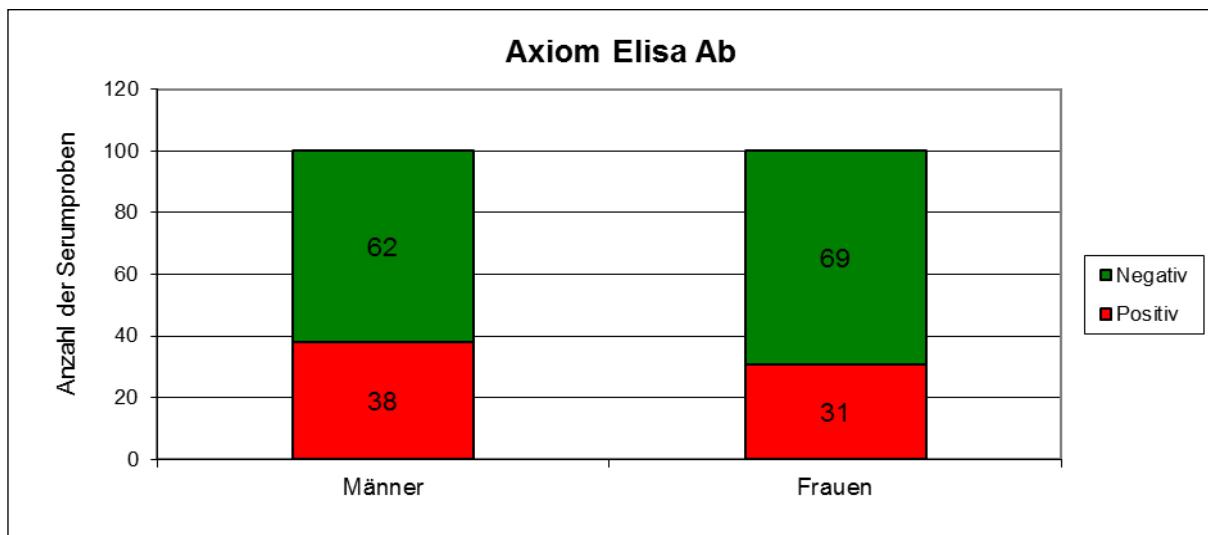
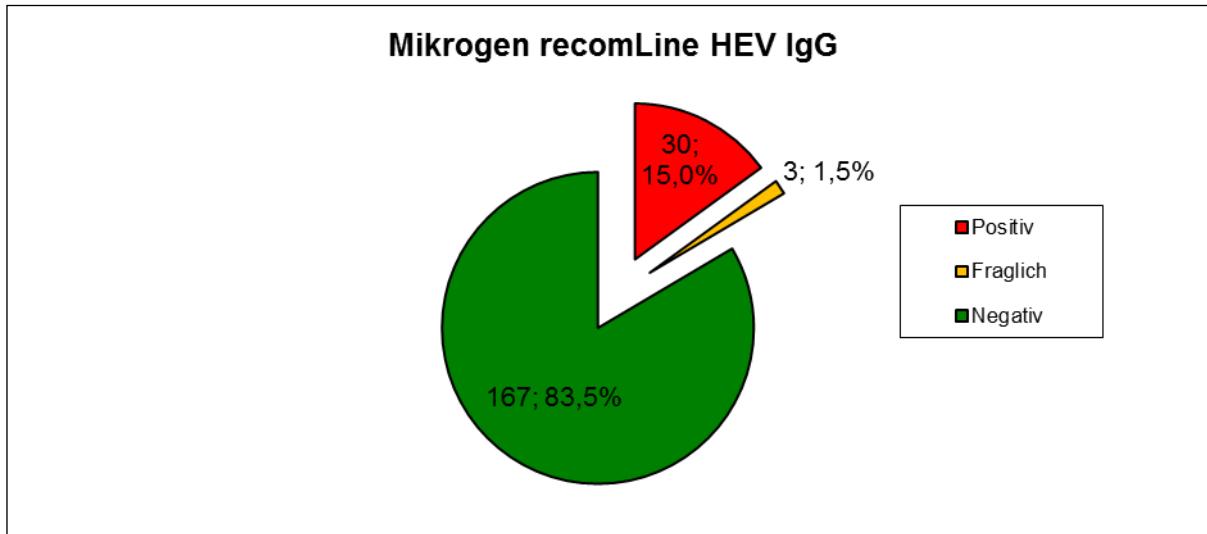


Abbildung 26 Antikörperprävalenz gemessen mit dem Axiom ELISA Ab, aufgeteilt nach Männern und Frauen.

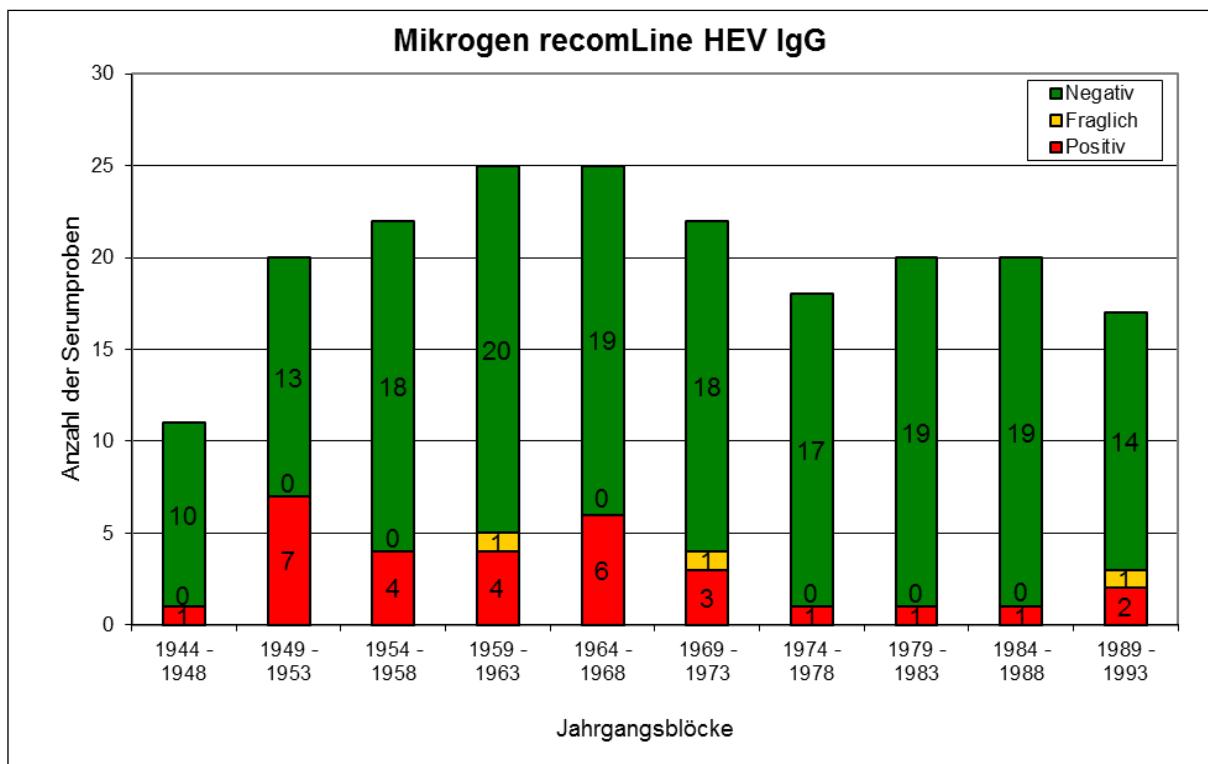
#### 4.2.2.1.4. Mikrogen recomLine HEV IgG

Die Anzahl der positiven Ergebnisse des Mikrogen recomLine HEV IgG liegen mit 30 von 200 Proben im Mittelfeld der anderen Ergebnisse. Abbildung 27 zeigt einen Anteil von 15 % anti-HEV-positiven Serumproben und 1,5 % von Seren mit fraglichem Testergebnis. Alle diese Ergebnisse sind durch Zweifachtestung bestätigt worden.



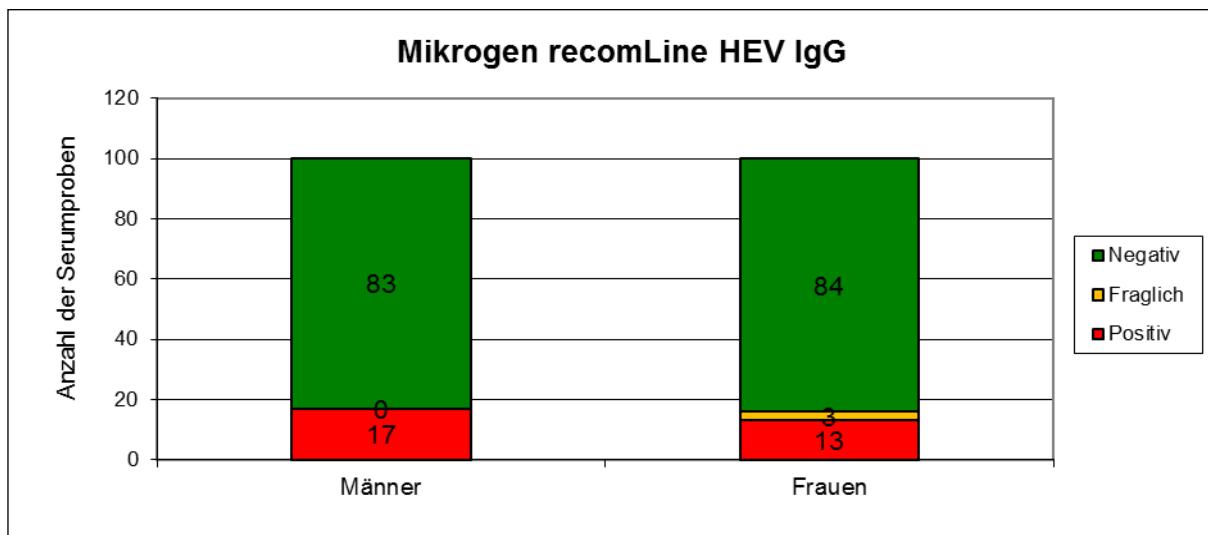
**Abbildung 27 Testergebnis des Mikrogen recomLine HEV IgG bei den Serumproben der regionalen Bevölkerung.**

In Abbildung 28, welche die Verteilung der Ergebnisse nach Geburtenjahrgängen zeigt, sieht man wieder die Häufung der positiven Ergebnisse bei den älteren Spendern, in diesem Fall vor 1973 mit dem Gipfel bei den zwischen 1949 und 1953 geborenen.



**Abbildung 28** Verteilung der positiven Ergebnisse des Mikrogen recomLine HEV IgG nach Geburtenjahrgängen.

Wenn man die fraglichen Testergebnisse als reaktiv zu den positiven Ergebnissen zählt, dann zeigt sich die Geschlechterverteilung in Abbildung 29 ausgeglichen mit 17 % anti-HEV-positiven Männern und 16 % anti-HEV-positiven Frauen.



**Abbildung 29** Antikörperprävalenz gemessen mit dem Mikrogen recomLine HEV IgG, aufgeteilt nach Männern und Frauen.

#### *4.2.2.1.5. Mikrogen recomLine HEV IgM*

Die Serumproben, die bei der Testung mit dem Mikrogen recomLine HEV IgG eine sehr starke Intensität bei den Banden aufwiesen, wurden zusätzlich auf IgM-Antikörper mit dem Mikrogen recomLine HEV IgM getestet. Somit könnten akute unentdeckte Fälle von Hepatitis E in der ausgewählten Testgruppe der Bevölkerung detektiert werden. Von den 200 Proben fielen bei 13 Proben stark gefärbte Bandenmuster im IgG-Test auf, bei keiner dieser Proben konnte eine Reaktivität für den IgM-Test nachgewiesen werden.

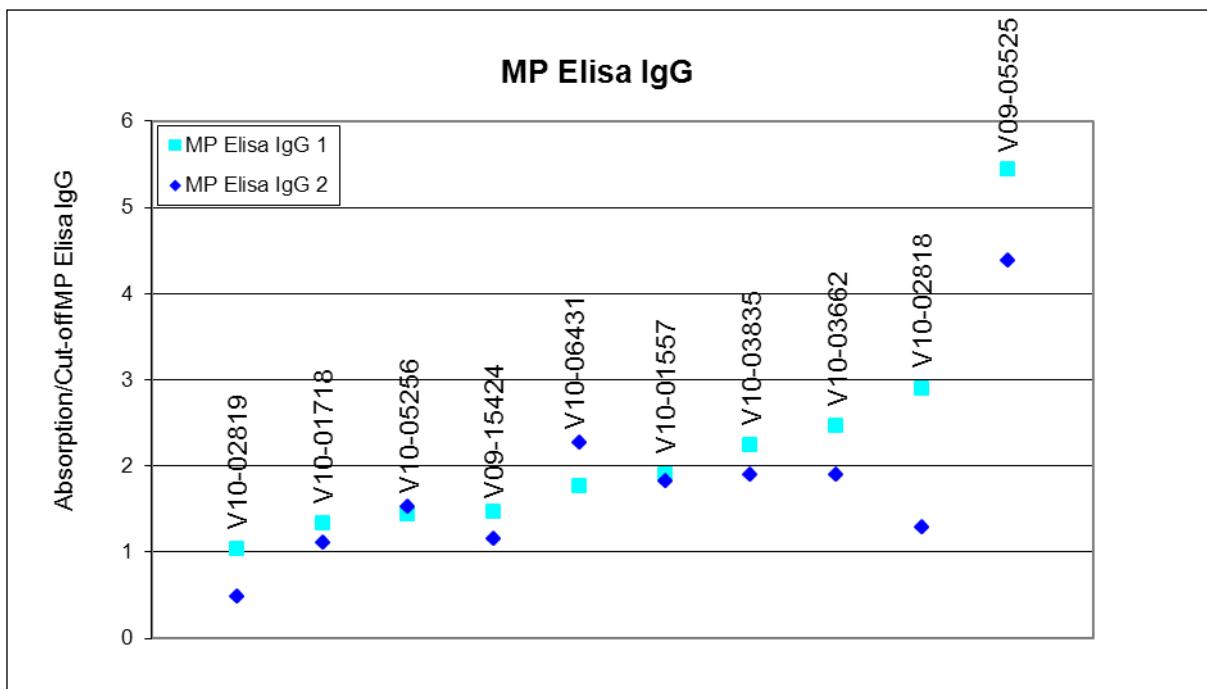
#### *4.2.2.2. Darstellung divergenter Ergebnisse*

Sowohl durch die Zweifachtestung als auch durch die Verwendung der verschiedenen Testsysteme ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse für identische Proben. In den folgenden Kapiteln wird versucht, diese Divergenzen darzustellen und zu erläutern.

#### 4.2.2.2.1. MP ELISA IgG

Folgende Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Serumproben, die in der ersten Testung mit dem MP ELISA IgG ein positives Ergebnis aufwiesen. Als y-Wert ist der Quotient aus jeweils gemessener Absorption und dem für den Testdurchlauf ermittelten Cut-off-Wert aufgetragen (S/CO). Für ein positives Ergebnis müsste sich also ein y-Wert von größer gleich eins ergeben. Die hellblauen Markierungen repräsentieren die Werte, die im ersten Test erzielt wurden, und die dunkelblauen Markierungen die Werte, die im Bestätigungstest erreicht wurden. Die Proben wurden aufsteigend nach den Werten der ersten Testung geordnet.

Insgesamt liefern die beiden Tests konkordante Ergebnisse, wobei bei den Serumproben V10-02818 und V09-05525 die Werte stärker voneinander abweichen. Somit wurden durch die zweite Testung neun der zehn positiven Ergebnisse bestätigt.



**Abbildung 30** Darstellung der Ergebnisse der Serumproben, die im ersten Testdurchlauf positiv waren, der zwei Testdurchläufe mit dem MP ELISA IgG. Nach oben ist der Quotient der jeweils gemessenen Absorption durch den Cut-off aufgetragen.

In der Abbildung 31 werden die doppelt ermittelten Ergebnisse des MP ELISA IgG (hell- und dunkelblaue Markierungen) mit den doppelt ermittelten Ergebnissen des Axiom ELISA IgG (hell- und dunkelgrüne Markierungen) verglichen.

Als y-Werte wurde wieder das Verhältnis von Absorption der jeweiligen Probe zum Cut-off-Wert aufgetragen. Für den MP ELISA IgG ist die linke y-Achse und für den Axiom ELISA IgG ist die rechte y-Achse zu betrachten. Als positives Ergebnis ist wieder ein Wert von größer eins zu werten.

Vergleicht man die zwei Testsysteme, fällt auf, dass der Quotient aus der Absorption und dem Cut-off-Wert beim Axiom ELISA IgG deutlich höhere Werte hervorbringt als beim MP ELISA IgG. Dies erschwert Vergleiche bezüglich der reinen Absorptionswerte, weshalb die Darstellung in der Quotientenform gewählt wurde.

Insgesamt zeigt sich, dass bei den Proben V10-05256, V10-06431, V10-01557 und V10-03835 die Werte des Quotienten des Axiom ELISA IgG viel höher liegen als beim MP ELISA IgG. Andererseits sind die Proben V10-03662 und V10-02819 im Axiomtest mit sehr niedrigen Werten negativ und im MP ELISA IgG klar positiv zu bewerten.

Die Proben wurden im Diagramm nach aufsteigenden Ergebnissen in der ersten Testung mit dem MP ELISA IgG angeordnet. Die Ergebnisse in den zwei Axiomtesten spiegeln diesen Auswärtstrend in keiner Weise wieder, sondern zeigen eine sehr unsystematische Anordnung.

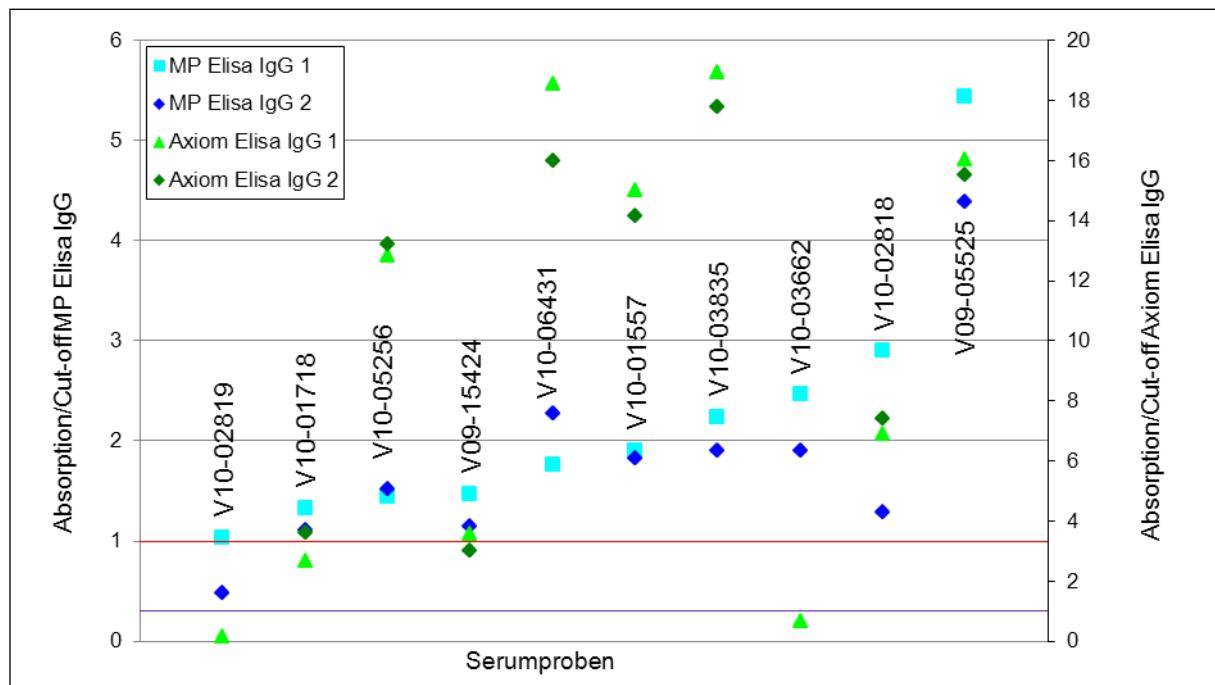


Abbildung 31 Gegenüberstellung der Testergebnisse des MP ELISA IgG und des Axiom ELISA IgG in der Doppeltestung (Seren, die im MP ELISA IgG im ersten Testdurchlauf positiv waren). Die rote Linie entspricht der Grenze, über der die MP ELISA IgG Werte als positiv gewertet werden, und die lila Linie ist die Grenze, über der die Axiom ELISA IgG Werte als positiv gewertet werden.

Betrachtet man den Vergleich zwischen MP ELISA IgG und Axiom ELISA Ab der im MP ELISA IgG positiven Seren in Abbildung 32 wird ein ähnliches Bild sichtbar. Auch hier wurde der Quotient Absorption/Cut-off aufgetragen und für den MP ELISA IgG die linke y-Achse verwendet und für den Axiom ELISA Ab die rechte y-Achse. Die Anordnung in aufsteigender Weise nach den MP ELISA IgG Ergebnissen ist wieder dieselbe und y-Werte größer eins führen zu einem positiven Ergebnis.

Alle Proben haben im Axiom ELISA Ab wesentlich höhere Werte als im MP ELISA IgG, außer V10-02819 und V10-03662. Bei diesen zwei Proben fällt das Ergebnis im Axiom ELISA Ab negativ aus. Der Aufwärtstrend der Ergebnisse im MP ELISA IgG spiegelt sich bei den Werten des anderen Tests nicht wieder, selbst wenn man die negativen Proben außer Acht lässt.

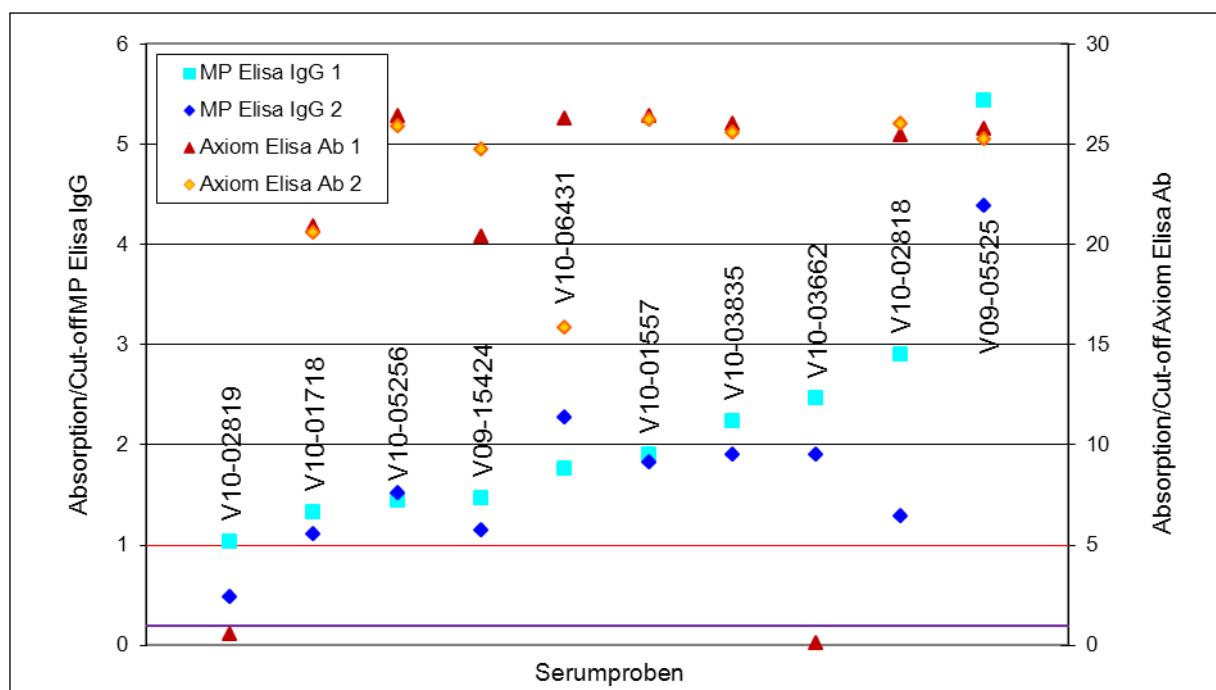


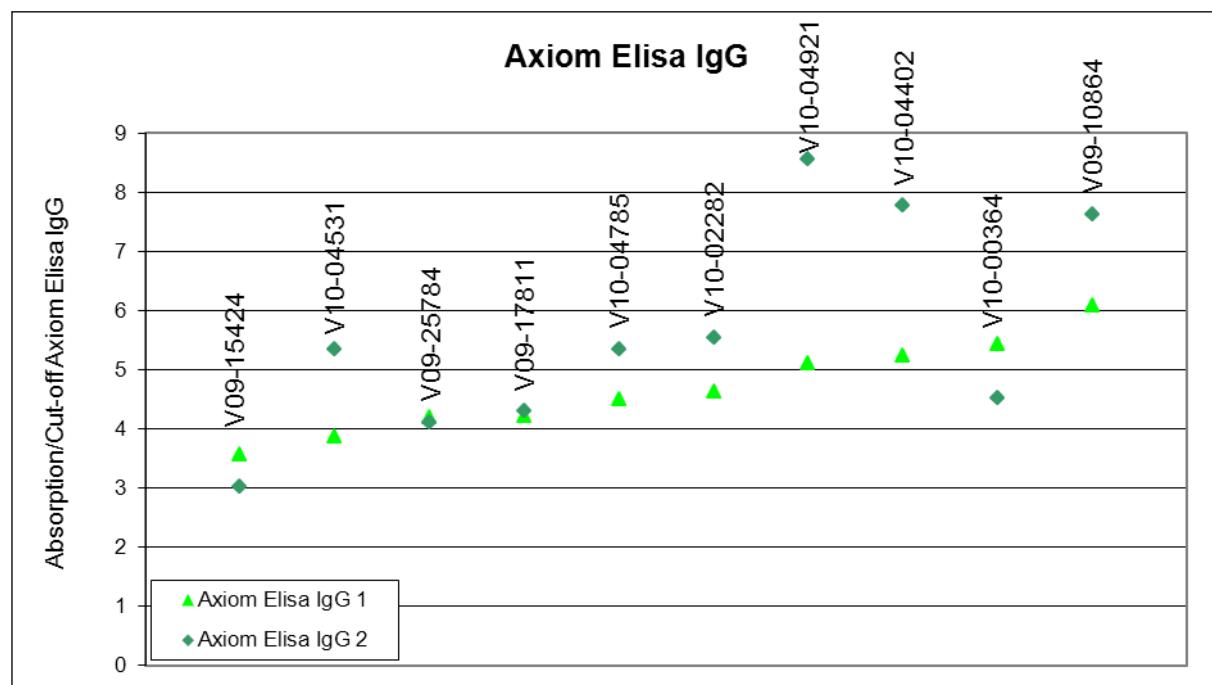
Abbildung 32 Gegenüberstellung der Testergebnisse des MP ELISA IgG und des Axiom ELISA Ab in der Doppeltestung (Seren, die im MP ELISA IgG im ersten Testdurchlauf positiv waren). Die rote Linie entspricht der Grenze, über der die MP ELISA IgG Werte als positiv gewertet werden, und die lila Linie ist die Grenze, über der die Axiom ELISA Ab Werte als positiv gewertet werden.

#### 4.2.2.2.2. Axiom ELISA IgG

Die zweite Testung der positiven Serumproben ergab beim Axiom ELISA IgG, dass eine Probe, die zuvor positiv war, ein negatives Testergebnis hervorbrachte.

Die Resultate einer Auswahl doppelt getesteter Serumproben unter Verwendung des Axiom ELISA IgG sind in Abbildung 33 dargestellt. Wieder wurde auf der y-Achse der Quotient Absorption/Cut-off aufgetragen und somit ergeben Werte größer gleich eins ein positives Ergebnis.

Der Aufwärtstrend der Werte der ersten Testung ist bei den Werten der zweiten Testung zu erkennen, wird jedoch von Ausreißern unterbrochen. Eine gute Übereinstimmung der Werte ergibt sich bei den Proben V09-25784 und V09-17811.



**Abbildung 33** Darstellung der Ergebnisse der zwei Testdurchläufe mit dem Axiom ELISA IgG an einer Auswahl Serumproben, die im ersten Testdurchlauf positiv waren. Nach oben ist der Quotient aus jeweils gemessener Absorption und dem Cut-off aufgetragen.

Abbildung 34 zeigt den Vergleich der zwei Axiom ELISAs anhand der Ergebnisse ausgewählter Serumproben. Der Axiom ELISA Ab liefert um ein Vielfaches höhere Werte als der Axiom ELISA IgG. Der Trend des Axiom ELISA IgG (erster Testdurchlauf) ist bei den zwei Axiom ELISA Ab Testungen nicht zu erkennen.

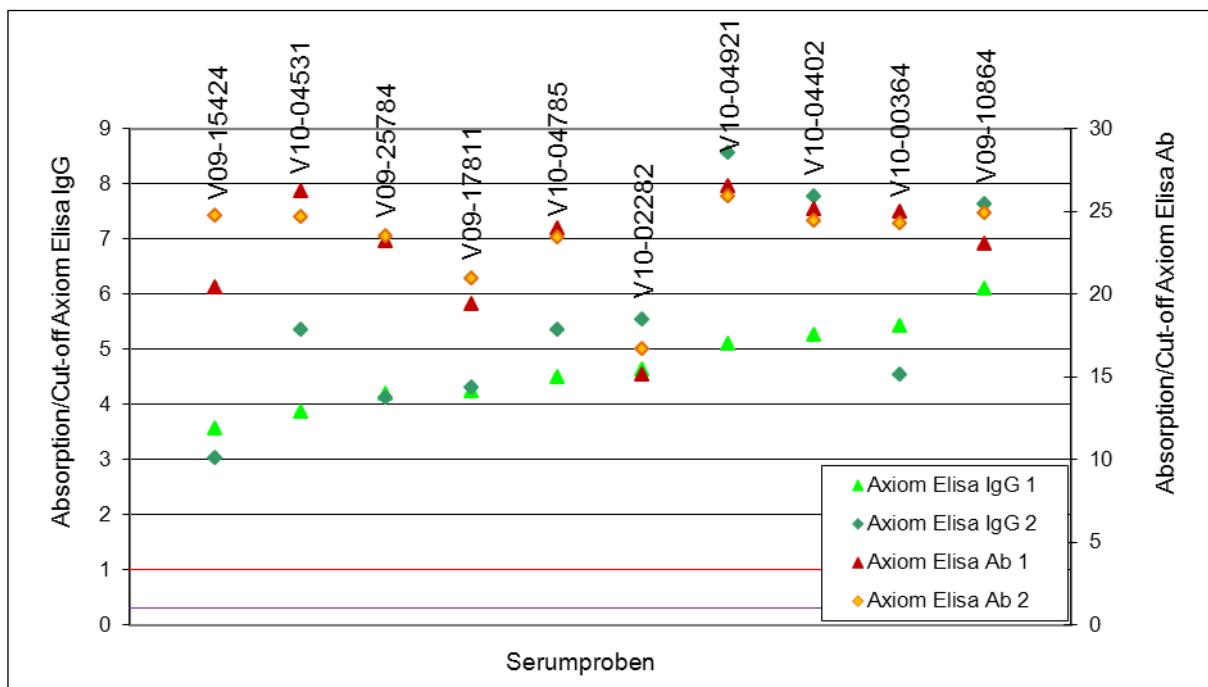


Abbildung 34 Gegenüberstellung der Testergebnisse einer Auswahl von Serumproben des Axiom ELISA IgG und des Axiom ELISA Ab in der Doppeltestung. Die rote Linie entspricht der Grenze, über der die Axiom ELISA IgG Werte als positiv gewertet werden, und die lila Linie ist die Grenze, über der die Axiom ELISA Ab Werte als positiv gewertet werden.

#### 4.2.2.2.3. Axiom ELISA Ab

Die Zweifachtestung der positiven Resultate ergab beim Axiom ELISA Ab, dass für zwei Proben, die in der ersten Testung positiv waren, in der zweiten Testung das Ergebnis negativ wurde.

Abbildung 35 zeigt die Absorption/Cut-off-Werte ausgewählter Proben in der Zweifachtestung.

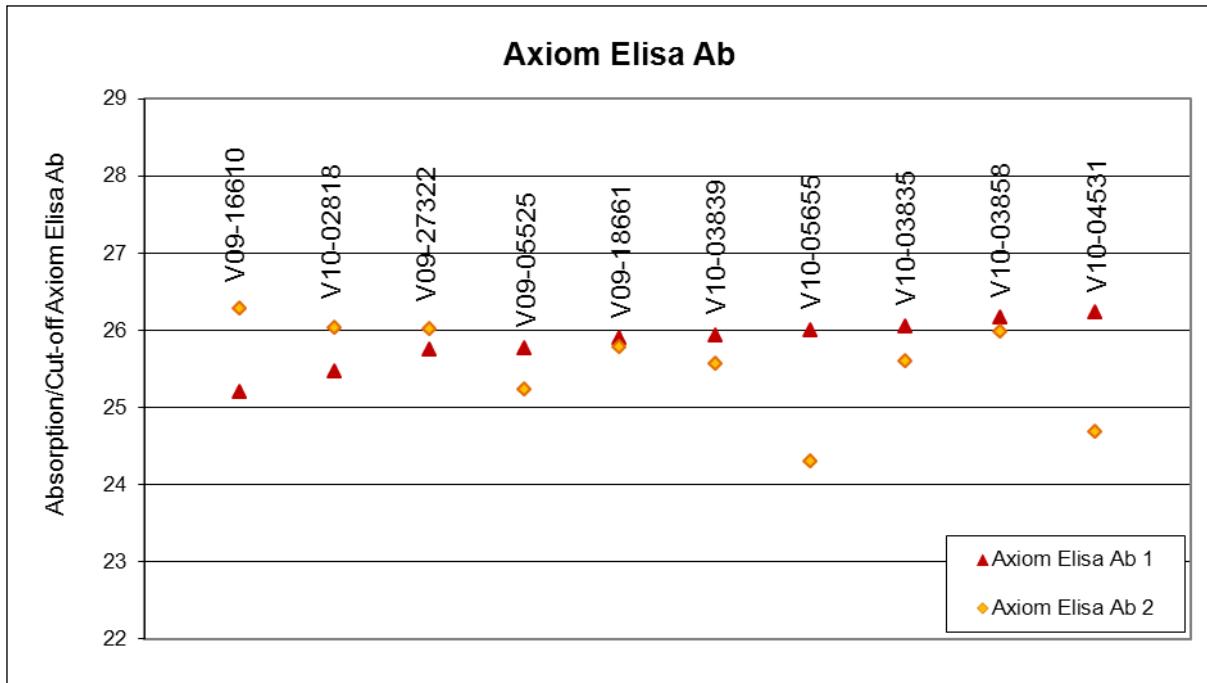


Abbildung 35 Darstellung der Ergebnisse der zwei Testdurchläufe mit dem Axiom ELISA Ab an einer Auswahl an Serumproben, die im ersten Testdurchlauf positiv waren. Nach oben ist der Quotient aus jeweils gemessener Absorption und dem Cut-off aufgetragen.

#### 4.2.2.2.4. Mikrogen recomLine HEV IgG

Bei der zweiten Untersuchung der Seren mit positivem oder fraglichem Ergebnis mit dem Mikrogen recomLine HEV IgG Test ergaben sich einige Veränderungen. So konnten von den 36 positiven Ergebnissen nur 30 bestätigt werden. Von den übrigen sechs Proben wurde eine als fraglich bewertet und die restlichen fünf wurden im zweiten Testdurchlauf negativ. Von den fünf Seren mit ursprünglich fraglichem Ergebnis konnten zwei bestätigt werden und die anderen drei wurden negativ gewertet.

Die unten stehende Tabelle 21 zeigt eine Auswahl von zehn Serumproben und die Ergebnisse in den zwei Testdurchläufen. Gemessen wurde jeweils die Intensität der jeweiligen Bande in Prozent der Intensität der Cut-off-Bande und durch 1-5 Pluszeichen dargestellt. Die Bezeichnungen O2NGt1, O2NGt3, ... beziehen sich auf die auf dieser Bande aufgetragenen Proteine (siehe 3.2.2.3., Seite 37).

Man kann deutlich erkennen, dass die Intensität der Banden bei der zweiten Testung (nach einem zusätzlichen Einfrier- und Auftauprozess) schwächer ausfällt und einige Banden nicht mehr detektierbar werden. Einige Proben bleiben trotz leichter Intensitätsabnahme in ihrem Endergebnis konstant, wie zum Beispiel V09-27322, V10-06312, V10-06431 und V10-06440. Proben, die von Anfang an eine niedrige Intensität aufwiesen, sind in der zweiten Testung ebenfalls auf diesem niedrigen Niveau und behalten somit das Ergebnis vom ersten Test bei.

ID	Erster Testdurchlauf							Zweiter Testdurchlauf						
	O2NGt1	O2NGt3	O2CGt1	O2CGt3	O3Gt1	O3Gt3	Ergebnis	O2NGt1	O2NGt3	O2CGt1	O2CGt3	O3Gt1	O3Gt3	Ergebnis
V09-27213					+		Fraglich, 3 Punkte					+		Fraglich, 3 Punkte
V09-27322			+++++	+++++			Positiv, 4 Punkte			++++	+++++			Positiv, 4 Punkte
V10-01718	+			+	++	++	Positiv, 9 Punkte					+	+	Fraglich, 3 Punkte
V10-03750				+			Positiv, 4 Punkte				+			Positiv, 4 Punkte
V10-04921	+		+	++			Positiv, 6 Punkte							Negativ, 0 Punkte
V10-05785	+		+++	++++		++	Positiv, 9 Punkte	+		+	+			Positiv, 6 Punkte
V10-06080	++		+	+++			Positiv, 6 Punkte	+			+			Positiv, 6 Punkte
V10-06312			+++++	+++++	+		Positiv, 7 Punkte			++	+++			Positiv, 4 Punkte
V10-06431			+++	++++	++	++	Positiv, 7 Punkte			+++	++++	++	+	Positiv, 7 Punkte
V10-06440			+++	++++			Positiv, 4 Punkte			++	++			Positiv, 4 Punkte

**Tabelle 21 Darstellung der Testergebnisse ausgewählter Serumproben des Mikrogen recomLine HEV IgG bei zwei Testdurchläufen (+ = Intensität der Bande in Prozent der Intensität der Cut-off-Bande < 100; ++ = 100-200, +++ = 200-300; ++++ = 300-500; +++++ = >500).**

#### 4.2.2.3. Darstellung der Übereinstimmung der Testergebnisse

Abbildung 36 zeigt die Übereinstimmung aller vier Testsysteme nach der Zweifachtestung (overall concordance) in insgesamt 66,5 % der Fälle. Bei 3 % der Proben wurde mit allen vier Tests ein positives Resultat und bei 63,5 % der Proben ein negatives Resultat erzielt. Somit bleiben 67 Serumproben, bei denen die Ergebnisse unterschiedlich ausfallen.

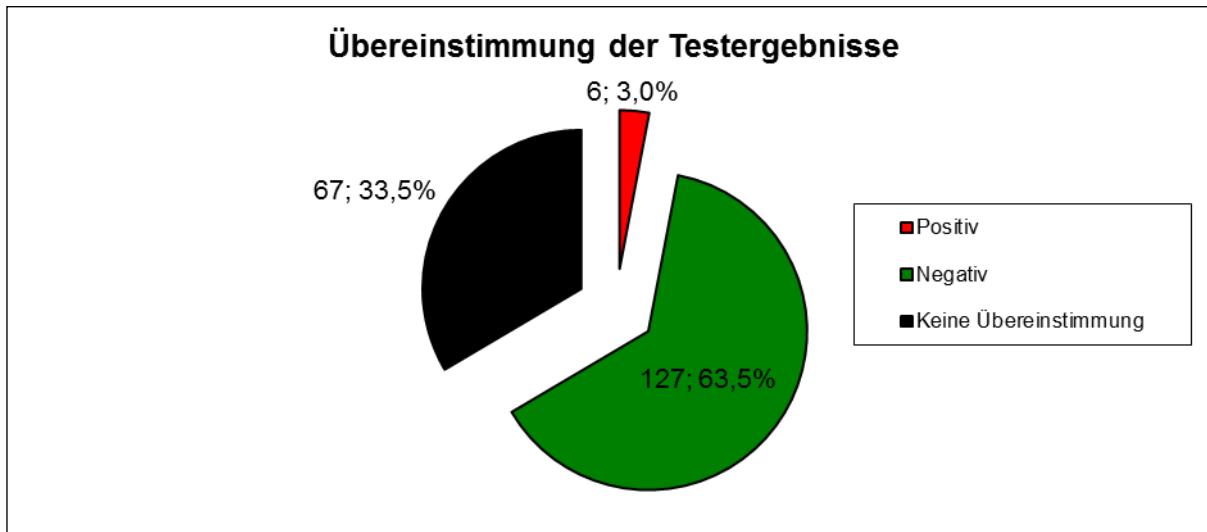
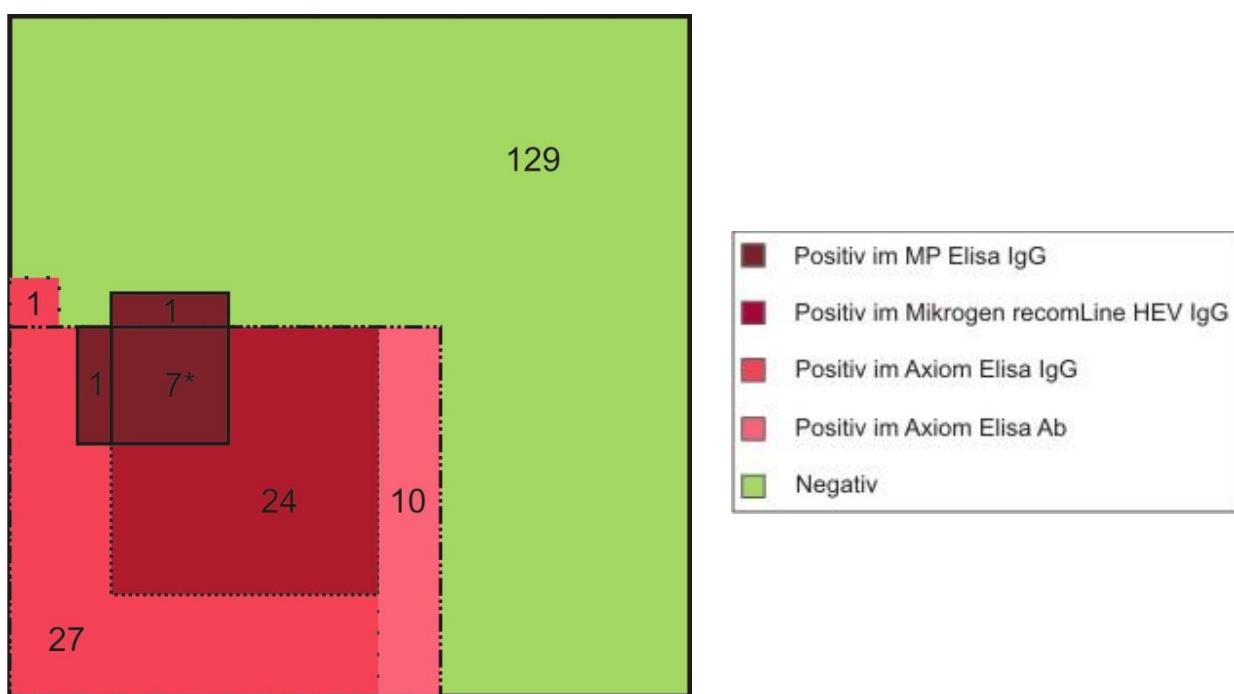


Abbildung 36 Darstellung der Übereinstimmung der Testergebnisse (MP ELISA IgG, Axiom ELISA IgG, Axiom ELISA Ab, Mikrogen recomLine HEV IgG).

In der folgenden Abbildung 37 sind die übereinstimmenden Testergebnisse als sich überlappende Flächen dargestellt. Man sieht, dass die positiven Testergebnisse des MP ELISAs eine Teilmenge der positiven Ergebnisse des Mikrogen recomLine HEV IgG darstellen. Die positiven Proben des Mikrogen recomLine HEV IgG sind eine Teilmenge der positiven Seren des Axiom ELISA IgG und diese wiederum ein Teil der Seren, die im Axiom ELISA Ab positiv waren. Zwei Proben, die im MP ELISA IgG positiv waren, fallen aus diesem Schema heraus. Eine erste war in keinem der drei anderen Tests positiv und die zweite fällt im zweiten Testdurchlauf des Mikrogen recomLine HEV IgG – nach fraglichem Testergebnis im ersten Test – durch ein negatives Ergebnis auf, wird jedoch von den zwei Axiomtests als positiv erkannt. Auch eine positive Probe des Axiom ELISA IgG wurde von keinem der anderen Tests positiv bewertet.



**Abbildung 37 Diagramm, welches die in mehreren Tests positiven Proben als sich überlappende Flächen darstellt. Die Tests sind nach absteigender Rotintensität zugeordnet: dunkelrot = MP ELISA IgG, rot = Mikrogen recomLine HEV IgG, hellrot = Axiom ELISA IgG, rosa = Axiom ELISA Ab. Die grüne Fläche sind Proben, die in allen Test negativ waren und zwei Proben die nur im Mikrogen recomLine HEV IgG ein fragliches Resultat erbrachten. \*Bei den sieben in allen Tests positiven Seren ergab der Mikrogen recomLine HEV IgG bei einer Probe nur ein fragliches Ergebnis (die Darstellung wurde jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit vereinfacht).**

Jedes der vier verwendeten Testsysteme detektierte Antikörper in Proben, die von keinem der anderen drei Tests erkannt wurden. Beim MP ELISA IgG und beim Axiom ELISA IgG war dies bei einer Serumprobe der Fall. Der Axiom ELISA Ab ergab bei zehn Seren als einziger Test ein positives Resultat und der Mikrogen recomLine HEV IgG wies bei drei Proben fragliche Antikörper nach.

#### 4.2.2.3.1. Übereinstimmung einzelner Tests

Abbildung 38 zeigt die übereinstimmenden Testergebnisse von jeweils zwei Testsystemen. Da der MP ELISA IgG und der Mikrogen recomLine HEV IgG wenig Seren als positiv detektierte, stimmen hier viele der negativen Ergebnisse überein. Ein gegenteiliges Bild ergibt sich bei den zwei Axiom ELISAs, welche in vielen positiven Ergebnissen übereinstimmen. Demzufolge ergibt sich die größte Menge an nicht übereinstimmenden Ergebnissen bei dem Test, der die wenigsten positiven Proben hatte, dem MP ELISA IgG, und dem Test, der die meisten positiven Ergebnisse hatte, dem Axiom ELISA Ab.

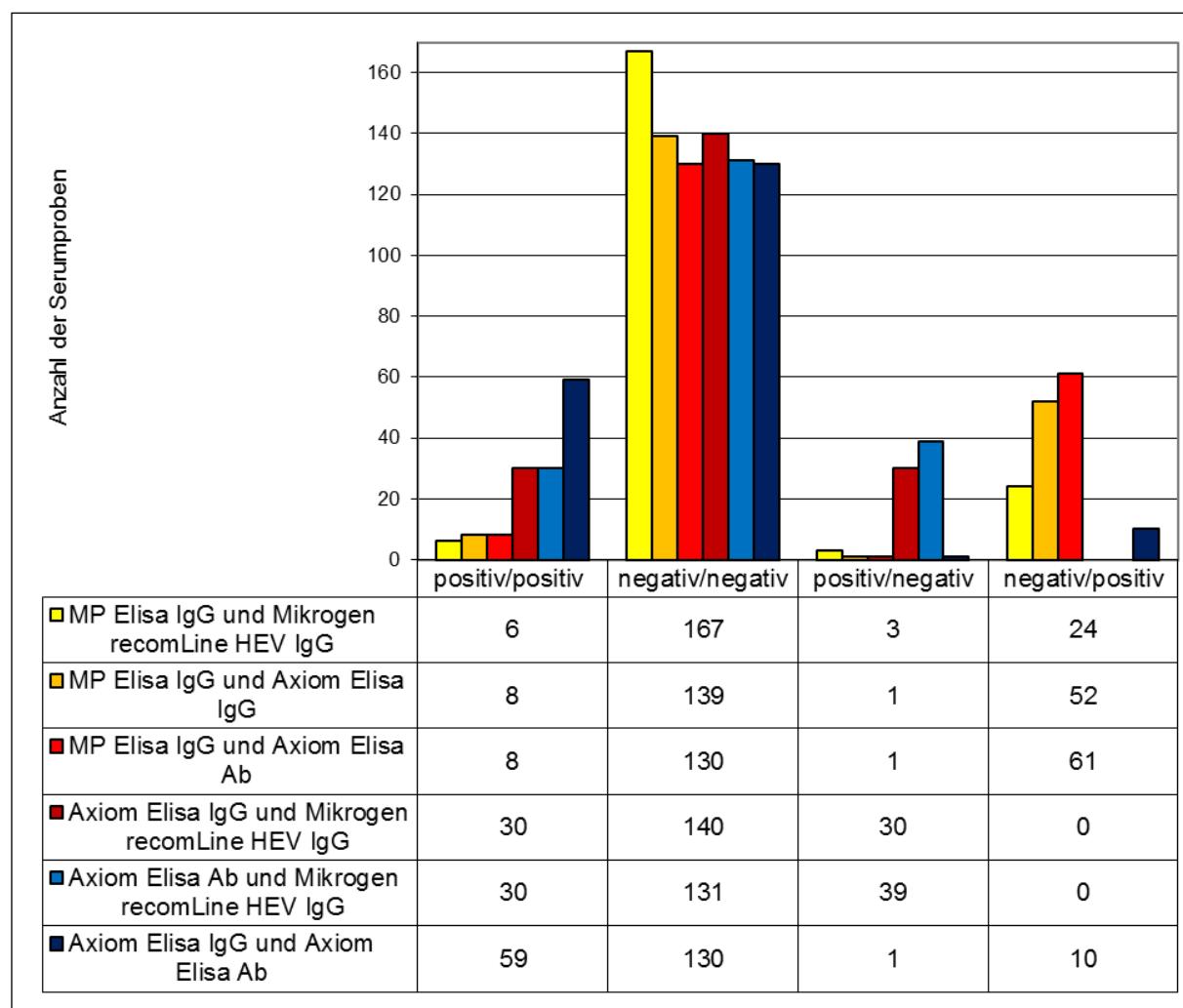


Abbildung 38 Darstellung der Übereinstimmung der Testergebnisse von jeweils zwei Testsystemen.

Berechnet man die Werte der overall concordance und der concordance among reactive (Positiv-Übereinstimmende pro Gesamtzahl reaktiver Proben aus beiden Tests) für jeweils zwei Tests bzw. für jeweils drei Tests ergibt sich ein ähnliches Bild. Man sieht in den Tabellen 22 und 23, dass bei einem Vergleich, der den MP ELISA IgG inkludiert, beide Konkordanzwerte immer vergleichsweise niedrig sind. Die höchsten Übereinstimmungen finden sich bei den zwei Axiom ELISAs und beim Vergleich dieser zwei Tests mit dem Mikrogen recomLine HEV IgG.

		Overall Concordance (%)			
		MP ELISA IgG	Axiom ELISA IgG	Axiom ELISA Ab	Mikrogen recomLine HEV IgG
Concordance among reactive (%)	MP ELISA IgG	73,5	69,0	85,5	
	Axiom ELISA IgG	13,1	94,5		84,0
	Axiom ELISA Ab	11,4	84,3		79,5
	Mikrogen recomLine HEV IgG	17,1	48,4	42,3	

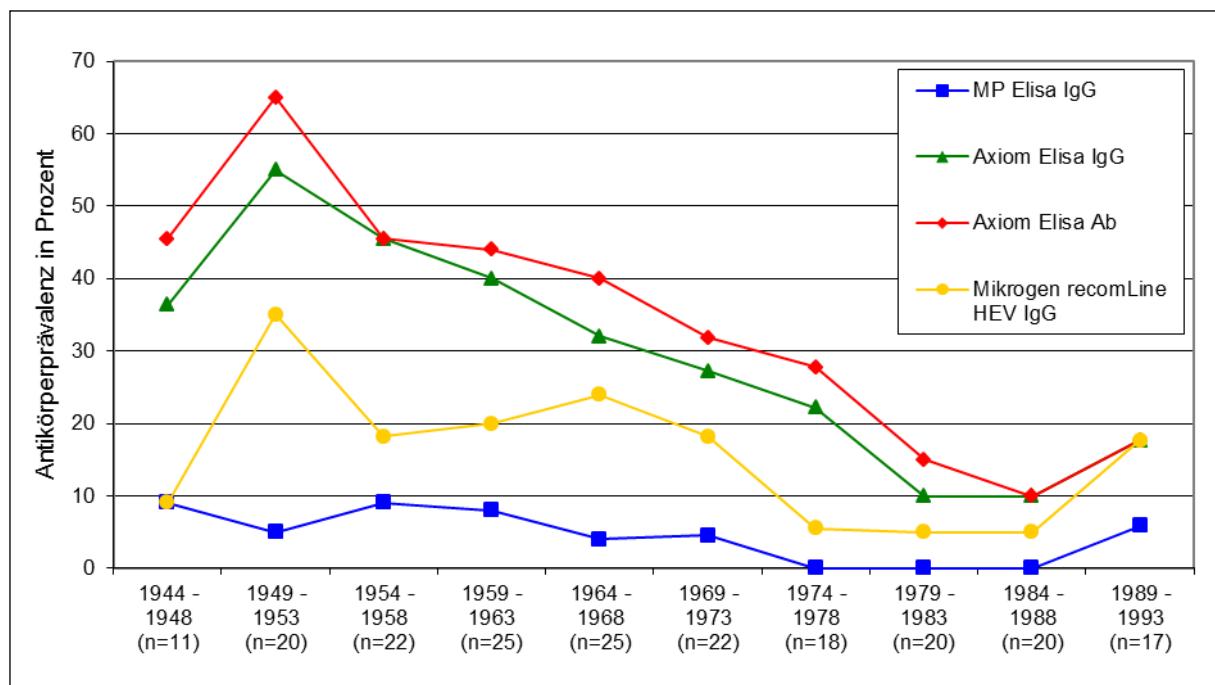
**Tabelle 22 Konkordanzwerte von jeweils zwei Testsystemen.**

	Overall Concordance (%)	Concordance among reactive (%)
MP (IgG), Axiom (IgG), Axiom (Ab)	68,5	11,3
MP ELISA IgG, Axiom (IgG), Mikrogen (IgG)	71,5	9,5
MP ELISA IgG, Axiom (Ab), Mikrogen (IgG)	67,0	8,3
Axiom (IgG), Axiom (Ab), Mikrogen (IgG)	79,0	41,7

**Tabelle 23 Konkordanzwerte von jeweils drei Testsystemen.**

#### 4.2.2.3.2. Untersuchung der Faktoren „Alter“ und „Geschlecht“

Eine weitere Übereinstimmung der Tests zeigt sich, wenn man die altersspezifischen Prävalenzwerte vergleicht. In Abbildung 39 sieht man, dass der Anteil an Seren mit Antikörernachweis bei den älteren Testpersonen wesentlich höher liegt als bei den jüngeren. Auch bei der jüngsten Testgruppe (1989–1993) liegt die Prävalenzrate höher als bei den zwischen 1979–1988 geborenen Serumspendern.



**Abbildung 39 Altersabhängige Antikörperprävalenzwerte der vier Tests. Die Geburtsjahrgänge wurden in Gruppen von 5 Jahren zusammengefasst.**

Zur Beurteilung, ob diese Beobachtung eine statistische Relevanz besitzt, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Berechnung der Odds-Ratio, des 95 %-Konfidenzintervales der Odds-Ratio und der p-Wert des Chi-Quadrat-Test aufgelistet. Die Berechnung dient zur Beurteilung, inwieweit das Geburtsjahr einen Risikofaktor für die Antikörperprävalenz darstellt. Zur Altersgruppeneinteilung wurden der Median und die Quartile des Geburtsjahrgangs der Spender berechnet. Die Gruppe der Personen, die zwischen 1944 und 1980 geboren wurden, ist in drei Gruppen aufgeteilt (geboren zwischen 1944 und 1958, zwischen 1959 und 1968 und zwischen 1969 und 1980) und wird jeweils mit der Kontrollgruppe der zwischen 1981 und 1993 geborenen Personen verglichen, da diese die niedrigste Antikörperprävalenz aufweisen.

Geburtsjahr (Ø Alter)	MP ELISA IgG				Axiom ELISA IgG				Axiom ELISA Ab				Mikrogen recomLine HEV IgG			
	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert
1981-1993 (Ø 22,3)	1 (11,1)	Ref.	Ref.	Ref.	7 (11,6)	Ref.	Ref.	Ref.	8 (11,6)	Ref.	Ref.	Ref.	5 (15,2)	Ref.	Ref.	Ref.
1969-1980 (Ø 34,7)	1 (11,1)	1,02 16,81	0,06- 16,81	0,988	10 (16,7)	1,58 4,56	0,55- 4,56	0,396	12 (17,4)	1,71 4,65	0,63- 4,65	0,291	5 (15,2)	1,02 3,79	0,28- 0,973	0,973
1959-1968 (Ø 45,5)	3 (33,3)	3,06 30,52	0,31- 30,52	0,317	18 (30)	3,38 9,05	1,26- 9,05	0,013	21 (30,4)	3,71 9,53	1,45- 9,53	0,005	11 (33,3)	2,48 7,77	0,79- 0,111	0,111
1944-1958 (Ø 56,8)	4 (44,5)	3,92 36,34	0,42- 36,34	0,198	25 (41,7)	5,36 14,06	2,04- 14,06	<0,001	28 (40,6)	5,74 14,55	2,27- 14,55	<0,001	12 (36,3)	2,58 7,95	0,84- 0,092	0,092

**Tabelle 24 Berechnung zur Beurteilung des Geburtsjahrs als Risikofaktor für das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus. Die Spender wurden anhand der Altersquartile und des Medians in vier Altersgruppen unterteilt. Es sind die Anzahl der Positiven einer Altersgruppe (N), der Prozentsatz dieser an allen Positiven, die Odds-Ratio, das 95 %-Konfidenzintervall (95 % KI) und der p-Wert des Chi-Quadrat-Tests (p-Wert) aufgeführt. (Ref.= Referenz)**

Die Odds-Ratio gibt bei Werten größer eins einen Zusammenhang zwischen den zwei untersuchten Variablen an. Je größer dieser Wert ist, umso größer ist der Zusammenhang. Verstärkt wird diese Beobachtung zusätzlich durch ein 95 %-Konfidenzintervall, das keine Werte kleiner oder gleich eins einschließt. Der p-Wert des Chi-Quadrat-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher man sich irrt, wenn man die Nullhypothese ablehnt. Die Nullhypothese besagt hier, dass kein Zusammenhang in der Grundgesamtheit zwischen den untersuchten Variablen besteht. Liegt also der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 (Signifikanzniveau) ist die Wahrscheinlichkeit sich zu irren, wenn man den Zusammenhang der Stichprobe auf die Grundgesamtheit überträgt, sehr klein.

Betrachtet man nun Tabelle 24, sieht man, dass die Odds-Ratio in den drei untersuchten Altersgruppen und in allen Tests über eins liegt und somit ein Zusammenhang zwischen einem höheren Alter und der Antikörperprävalenz besteht. Die 95 %-Konfidenzintervalle des MP ELISA IgG, des Mikrogen recomLine HEV IgG und der Altersgruppe (1969–1980) der Axiom ELISAs schließen jedoch Werte kleiner eins ein, was die These des Zusammenhangs in diesen Fällen nicht bekräftigt.

Die p-Werte der zwei älteren Gruppen der Axiom ELISAs bestätigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem höheren Alter und der Antikörperprävalenz in der Grundgesamtheit besteht.

In Tabelle 25 sind die Spender anhand des Altersmedians in zwei Gruppen aufgeteilt und nach denselben statistischen Kriterien ausgewertet worden.

Geburtsjahr (Ø Alter)	MP ELISA IgG				Axiom ELISA IgG				Axiom ELISA Ab				Mikrogen recomLine HEV IgG			
	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert
1969-1993 (Ø 28,5)	2 (22,2)	Ref.	Ref.	Ref.	17 (28,3)	Ref.	Ref.	Ref.	20 (29)	Ref.	Ref.	Ref.	10 (30,3)	Ref.	Ref.	Ref.
1944-1968 (Ø 51,3)	7 (77,8)	3,46 17,1	0,7- 17,1	0,107	43 (71,7)	3,37	1,75- 6,48	0,000 19	49 (71)	3,49	1,87- 6,53	0,000 06	23 (69,7)	2,5	1,12- 5,58	0,022

**Tabelle 25 Berechnung zur Beurteilung des Geburtsjahrs als Risikofaktor für das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus. Die Spender wurden anhand des Medians in zwei Altersgruppen unterteilt. Es sind die Anzahl der Positiven einer Altersgruppe (N), der Prozentsatz dieser an allen Positiven, die Odds-Ratio, das 95 %-Konfidenzintervall (95 % KI) und der p-Wert des Chi-Quadrat-Tests (p-Wert) aufgeführt. (Ref.= Referenz)**

Bei dieser Unterteilung sieht man, dass sowohl bei den Axiom-Tests als auch beim Mikrogen recomLine HEV IgG die Odds-Ratio und die Konfidenzintervalle einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Antikörperprävalenz besteht.

Bei allen Systemen zeigt sich bei der geschlechtspezifischen Prävalenz, dass mehr männliche Testpersonen Antikörper aufweisen als weibliche. Da die Verteilung der männlichen und weiblichen Probanden in den verschiedenen Altersgruppen relativ gleich gestaltet wurde, wurde darauf verzichtet, eine Altersstandardisierung vorzunehmen.

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse aufgeführt für die Berechnung der Odds-Ratio, des 95 %-Konfidenzintervales der Odds-Ratio und der p-Wert des Chi-Quadrat-Test bezüglich des Geschlechtunterschiedes der Antikörperprävalenz.

Geschlecht	MP ELISA IgG				Axiom ELISA IgG				Axiom ELISA Ab				Mikrogen recomLine HEV IgG			
	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert	N (%)	Odds- Ratio	95 % KI	p- Wert
weiblich	4 (44,4)	Ref.	Ref.	Ref.	26 (43,3)	Ref.	Ref.	Ref.	31 (44,9)	Ref.	Ref.	Ref.	16 (48,5)	Ref.	Ref.	Ref.
männlich	5 (55,6)	1,26	0,33- 4,85	0,733	34 (56,7)	1,47	0,8- 2,7	0,217	38 (55,1)	1,36	0,76- 2,45	0,298	17 (51,5)	1,08	0,51- 2,27	0,849

**Tabelle 26 Berechnung zur Beurteilung des männlichen Geschlechts als Risikofaktor für das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus. Es sind die Anzahl der Positiven eines Geschlechts (N) und der Prozentsatz dieser an allen Positiven in Klammern dahinter, die Odds-Ratio, das 95 %-Konfidenzintervall (95 % KI) und der p-Wert des Chi-Quadrat-Tests (p-Wert) aufgeführt. (Ref.= Referenz)**

Bei allen vier Testsystemen zeigt sich, dass männliche Personen ein leicht erhöhtes Risiko für das Vorhandensein von anti-HEV Antikörpern haben, da die Werte der Odds-Ratio über eins liegen. Das 95 %-Konfidenzintervall beinhaltet in jedem der vier Fälle auch Werte kleiner als eins, was die These des bestehenden Risikofaktors Geschlecht wieder in Frage stellt. Die Werte des Chi-Quadrat-Test liegen alle über dem gängigen Signifikanzniveau von 0,05. Da die Irrtumswahrscheinlichkeit zu hoch liegt, ist es nicht möglich von dieser Stichprobe auf die Gesamtheit zu schließen.

#### 4.2.3. Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus bei Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E

Die 30 Serumproben zur Evaluierung der verschiedenen serologischen Testsysteme wurden nach bestimmten Kriterien ausgewählt (siehe 4.2.1.2., Seite 59). Daraus ergibt sich die Annahme, dass in allen Proben Antikörper des Typ IgG vorhanden sein müssten und die Ergebnisse der Nachweisverfahren somit allesamt positiv ausfallen sollten. Unterschiedliche Anzahlen der getesteten Seren ergeben sich daraus, dass es sich um Restproben der Diagnostik handelte, von denen teilweise zu wenig Material vorhanden war, um alle Testsysteme zu verwenden.

##### 4.2.3.1. MP ELISA

Mit dem ELISA der Firma MP konnte in 25 der 30 getesteten Proben IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

Der IgM ELISA der gleichen Firma detektierte in allen der 28 getesteten Seren Antikörper, wie die folgenden Abbildungen 40 und 41 zeigen.

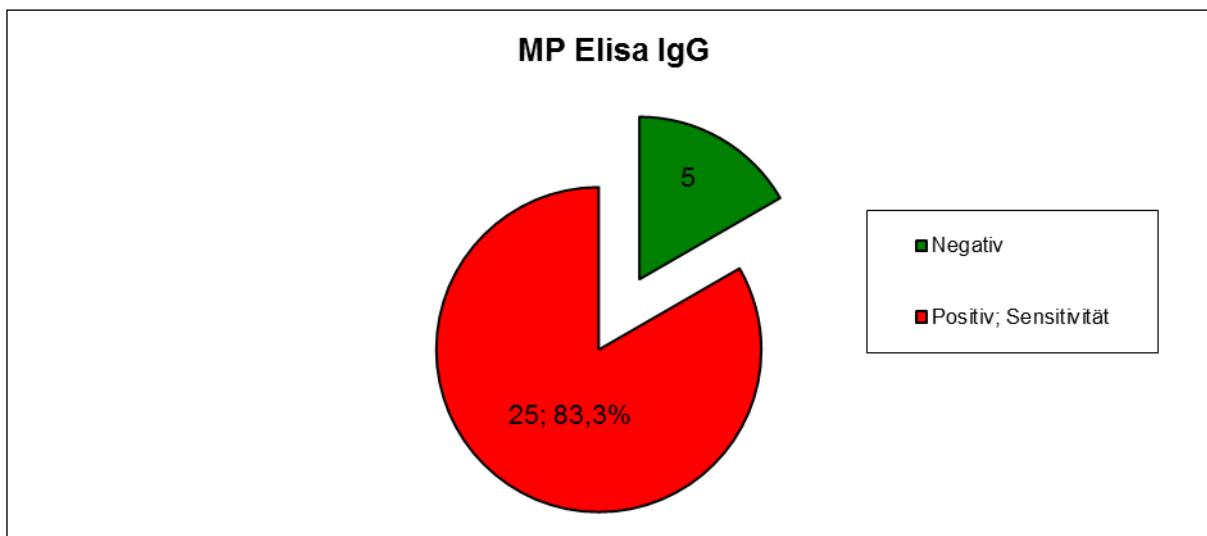
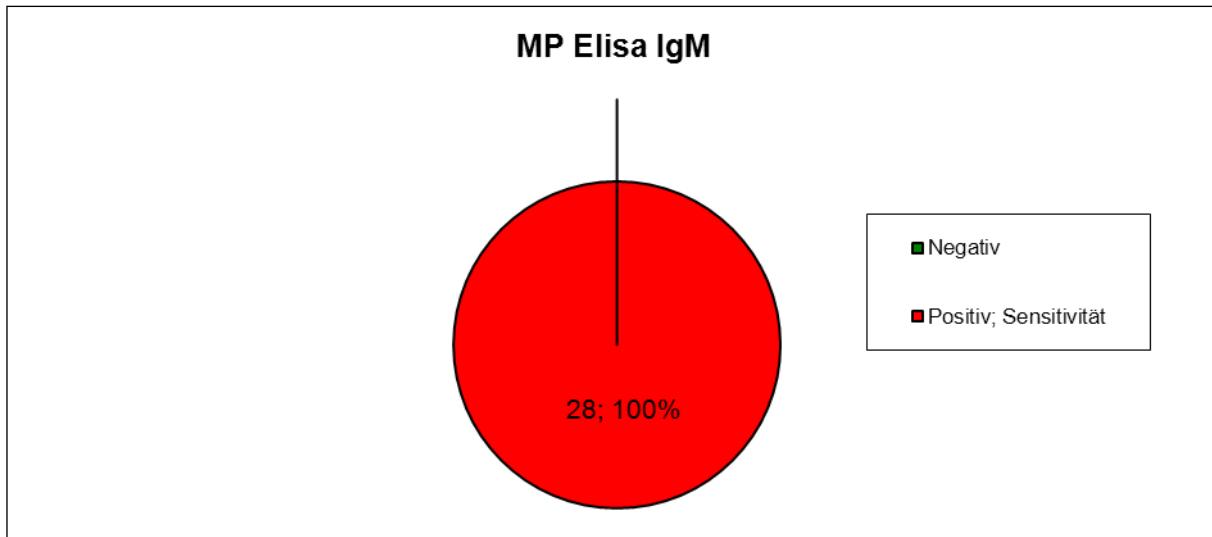


Abbildung 40 Ergebnis des MP ELISA IgG bei den Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E.



**Abbildung 41 Ergebnis des MP ELISA IgM bei den Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E.**

#### 4.2.3.2. Axiom ELISA

Bei der Testung der 30 Hepatitis-E-positiven Seren mit dem Axiom ELISA IgG zeigten sich bei allen 30 Proben vorhandene Antikörper (Abbildung 42). Dies war der einzige Test zum Nachweis von Immunglobulin G, der alle Proben als positiv erkannte.



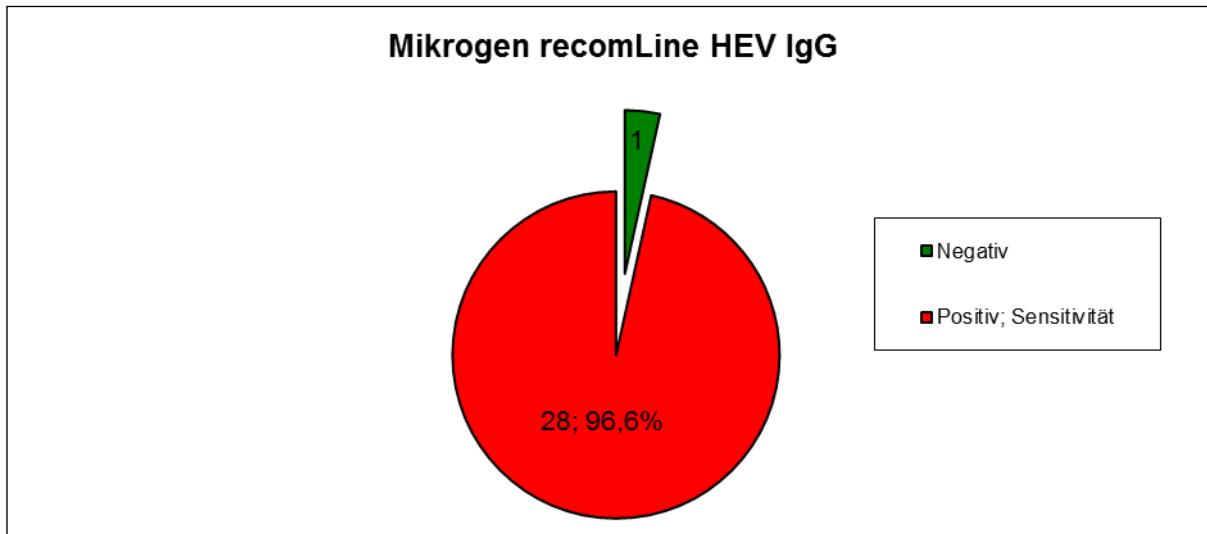
**Abbildung 42 Ergebnis des Axiom ELISA IgG bei den Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E.**

Der Axiom ELISA Ab konnte wegen zu geringer Serummengen nur bei vier der 30 Proben durchgeführt werden. Hierbei ergab sich für alle vier Proben ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 100 % entspricht. Diese ist jedoch aufgrund der relativ geringen Probenmenge nicht repräsentativ.

#### 4.2.3.3. Mikrogen recomLine HEV

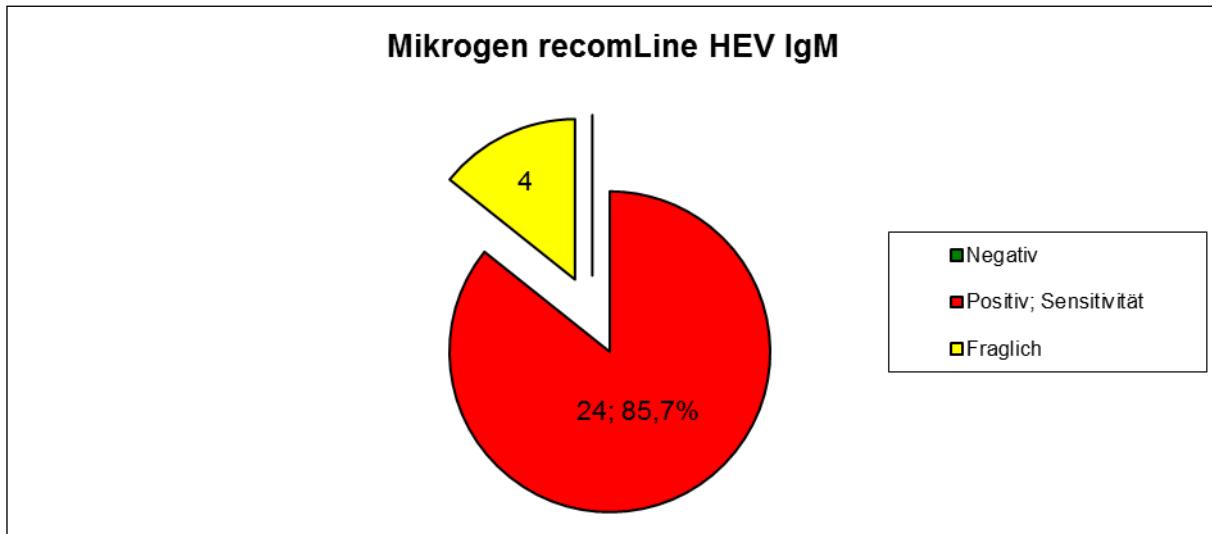
Bei der Verwendung der beiden Mikrogen recomLine HEV Tests, für IgG- und IgM-Antikörper, konnten nicht alle Proben getestet werden. Aufgrund mangelnden Ausgangsmaterials konnten mit dem IgG-Test nur 29 und mit dem IgM-Test nur 28 Proben untersucht werden.

Der Immunoblot zum Nachweis der IgG-Antikörper wies bei 28 der 29 Proben eine positive Reaktivität auf, wie folgende Abbildung 43 zeigt.



**Abbildung 43 Ergebnis des Mikrogen recomLine HEV IgG bei den Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E.**

Abbildung 44 zeigt, dass bei der Testung auf IgM-Antikörper vier der 28 Proben ein fragliches Ergebnis aufwiesen und bei den restlichen 24 Proben ein positives Ergebnis zu sehen war.



**Abbildung 44 Ergebnis des Mikrogen recomLine HEV IgM bei den Serumproben der Patienten mit nachgewiesener Hepatitis E.**

Alle vier Seren, die im IgM-Lineblot als fraglich erschienen, hatten im IgG-Lineblot ein positives Ergebnis.

Eine Probe, die im IgG-Test negativ war, hatte umgekehrt im IgM-Test klar nachweisbare Antikörper. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass dieselbe Serumprobe (ID: 11) im MP ELISA genau dasselbe Bild mit vorhandenen IgM-Antikörpern und nicht detektierbaren IgG-Antikörpern aufwies.

#### 4.2.3.4. Sensitivität der Testsysteme

Die Sensitivität der verschiedenen Testsysteme errechnet sich aus der Anzahl der richtig erkannten Positivergebnisse dividiert durch die tatsächliche Anzahl der positiven Proben. Unter der Annahme, dass in allen der 30 unter diesem Gesichtspunkt ausgewählten Serumproben eine tatsächlich noch detektierbare Menge an Antikörpern beider Klassen vorhanden ist, ergeben sich für die verschiedenen Tests unterschiedliche Sensitivitäten. Das schlechteste Resultat zeigt der MP ELISA IgG mit einer Sensitivität von 83,3 %, gefolgt vom Mikrogen recomLine HEV IgM mit 85,7 % und vom IgG-Test des gleichen Formates mit 96,6 %. Die überzeugendste Sensitivität zeigten der MP ELISA IgM und die beiden Axiom ELISAs mit jeweils 100 %, wobei das Ergebnis des Tests zum Nachweis der gesamten Antikörper aufgrund der kleinen Probenanzahl kritisch zu hinterfragen ist.

## **5. Diskussion**

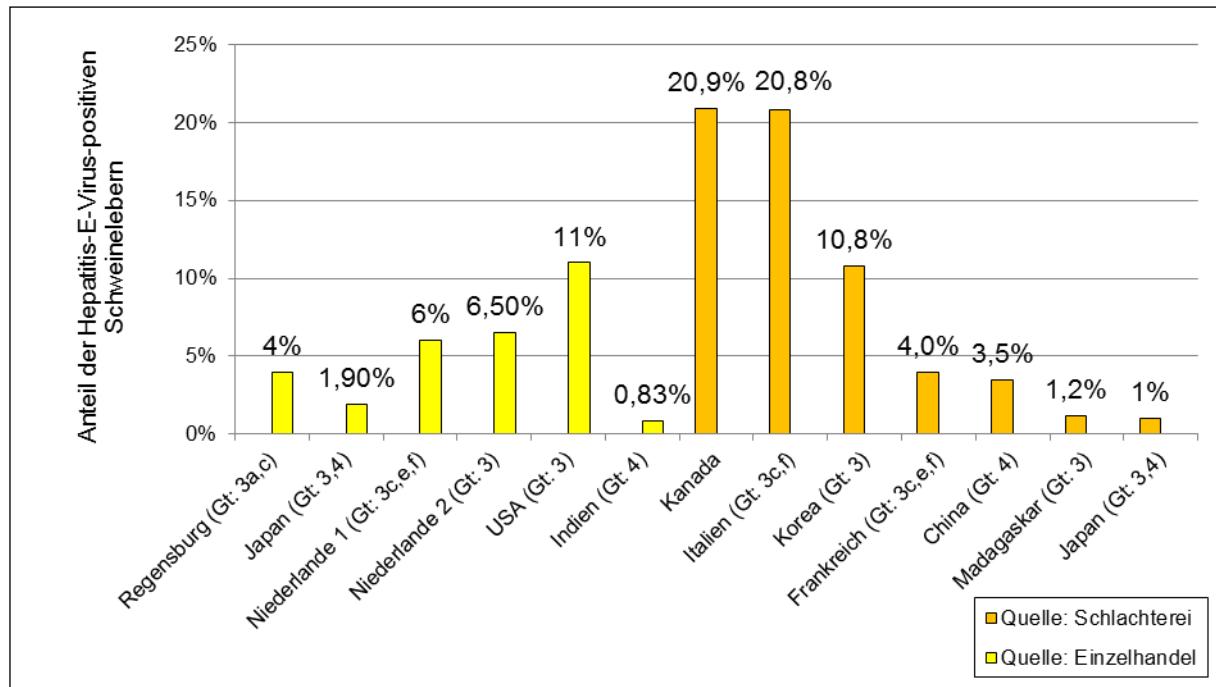
### **5.1. Nahrungsmittel als mögliche Infektionsquelle für Hepatitis E in Regensburg**

Zahlreiche Untersuchungen, darunter auch deutsche, zeigen die große genetische Ähnlichkeit zwischen HEV-Isolaten, die bei Menschen und Tieren gefunden wurden.<sup>40,57,68,75,76,91</sup> In einigen Fällen lässt sich auch der direkte Infektionsweg über Nahrungsmittel nachweisen.<sup>24,86–88</sup> In Schweinelebern, die aus Schlachterien und Schweinezuchtbetrieben gewonnen wurden, konnte man in Kanada, Italien, Korea, Frankreich und China Hepatitis-E-Viren nachweisen.<sup>105–109</sup> Forschergruppen aus den USA, den Niederlanden, aus Japan und Indien wiesen das Virusgenom in Schweinelebern beziehungsweise in Produkten aus Schweineleber nach, die im Einzelhandel erstanden wurden und für den Verzehr gedacht waren.<sup>80,91–95</sup>

Wichmann et al.<sup>34</sup> konnten in Deutschland bei 14 von 15 autochtonen Infektionsfällen Hepatitis-E-Viren des Genotyps 3 nachweisen, der oft bei Schweinen gefunden wird, und einen möglichen Zusammenhang der Infektion mit dem Konsum von unzureichend durchgegartem Innereien feststellen. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass auch in Deutschland für den Verzehr gedachte Schweineleber mit dem Hepatitis-E-Virus kontaminiert sein könnte.

Daraufhin untersuchten wir dieses Nahrungsmittel in der Umgebung von Regensburg auf Hepatitis-E-Viren. Von den 200 Lebern, die im Stadtgebiet Regensburg eingekauft wurden, stammten vier von Rindern. Bei den 196 Schweinelebern konnte in insgesamt acht Virusgenom mittels Taqman-PCR nachgewiesen werden. Bei diesen acht konnte sechsmal das Virusgenom nur in einem der zwei identischen PCR-Ansätze amplifiziert werden. Dieses Phänomen tritt regelmäßig bei Proben auf, die die nachzuweisende Nukleinsäure in sehr niedriger Konzentration nahe der Nachweisgrenze des PCR-Testsystems enthalten. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass in einer dieser sechs Proben, die im Einzelwert positiv waren, das Virusgenom in einem anderen PCR-Ansatz so vervielfältigt werden konnte, dass eine Sequenzierung durchführbar wurde.

Die folgende Abbildung 45 gibt einen Überblick über das in dieser Arbeit bestimmte Ergebnis im Vergleich zu Untersuchungsergebnissen aus anderen Ländern, wo HEV-RNA in Leberproben gefunden wurde.



**Abbildung 45 Anteil der HEV-positiven Schweinelebern aus dem Einzelhandel oder aus Schlachtereien.** Quelle sind folgende Studien: Regensburg (eigene Daten), Japan (Yazaki et al.<sup>91</sup>), Niederlande 1 (Rutjes et al.<sup>80</sup>), Niederlande 2 (Bouwknegt et al.<sup>94</sup>), USA (Feagins et al.<sup>92</sup>), Indien (Kulkarni et al.<sup>93</sup>), Kanada (Leblanc et al.<sup>105</sup>), Italien (Di Bartolo et al.<sup>106</sup>), Korea (Jung et al.<sup>107</sup>), Frankreich (Rose et al.<sup>108</sup>), China (Li et al.<sup>109</sup>), Madagaskar (Temmam et al.<sup>110</sup>), Japan (Ishida et al.<sup>111</sup>).

Die prozentualen Anteile der positiven Schweinelebern aus dem Einzelhandel liegen zwischen 0,83 % und 11 %. Das Ergebnis aus dieser Arbeit rangiert mit 4 % im Mittelfeld.

Zu klären bleibt die Frage, wann die Infektion der Lebern mit dem Virus vonstatten geht. Sind bereits die lebenden Schweine mit dem Virus infiziert und replizieren sie das Virus in der Leber oder wird das Fleisch der Tiere postmortal kontaminiert?

Der einzige Zeitpunkt für eine postmortale Kontamination der Lebern könnte sich im Schlachtprozess selbst verstecken. Eine Verunreinigung im weiteren Verarbeitungsprozess ist unwahrscheinlich, da bereits in den Schweinelebern in den Schlachtereien Virus gefunden wurde.

Allerdings scheint die am nächsten liegende Ursache für die Viruslast der Leberprodukte die Infektion der lebenden Tiere in den Mastbetrieben zu sein, denn zahlreiche Untersuchungen aus Europa und den USA zeigen, dass bereits in den Zuchtbetrieben eine erhebliche Anzahl an Schweinen mit dem Hepatitis-E-Virus infiziert ist und zwischen 25 % und 87 % der Tiere IgG-Antikörper dagegen aufweisen.<sup>47,70,73–75,106,108,112</sup>

Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse der Studien, die in Schweinemastbetrieben und Schlachthäusern Proben von Schweinen gesammelt und auf HEV-RNA untersucht haben. Das untersuchte Probenmaterial war je nach Studie unterschiedlich (z.B. Leber, Galle, Lymphknoten, Tonsillen, Plasma, Serum oder Fäkalien). Daraus resultieren auch die divergierenden Ergebnisse, da das Hepatitis-E-Virus bei erkrankten Tieren wesentlich seltener in Serum- und Plasmaproben als in Leber- und Stuhlproben gefunden werden kann.<sup>75,105</sup>

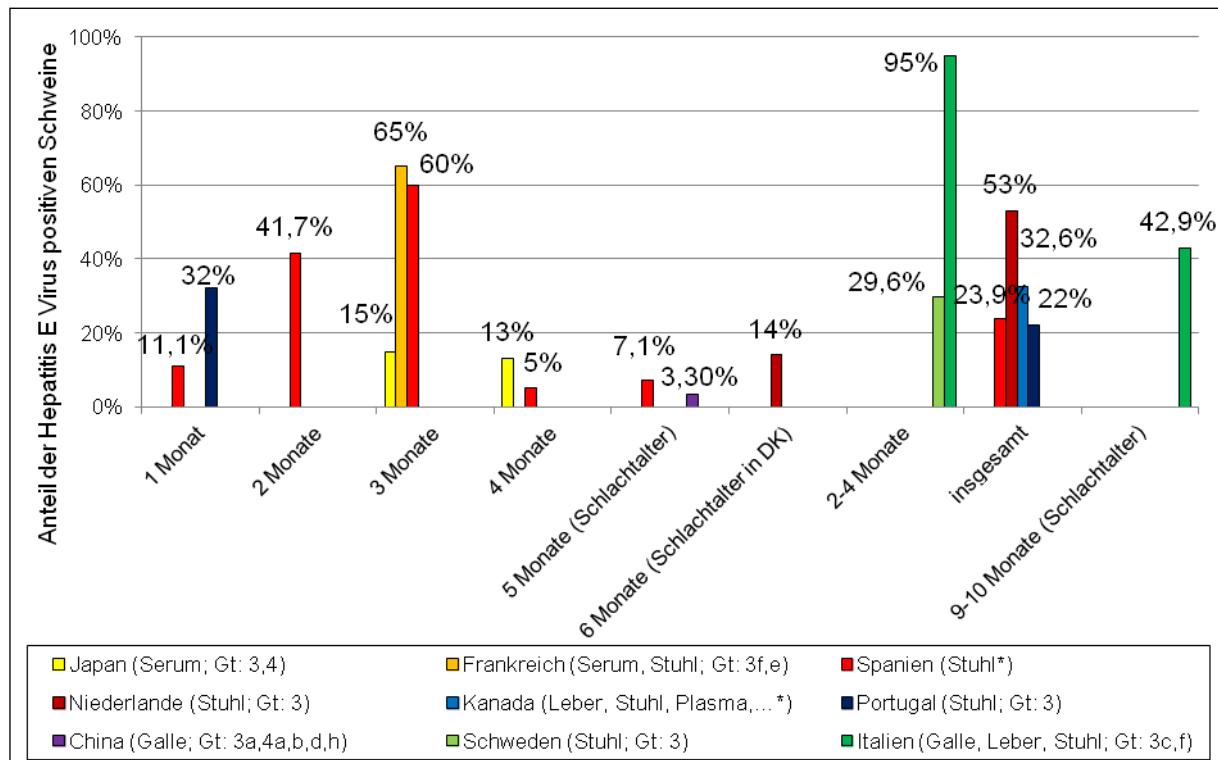
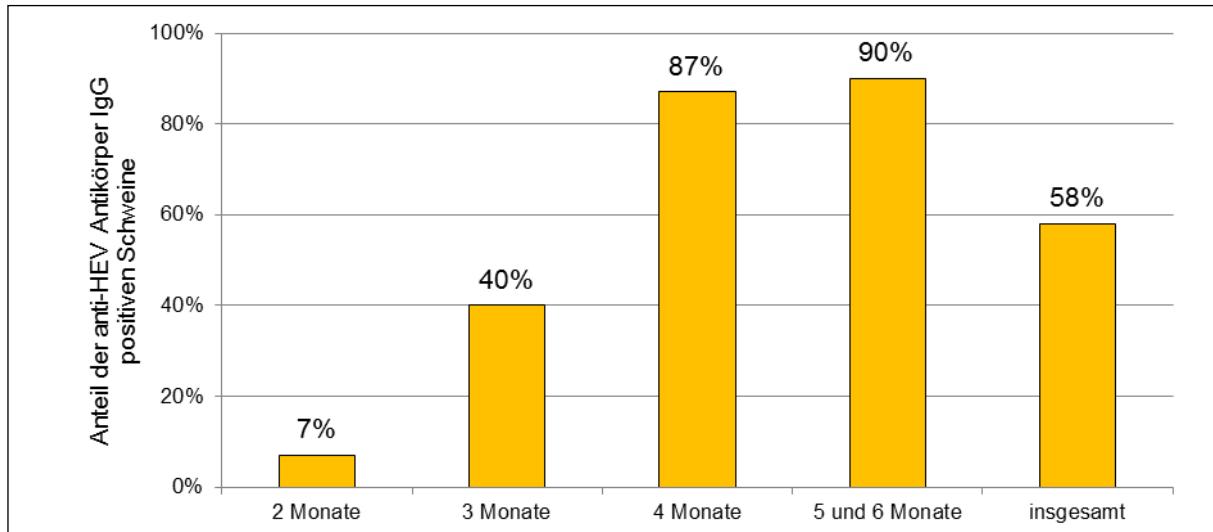


Abbildung 46 Anteil der HEV-RNA-positiven Schweine in Zuchtbetrieben und Schlachterien. Quelle sind folgende Studien: Japan (Takahashi et al.<sup>72</sup>), Frankreich (Kaba et al.<sup>75</sup>), Spanien (Fernández-Barredo et al.<sup>81</sup>), Niederlande (Rutjes et al.<sup>80</sup>), Kanada (Leblanc et al.<sup>105</sup>), Portugal (Berto et al.<sup>113</sup>), China (Lu et al.<sup>114</sup>), Schweden (Widén et al.<sup>76</sup>), Italien (Di Bartolo et al.<sup>106</sup>). \* keine Ergebnisse zum Genotyp verfügbar.

Offensichtlich haben die Tiere im Alter von 3 Monaten in allen Untersuchungen die höchste Rate an akuten Infektionen mit dem Hepatitis-E-Virus. Mit steigendem Alter geht der Anteil akut infizierter Schweine wieder zurück und erreicht bei den 6 Monate alten Tieren in Frankreich und Japan 0 % im Virusdirektnachweis (nicht in Abbildung 46 dargestellt).

Dies stimmt mit Untersuchungen überein, nach denen die meisten Tiere im Alter von 2 bis 4 Monaten das Hepatitis-E-Virus in sich tragen. Zu einem früheren Zeitpunkt befinden sich die Ferkel noch in der Phase des Nestschutzes, der durch von der Mutter übertragene Antikörper gewährleistet wird.<sup>70</sup> Die Schweine haben das Virus nach der Inkubationszeit (2–3 Wochen) zirka zwei Wochen im Blut; die fäkale Ausscheidung kann zwischen 3 und 7 Wochen anhalten. Zwei Wochen nach Beginn der Ausscheidung startet die Antikörperproduktion.

Takahashi et al.<sup>72</sup> konnte durch einen starken Anstieg der Antikörperproduktion der 4 Monate alten im Vergleich zu den 3 Monate alten Schweinen diesen Hauptinfektionszeitpunkt bestätigen – wie in Abbildung 47 ersichtlich.<sup>19,80,81,115</sup>



**Abbildung 47 Anteil der anti-HEV-IgG-Antikörper-positiven Schweine in Japan.** Quelle: Takahashi et al.<sup>72</sup>

Die Diskrepanz zwischen dem frühen Infektionszeitpunkt und dem Alter der Tiere zur Schlachtungszeit spricht für eine postmortale Kontamination der Leberprodukte in den Schlachtereien.

Betrachtet man noch einmal die Ergebnisse der Abbildung 46, sieht man, dass die Schweine, die das Schlachtalter erreicht haben (Dänemark und Spanien: 5–6 Monate alt, Italien: 9–10 Monate alt), zu 14 %, 7,1 % und 42,9 % mit dem Hepatitis-E-Virus infiziert waren. Dies bestätigt die These, dass die in die Schlachtung gelangenden Tiere – wenn auch zu einem geringeren Teil als die Jüngeren – Hepatitis-E-Viren in sich tragen und die von ihnen stammenden Leberprodukte als Überträger dienen können.

Durch eine Untersuchung von Pérez-Gracia et al.<sup>116</sup> wurde nachgewiesen, dass sich ein Mitarbeiter eines Schlachthauses (vermutlich dort) mit einem Hepatitis-E-Virus des Genotyps 3f, welcher der häufigste Virussubtyp bei Schweinen ist<sup>75</sup>, angesteckt hat. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Schweineviren in Schlachthäusern für Menschen infektiös sind.

Um die in den Leberproben gefundenen Hepatitis-E-Viren näher charakterisieren zu können, wurde eine nested PCR an die Untersuchungen angeschlossen. Bei zwei Viren konnte die Nukleinsäure vervielfältigt werden und die sich anschließende Sequenzierung zweier Teilstücke des Genoms wurde möglich. Für die Suche nach ähnlichen Sequenzen wurde zum einen die virale Genbank durchsucht, zum anderen eine eigene Referenzdatenbank durchsucht. Zahlreiche sehr ähnliche Virusisolaten wurden gefunden. Die Treffer mit der größten genetischen Verwandtschaft zeigten, dass es sich um zwei Virusstämme des Genotyps 3 handelt, die sich in die Subgenotypen 3a und 3c eingliedern lassen und die als R437 und R269 bezeichnet wurden.

Die ähnlichsten Virusstämme wurden bei verschiedenen Spezies gefunden, darunter sind Schweine, Menschen und Wildschweine. Die Virusstämme, die nahe mit dem Virusstamm R437 verwandt sind, stammen aus den verschiedensten Ländern, wie Japan, USA, Niederlande, Serbien, Großbritannien und Deutschland. Der Subgenotyp 3a zirkuliert überall auf der Welt sowohl bei Tieren als auch bei Menschen. Für den Virusstamm R269 ergibt sich ein differenzierteres Bild. Die größte Ähnlichkeit besteht zu diversen Virusisolaten, die von Menschen aus ganz Deutschland und von Schweinen aus den Niederlanden stammen. Dort zirkulieren Virusstämme, die, obwohl das Genom des Hepatitis-E-Virus einer ständigen Veränderung unterliegt, sich bis auf wenige Basen gleichen. Es scheint, als würde es hier immer wieder zu einer Infektion zwischen den Spezies kommen, denn sonst hätten sich bei einmaliger Infektion zwischen den Spezies die Virusstämme – genetisch gesehen – voneinander entfernt.

Der Virusstamm V10-07999, der auch in Regensburg isoliert wurde, weist sehr große Ähnlichkeit zum Virusstamm R269 auf. Dieses Virus stammt von einem 56-jährigen männlichen Patienten, der sich 2010 infiziert und die Symptomatik von allgemeiner Leistungsminderung geboten hat.

Auch Forschergruppen in Japan und Frankreich fanden bei erkrankten Personen Virusgenom, das eine sehr große genetische Ähnlichkeit zu Viren aus Leberprodukten aufwies. Diese Schweineleber – beziehungsweise diese Schweineleberprodukte – wurden von den betroffenen Personen einige Zeit vor der Infektion roh verspeist. Bei diesen Virusstämmen unterschieden sich die Viren der Infizierten von später aus entsprechenden Nahrungsmitteln isolierten Viren nur in wenigen Nukleotidbasen und die Ähnlichkeit betrug 98,5–100 % in Japan und 99,4 % in Frankreich.<sup>91,95</sup>

All diese Ergebnisse erhärten den Verdacht einer möglichen Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus durch den Konsum von Schweineleber auch im Raum Regensburg. Unbestätigt bleibt in unserer Untersuchung die Infektiosität der gefundenen Viruspartikel, die von uns nicht überprüft wurde. Feagins et al.<sup>92</sup> konnten zeigen, dass infizierte Schweineleberprodukte aus Supermärkten in den USA im Tierversuch noch infektiös waren. Auch nach Erhitzung der Leber konnte das Virus noch mehrere Schweine infizieren, jedoch wurde hier das Homogenat immer intravenös appliziert. Man kann also davon ausgehen, dass die Viren in den Schweinelebern bei nicht ausreichender Gartemperatur (ausreichend wären 70° C für 5 Minuten) Menschen infizieren können. Wie groß die Menge an oral mit der Nahrung aufgenommenen Virionen sein muss, um eine Ansteckung zu gewährleisten, muss noch geklärt werden. Hierbei spielen individuelle Faktoren eine große Rolle, da Colson et al.<sup>95</sup> herausfand, dass Familienmitglieder von Patienten, die sich an einer rohen Schweineleberwurst angesteckt hatten, nicht infiziert wurden, obwohl sie von derselben Wurst gegessen hatten. Diese Beobachtung deckt sich mit der des Konsiliarlabors für Hepatitis E, wonach auch in Deutschland bei wahrscheinlich alimentär erworbenen Hepatitis-E-Infektionen meist nur eine Person infiziert wird, obwohl mehrere Personen (z.B. in einer Familie) von den verdächtigen Lebensmitteln gegessen haben.

Die geringe Anzahl an von uns gefundenen infizierten Lebern wirft die Frage auf, ob die große Zahl an Antikörper-positiven Menschen in Deutschland nur durch Infektionen aufgrund von Schweineleberkonsum hervorgerufen werden können. Da die Zahl der Personen, die regelmäßig Leber essen, in der jüngeren Vergangenheit immer mehr abzunehmen scheint, könnte diese Infektionsquelle vor allem in älteren Generationen eine wichtige Infektionsquelle dargestellt haben.

Weitere Untersuchungen sollten sich damit beschäftigen, ob abgesehen von Leberprodukten auch vom Muskelfleisch dieser Tiere eine Ansteckungsgefahr für den Menschen ausgeht, denn der Anteil an der Bevölkerung, der Schweinfleisch anstatt Innereien konsumiert, ist wesentlich größer. Bei experimentell exponierten Schweinen war zu einem großen Teil HEV-RNA auch im Muskelfleisch vorhanden<sup>115</sup>; bei natürlich Infizierten konnte dies nicht bestätigt werden<sup>105</sup>.

Zu klären bleibt auch, ob von anderen Lebensmitteln eine Ansteckungsgefahr ausgehen kann. Tei et al.<sup>86</sup> konnten Hepatitis-E-Viren (Genotyp 3) in einer Konzentration von  $10^5$  Kopien pro g im Fleisch eines Hirsches nachweisen, wodurch ein Mensch infiziert wurde. Auch bei freilebenden Wildschweinen wurde in Deutschland, Schweden und den

Niederlanden bei 4 % bis 68,2 % HEV-RNA entdeckt.<sup>68,69,76,80</sup> In Moldawien zeigte sich ein höheres Risiko für Personen, die regelmäßig nicht pasteurisierte Milch trinken.<sup>83</sup> Ergebnisse anderer Studien ermöglichen diverse Theorien zu anderen denkbaren Übertragungswegen wie durch Abwässer aus Schweinemastbetrieben verunreinigte Flüsse und Meerwasser oder durch Gülle kontaminierte Ernteerträge.<sup>21,73,80,81,111</sup>

## 5.2. Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus in Regensburg

Bei der Testung von 200 Serumproben, der Bevölkerung in der Umgebung Regensburgs, wurden abhängig vom Testsystem sehr unterschiedliche Prävalenzraten an Antikörpern vorgefunden, welche von 4,5 % bis 34,5 % reichen. Betrachtet man die Übereinstimmung der vier Testsysteme und wertet nur die positiven Ergebnisse, die in allen vier Tests übereinstimmen, liegt der Anteil an Antikörper-positiven Personen bei 3 %. IgM-Antikörper konnten bei den untersuchten IgG-Antikörper-positiven Seren nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 48 gibt einen Überblick über die in den letzten Jahren ermittelten Raten an Antikörper-positiven Individuen in der Allgemeinbevölkerung diverser Länder.

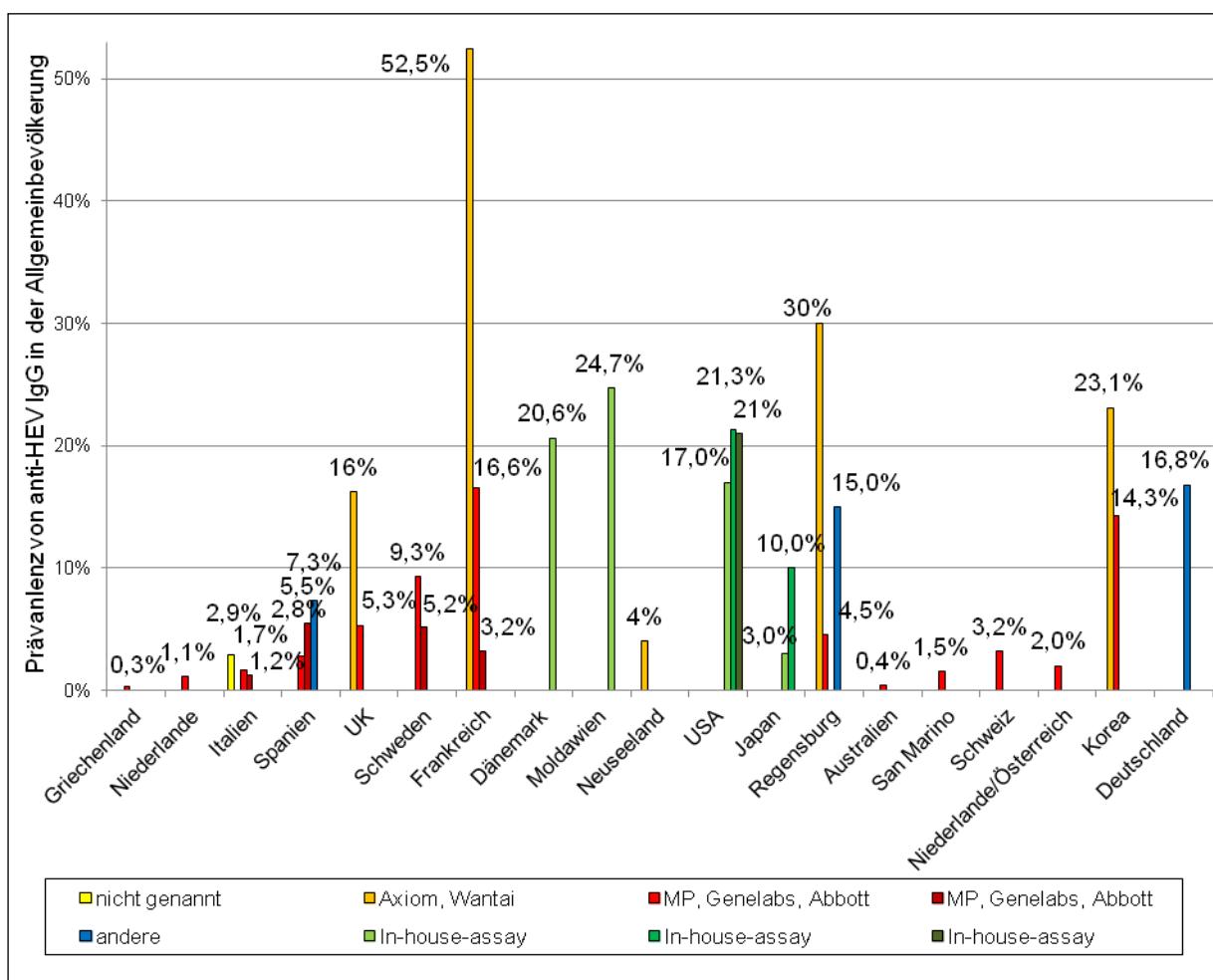


Abbildung 48 Prävalenz von anti-HEV IgG-Antikörper in der Allgemeinbevölkerung, untersucht mit Nachweisystemen verschiedener Hersteller. Quellen: Griechenland (Stefanidis et al.<sup>117</sup>), Niederlande (Zaaijer et al.<sup>118</sup>), Italien (Vulcano et al.<sup>119</sup>, Pavia et al.<sup>120</sup>, Zanetti und Dawson et al.<sup>121</sup>), Spanien (Mateos et al.<sup>122</sup>, Buti et al.<sup>123</sup>, Buti et al.<sup>124</sup>), UK (Bendall et al.<sup>102</sup>, Bernal et al.<sup>125</sup>), Schweden (Olsen et al.<sup>126</sup>, Sylvan et al.<sup>127</sup>), Frankreich (Mansuy et al.<sup>128,129</sup>, Boutrouille et al.<sup>130</sup>), Dänemark (Christensen et al.<sup>131</sup>), Moldawien (Drobeniuc et al.<sup>83</sup>), Neuseeland (Dalton et al.<sup>132</sup>), USA (Meng et al.<sup>84</sup>, Thomas et al.<sup>133</sup>, Kuniholm et al.<sup>89</sup>), Japan (Ding et al.<sup>134</sup>, Tanaka et al.<sup>135</sup>), Regensburg (eigene Daten), Australien (Moaven et al.<sup>136</sup>), San Marino (Rapicetta et al.<sup>137</sup>), Schweiz (Lavanchy et al.<sup>138</sup>), Niederlande und Österreich (Bouwknegt et al.<sup>139</sup>), Korea (Park et al.<sup>140</sup>) Deutschland (Faber et al.<sup>141</sup>).

In europäischen Ländern liegen die Raten zwischen 0,26 % und 52,7 %, aus Ägypten werden Raten von über 60 %<sup>142</sup> (nicht in Abbildung 48 dargestellt) berichtet. Die höheren Ergebnisse in Dänemark, Moldawien und den USA, die über 20 % liegen, wurden alle mit In-house-assays der Forschergruppen erhoben. Dies bestätigt einen nicht zu unterschätzenden Einfluss der Testsysteme auf die Prävalenzraten. Nach unseren Erkenntnissen handelt es sich bei den ELISAs von MP, Genelabs und Abbott um das gleiche oder ein ähnliches Nachweissystem, genauso wie bei den beiden ELISAs von Wantai und Axiom.

Die Ergebnisse, die mit den ELISAs der Firma Axiom generiert wurden, sind überraschend hoch, zieht man die wenigen bestätigten Hepatitis-E-Erkrankungsfälle in Deutschland in Betracht. Mit 387 Fällen, die 2012 gemeldet wurden, kann man diesen hohen Anteil an Personen, die Antikörper aufweisen nicht erklären.<sup>147</sup> Die Tatsache, dass die Anzahl der gemeldeten Fälle aber kontinuierlich steigt, gibt Anlass anzunehmen, dass durch bessere Aufklärung und bessere diagnostische Maßnahmen mehr dieser Infektionen erkannt werden.<sup>65</sup> Trotzdem ist anzunehmen, dass eine beträchtliche Anzahl an akuterischen Hepatitis-E-Infektionen unerkannt bleibt und so die große Masse an Personen mit anti-HEV Antikörpern zustande kommt.<sup>24,25,141</sup>

Die Doppeltestung der positiven Seren ergab bis auf wenige Ausnahmen konkordante Werte, obwohl die Absorptionswerte der Proben teilweise voneinander abwichen. So wurden nur wenige der Antikörper-positiven Seren in der zweiten Testung negativ (MP ELISA IgG: 1 Probe von 10, Axiom ELISA IgG: 1 von 61, Axiom ELISA Ab: 1 von 71, Mikrogen recomLine HEV IgG: 5 von 36). Dieser Prozess kann auf den zusätzlichen Auftau- und Einfriervorgang<sup>143</sup> zurückzuführen sein. Beim Mikrogen recomLine HEV zeigten sich Proben, die nur knapp über dem Cut-off-Wert lagen, in der zweiten Untersuchung weiterhin positiv. Daraus kann man schließen, dass durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren nicht alle Ergebnisse verändert werden können.

Die tatsächliche IgG-Antikörperprävalenz der Regensburger Bevölkerung wird zwischen den detektierten 4,5 % und 30 % liegen. Vermutlich wird der MP ELISA IgG die tatsächliche Prävalenz wegen einer hohen Rate an falsch-negativen Ergebnissen unterschätzen.

Bei unseren Probanden fanden wir bei allen vier Tests mehr Antikörperträger männlichen Geschlechts, was mit den Ergebnissen aus Untersuchungen von Buti et al.<sup>124</sup>, Tanaka et al.<sup>135</sup> und Park et al.<sup>140</sup> übereinstimmt. Durch die statistische Analyse mittels der Odds-Ratio ließen sich jedoch von unseren Daten keine Rückschlüsse auf ein generell höheres Risiko für Männer, anti-HEV Antikörper zu haben, ziehen, wie auch Juhl et al.<sup>59</sup> bestätigte. Auch Faber

et al.<sup>141</sup> fand keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Antikörperprävalenz. Jedoch zeigte Wichmann et al.<sup>34</sup>, dass die deutliche Mehrheit der autochtonen Hepatitis-E-Infektionen bei Männern vorkommt.

Ein Ansteigen der Antikörperrate<sup>59,124,135,140,141</sup> mit dem Alter wird in den erhobenen Daten deutlich. Hier lieferten die statistischen Berechnungen verwertbare Ergebnisse. So haben bei Untersuchungen mit dem Axiom ELISA die Geburtenjahrgänge von 1944–1958 und auch 1959–1968 im Vergleich zu den zwischen 1981 und 1993 Geborenen ein höheres Risiko Antikörper zu haben. Genauso verhält sich das Ergebnis, vergleicht man die Geburtenjahrgänge von 1944–1968 mit denen von 1969–1993. Diese Abhängigkeit vom Alter der betreffenden Personen ist nicht überraschend, da ältere Personen ein höheres kumulatives Risiko haben sich über die Jahre infiziert zu haben. Denkbar wäre aber auch ein Infektionsweg über eine Verhaltensweise, die bei der jüngeren Generation seltener geworden ist. War zum Beispiel vor ein paar Jahren der Absatzmarkt von Schweineleber noch erfolgversprechend, wird dieses Produkt heute fast nicht mehr gekauft, wie einige Metzger berichtet haben. Wäre die Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus in der älteren Generation zu großen Teilen durch den Schweineleberkonsum verursacht worden, läge die Anzahl der Antikörper-positiven Personen in Zukunft niedriger. Um dies zu bekräftigen, wären identische Studien zu späteren Zeitpunkten notwendig. Tanaka et al.<sup>135</sup> konnte in Japan diese Entwicklung widerlegen, da die Altersverteilung der Prävalenzraten über einen Zeitraum von 20 Jahren keine Veränderungen durchmachte. Daraus ergibt sich, dass Vergleiche der Antikörperprävalenz verschiedener Länder nur bei Testpopulationen des gleichen Alters Sinn ergeben, wie auch Bendall et al.<sup>102</sup> bestätigt.

Grundsätzlich entspricht die Verteilung der Antikörper-positiven Regensburger nach dem Alter Beobachtungen<sup>17</sup>, nach denen das Hepatitis-E-Virus nicht die typische Durchseuchung in der Bevölkerung aufweist wie andere enteral übertragbare Viren mit an 100 % Prozent grenzender Antikörperprävalenz im jungen Erwachsenenalter. Deshalb sind Übertragungswege, die große Anteile der Bevölkerung gleichzeitig infizieren unwahrscheinlich. Die Durchseuchung entsteht eher durch Prozesse, die immer wieder einzelne Personen oder kleinere Gruppen anstecken. Anti-HEV Antikörper aufzuweisen waren in Studien unter anderem mit Haustierkontakt, Pferdekontakt, Jagen und kleineren chirurgischen Eingriffen assoziiert.<sup>89,124,129,131</sup>

### 5.3. Beurteilung der verschiedenen Testsysteme

Es gibt zahlreiche Testsysteme, die zur Detektion von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus geeignet sind. Jedoch weisen viele sehr unterschiedliche Ergebnisse auf, wenn sie bei identischen Proben angewandt werden. Die Sensitivität variiert stark und die Spezifität in manchen Studiendesigns wurde an einer Stichprobe der „gesunden“ Allgemeinbevölkerung untersucht, die laut Studienkonzept keine Antikörper aufweisen.<sup>17,48,143–145</sup>

Die vier derzeit in Deutschland erhältlichen Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus werden in dieser Arbeit evaluiert.

Die niedrigste Rate an positiven Ergebnissen bei den Proben aus der Bevölkerung detektiert der MP ELISA IgG mit 4,5 %, gefolgt vom Mikrogen recomLine HEV IgG mit 15 %, dem Axiom ELISA IgG mit 30 % und dem Axiom ELISA Ab mit 34,5 %. Der Axiom ELISA Ab detektiert alle Immunglobulinklassen und liegt dadurch vermutlich am höchsten.

Die Tendenz, dass die ELISAs vom Typ MP niedrigere Positivitätsraten ermitteln als die vom Typ Axiom, wie es unsere Daten zeigen, wird durch die Resultate von Studien aus Großbritannien und Frankreich (siehe Abbildung 48, Seite 96) bestätigt.

Der Hauptanteil der positiven Proben des MP ELISAs wurde auch von den anderen Tests als positiv erkannt. Ebenso entsprechen die Positiven des Mikrogen recomLine HEV IgG einer Teilmenge der Positiven des Axiom ELISAs IgG und diese wiederum einer Teilmenge der positiven Ergebnisse des Axiom ELISAs Ab (siehe Abbildung 37, Seite 78).

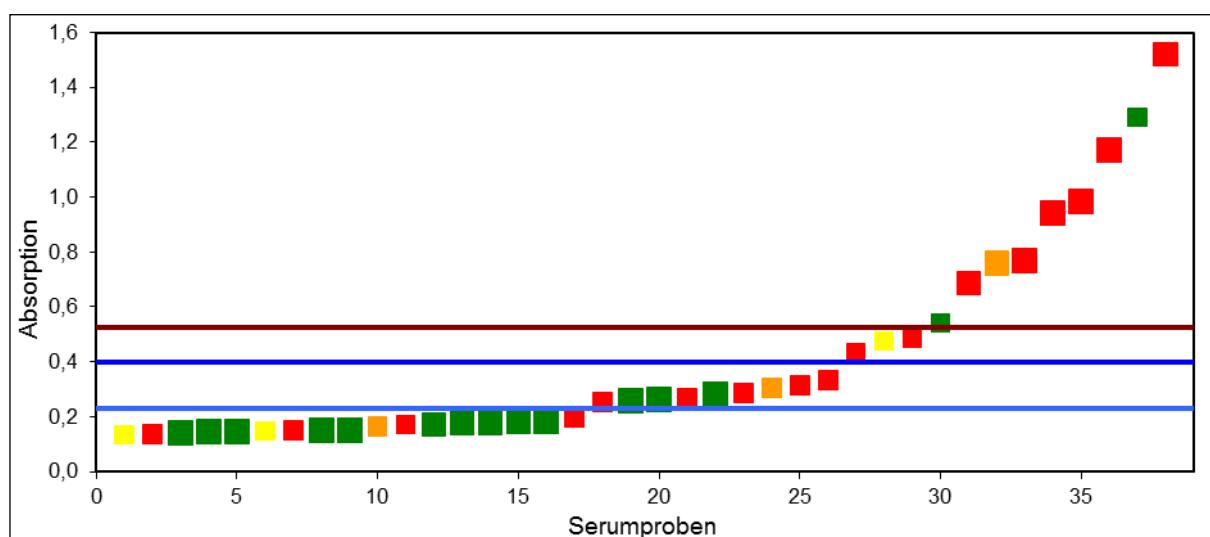
Dies deutet darauf hin, dass die verschiedenen Tests unterschiedliche analytische Sensitivität aufweisen. Keiner der drei Hersteller dieser Testsysteme benutzt die identischen Antigene, um Antikörper zu binden. Laut Mushahwar et al.<sup>30</sup> zeigen derzeit Testsysteme, die die ORF2-Region des Virus verwenden, bessere Ergebnisse als Testsysteme, die mit einer Mischung von ORF2 und ORF3 arbeiten.

Alle bisher bekannten Genotypen des Hepatitis-E-Virus entsprechen einem Serotyp, deshalb sollten die serologischen Tests auch Antikörper gegen jeden beliebigen Virustyp detektieren können.<sup>144</sup> Bewiesen ist dies nicht, unsere Testung der Akutseren ergab bei keinem der Tests klare Unterschiede bezüglich der Genotypenspezifität. Die Tatsache, dass die Tests jeweils Teilmengen der Positiven der anderen Tests erkennen, wäre durch Unterschiede in der Detektionsfähigkeit verschiedener Genotypen jedoch erklärbar.

Diese Ergebniskonstellation würde auch auftreten, wäre die Antikörpermenge, die für einen positiven Nachweis notwendig ist, beim MP ELISA IgG höher als beim Mikrogen recomLine HEV IgG und beim Axiom ELISA. Bendall et al.<sup>102</sup> zeigten, dass bei einem Vergleich anhand eines verdünnten Referenzserums der ELISA von Genelabs (entspricht dem Test von MP)

zehnmal höhere Antikörperspiegel zur Detektion braucht als der ELISA von Wantai (in Deutschland unter dem Namen Axiom vertrieben). Sie fanden auch heraus, dass der ELISA von Wantai sensitiver bei der Erkennung weiter zurückliegender Infektionen ist und somit besser zur Untersuchung der Seroprävalenz in der Bevölkerung geeignet ist.

Aufgrund dieser Erkenntnis den Cut-off-Wert des MP ELISAs nach unten zu korrigieren würde nur bedingt eine Verbesserung ergeben, da, wie in Abbildung 49 erkennbar, unter den 12 dem Cut-off am nächsten gelegenen Proben drei in allen anderen Tests negativ sind und unter den 29 nächstgelegenen 13.



**Abbildung 49** Darstellung von 38 Proben mit den höchsten Absorptionswerte im MP ELISA IgG. Die größeren Markierungen bezeichnen die richtig-negativen und richtig-positiven Ergebnisse, legt man den Cut-off-Wert des Herstellers (braune Linie) zu Grunde (rot= positives Ergebnis in den drei übrigen Tests, orange= positives Ergebnis in zwei anderen Tests, gelb= positives Ergebnis in einem anderen Test, grün= negatives Ergebnis in den übrigen Tests). Die blauen Linien stellen alternative Cut-off-Werte bei 0,4 und 0,23 dar.

Die zwei alternativen Cut-off-Werte bei 0,23 und 0,4 wurden aufgrund des Kurvenverlaufs bei den ansonsten kontinuierlich ansteigenden Absorptionswerten gewählt. Einen noch niedrigeren Wert als Grenze einzuführen wäre nicht sinnvoll, da, verglichen mit den Ergebnissen der übrigen Tests, sonst zu viele falsch-positive Resultate entstehen würden.

Der Unterschied des MP ELISAs zum Axiom ELISA beruht folglich nicht nur auf der geringeren Detektionsfähigkeit von niedrigeren Antikörperspiegeln. Eine Veränderung des Cut-off-Werts brächte keine Vorteile.

Beim Mikrogen Test ergibt sich eine bessere Überlappung der Testergebnisse durch Veränderung der Positivitätsgrenze auch nur teilweise. Würde man die Grenze auf 3 Punkte senken, würden die drei fraglichen Ergebnisse positiv, wovon zwei in allen ELISAs negativ

waren. Eine dieser zwei in den anderen Tests Negativen, V10-01109, würde aber auch durch eine Verschiebung des Cut-offs im MP ELISA auf 0,4 profitieren.

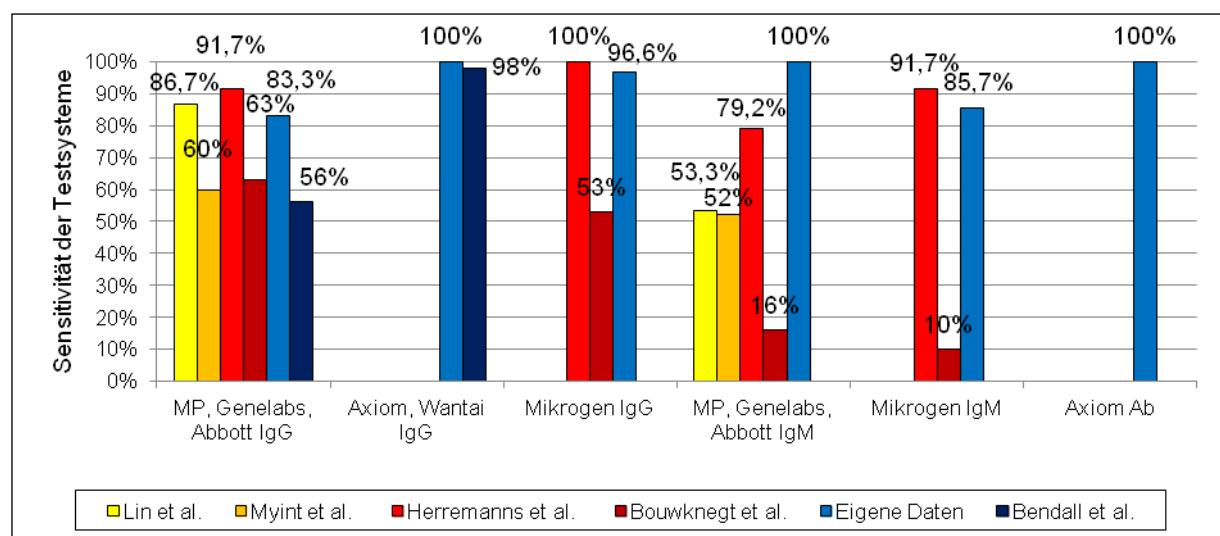
Eine weitere Senkung, damit die Proben mit 2 Punkten im Mikrogen Test auch noch positiv werden, wäre sinnlos, da nur eine dieser Proben (V10-04435) überhaupt in einem der anderen Tests ein positives Ergebnis erbrachte. Daraus lässt sich am ehesten schließen, dass diese Seren richtig-negativ beurteilt wurden.

Die Ergebnisse zweier Serumproben folgen nicht dem beobachteten Bild der Teilmengen an Positiven der anderen Tests. Eine Probe war nur im Axiom IgG (Probe A) und die andere nur im MP IgG (Probe B) positiv. Durch eine Veränderung des Cut-off-Wertes, so dass Probe B in den beiden Axiom ELISAs positiv würde, würde zu zahlreichen positiven Ergebnissen führen, die jeweils wieder nur in einem Test positiv wären. Ebenso verhielte es sich bei einer Veränderung der Grenzen zugunsten Probe A. Diese zwei Ausreißer zeigen, dass die Unterschiede in den Testergebnissen nicht alleine auf die oben beschriebenen Diskrepanzen bei der Detektion verschiedener Genotypen, unterschiedlich hoher Antikörperspiegel oder die Verwendung anderer Antigene im Testsystem zurückzuführen sind.

Aufgrund des Mangels von Serumproben, die nachgewiesenermaßen keine Antikörper enthalten, war es nicht möglich, die Spezifitäten der Testsysteme zu untersuchen. Diese Richtig-Negativ-Rate gibt den Anteil der richtig negativ erkannten Proben an der Gesamtheit der tatsächlich negativen Proben an.

Die Beurteilung der Sensitivität ist möglich, da mit Hilfe der HEV-PCR Virusmaterial in einer Serum- oder Stuhlprobe detektiert werden kann. Das derart ermittelte Kollektiv an Patienten hat also eine akute HEV-Infektion durchgemacht. Hier bleibt zu bedenken, dass die Proben dieser Patienten theoretisch zu einem Zeitpunkt entnommen werden hätten können, zu dem die Antikörperproduktion noch nicht in Gang gekommen ist oder die Menge an Antikörpern zu gering ist, um nachgewiesen werden zu können (z.B. bei immunsupprimierten Patienten).

In Abbildung 50 sind die Sensitivitäten aus den Studien aufgelistet, in denen die gleichen Testsysteme untersucht wurden wie in dieser Arbeit.



**Abbildung 50 Sensitivität der Testsysteme ermittelt in verschiedenen Studien. Quelle:** Lin et al.<sup>143</sup>, Myint et al.<sup>144</sup>, Herremanns et al.<sup>48</sup>, Bouwknegt et al.<sup>139</sup>, eigene Daten, Bendall et al.<sup>102</sup>.

Offensichtlich liefern die Axiom-Tests die besten Ergebnisse, direkt gefolgt von den Mikrogen-Blots. Die Sensitivität der MP ELISAs liegt in mehreren Studien, wie auch bei unserer, weit unter dem Niveau der anderen Tests. In der Studie von Bouwknegt et al. war bei den zwei getesteten Systemen zur Detektion von IgM-Antikörpern die Sensitivität verglichen mit den anderen Studien sehr schlecht.

Eine unserer Proben war sowohl im MP ELISA IgG als auch im Mikrogen recomLine HEV IgG negativ, jedoch in den IgM Tests der zwei Firmen positiv. Es wäre möglich, dass die IgG-Antikörperproduktion des Probanden erst verspätet einsetzt und zum Zeitpunkt der Probenentnahme erst auf einem niedrigen Niveau ist, welches nur vom Axiom-Test erfasst wird. Denn die Absorption im Axiom ELISA IgG liegt bei dieser Probe im Vergleich zu den anderen nahe am Cut-off. Die HEV-RNA-Last dieser Probe sinkt schon wieder und ist nahe der Nachweisgrenze, was zeigt, dass die Infektion schon länger besteht. Die negativen IgG-Testergebnisse können auch an Antikörpern mit zu niedriger Avidität liegen, denn laut Herremanns et al.<sup>48</sup> sind Genotyp-3-Infektionen, worum es sich bei dieser Probe handelt, weniger immunogen als Genotyp-1-Infektionen. Die anderen Genotyp-3-Infektionen zeigen dieses Bild bei unserer Untersuchung jedoch nicht. Es besteht bei keinem der Tests ein Unterschied bei der Reaktivität der verschiedenen Genotypen.

Bei den vier Proben, die im Mikrogen recomLine HEV IgM fraglich bewertet wurden, könnte der IgM-Titer nach einer schon zurückliegenden Infektion wieder zurückgehen. Jedoch weist

nur eine dieser vier Proben eine schon wieder sinkende Konzentration an HEV-RNA auf. Zusätzlich waren diese vier Proben im MP ELISA IgM positiv. Laut Schlauder et al.<sup>146</sup> sind IgM-Antikörper spezifisch nur für den einen Stamm gegen den sie gebildet wurden. Wenn der Test Antigene eines anderen Stammes zur Detektion verwendet, dann werden sie nicht sicher erkannt.

Insgesamt liegt die Sensitivität der Axiom ELISAs und der Mikrogen recomLine Tests auf einem guten Niveau für den diagnostischen Einsatz zum Nachweis akuter Infektionen.

## **6. Zusammenfassung**

Die Hepatitis E (HEV) ist eine Viruserkrankung mit nahezu weltweiter Verbreitung. Neben Gebieten mit endemischem Vorkommen gibt es auch in Europa zahlreiche Infektionen. Die Bedeutung der Hepatitis-E-Erkrankung hat sich in den letzten Jahren verändert. In Deutschland ging man zunächst von einer Reiseerkrankung aus. Jüngere Untersuchungen zeigten eine neue Rolle des Hepatitis-E-Virus als heimische Infektion bei Tieren mit Infektionsrisiko auch für Menschen. Das Virus wurde vor allem, neben einigen anderen Tierarten, bei Schweinen nachgewiesen. In den USA gelang es Forschern, das Virus aus Schweineleber, für den menschlichen Verzehr bestimmt, zu isolieren und dessen Infektiosität zu bestätigen. Aufgrund dieser Tatsache stellte sich die Frage, welcher Anteil der Bevölkerung Antikörper gegen das Virus aufweist. Die Antikörperprävalenzen lagen höher, als bisher vermutet wurde, und unterschieden sich sehr stark, je nach verwendetem serologischen Nachweisystem.

In dieser Arbeit wurde zwei Fragen nachgegangen:

Zum einen wurde untersucht, ob in der Stadt Regensburg gekaufte Schweinelebern aus dem Einzelhandel mit Hepatitis-E-Viren infiziert sind und diese somit ein Ansteckungsrisiko für die Bevölkerung darstellen können.

4 % der Leberproben enthielten Virusmaterial. Bei 1 % der Proben wurden durch Analyse der RNA-Sequenz die Viren als Subgenotypen 3a und 3c identifiziert. Die Basensequenz eines der Virusisolaten stimmte zu 99,2 % mit einem Virus überein, welches bei einem 2010 erkrankten Patienten aus Regensburg nachgewiesen wurde. Dies spricht für die Theorie, dass aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft der Viren ein epidemiologischer Zusammenhang hinsichtlich des Übertragungsweges bestehen könnte. Infizierte Schweinelebern könnten in Regensburg als Vektor für diesen Übertragungsweg fungieren, da sie mit Hepatitis-E-Viren belastet sind.

Zum anderen wurde der Anteil an HEV-Antikörperträgern (Antikörperprävalenz) in einer Stichprobe der Bevölkerung aus dem Großraum Regensburg mit vier derzeit erhältlichen serologischen Testsystemen erhoben. Zur Beurteilung der Testsysteme wurden Seren von Personen, bei denen eine Hepatitis-E-Erkrankung in der Vorgeschichte bestätigt worden war, mit den gleichen Testsystemen untersucht und somit deren Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) ermittelt.

Die Antikörperprävalenz der Bevölkerungsstichprobe betrug je nach Testsystem zwischen 4,5 % und 34,5 %. Die Sensitivitäten lagen zwischen 83,3 % und 100 %. Der Test mit der höchsten Sensitivität ermittelte auch die höchste Antikörperprävalenz und umgekehrt. Insgesamt lieferten die Tests der Firmen Mikrogen und Axiom hinsichtlich der diagnostischen Testcharakteristika zum Nachweis akuter Infektionen zufriedenstellende Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse zur Prävalenzuntersuchung sehr von den verwendeten Testsystemen abhängen und nur verglichen werden können, wenn sie mit dem gleichen Test generiert wurden.

Die durchgeföhrten Untersuchungen zeigten zum einen, dass Schlachtschweine in Regensburg zu einem gewissen Teil mit Hepatitis-E-Viren infiziert sind und deren Lebern, die in Regensburg im Einzelhandel verkauft werden, als Infektionsvektor für eine Übertragung auf den Menschen in Frage kommen. Zum anderen zeigten die Untersuchungen zur Antikörperprävalenz, dass diese in der Bevölkerung mit bis zu 34,5 % um ein Vielfaches höher liegt, als die wenigen bisher gemeldeten Hepatitis-E-Fälle vermuten ließen. Die meisten Hepatitis-E-Virus Infektionen dürften demnach bei immungesunden Patienten klinisch symptomarm verlaufen.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980;2:876–9. eng.
2. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818–24. eng.
3. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23–31. eng.
4. Reyes GR, Yarbough PO, Tam AW, et al. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol. Jpn* 1991;26 Suppl 3:142–7. eng.
5. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120–31. eng.
6. Kwo PY, Schlauder GG, Carpenter HA, et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin. Proc* 1997;72:1133–6. eng.
7. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007;127:216–28. eng.
8. Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, et al. Genus Hepevirus. In: Fauquet CM, ed. *Virus taxonomy, 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2nd. Oxford: Academic, 2004:853–7. ISBN: 0122499514.
9. Mayo MA. Changes to virus taxonomy 2004. *Arch Virol* 2005;150:189–98.
10. Irshad M. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology* 1999;42:252–62. eng.
11. Emerson SU, Nguyen H, Torian U, Purcell RH. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol* 2006;80:10457–64. eng.
12. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J. Biosci* 2008;33:451–64. eng.
13. Hepatitis-E-Virus. *Bundesgesundheitsbl* 2008;51:90–7.

- 
14. Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001;65:282–92. eng.
  15. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;16:5–36. eng.
  16. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 1999;57:356–60. eng.
  17. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol* 2008;48:494–503. eng.
  18. Pavio N, Meng X, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res* 2010;41:46. eng.
  19. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol* 2010;140:256–65. eng.
  20. Payne CJ, Ellis TM, Plant SL, Gregory AR, Wilcox GE. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol* 1999;68:119–25. eng.
  21. Meng X. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res*. 2011;161:23–30. eng.
  22. Kamar N, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus infection. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2013;29:271–8. eng.
  23. Nicand E, Grandadam M, Teyssou R, Rey JL, Buisson Y. Viraemia and faecal shedding of HEV in symptom-free carriers. *Lancet* 2001;357:68–9. eng.
  24. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 2008;8:698–709. eng.
  25. Krawczynski K. Hepatitis E. In: Bircher J, Benhamou J, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. 2nd ed. /. Oxford ;, New York: Oxford University Press, 1999:922–6. ISBN: 0192630393.
  26. Arankalle VA, Chadha MS, Mehendale SM, Banerjee K. Outbreak of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis among schoolchildren. *Lancet* 1988;2:1199–200. eng.
  27. Aggarwal R. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2011;26 Suppl 1:72–82. eng.

- 
28. Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2004;19:778–84. eng.
29. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934–40. eng.
30. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol* 2008;80:646–58. eng.
31. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J. Food Prot* 2001;64:572–86. eng.
32. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008;358:811–7. eng.
33. Péron JM, Bureau C, Poirson H, et al. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J. Viral Hepat* 2007;14:298–303. eng.
34. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, et al. Phylogenetic and Case-Control Study on Hepatitis E Virus Infection in Germany. *J Infect Dis* 2008;198:1732–41.
35. Brost S, Wenzel JJ, Ganter TM, et al. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E virus infection in Southwest Germany. *J Clin Virol* 2010;47:89–92. eng.
36. Veitt R, Reichardt M, Wenzel J, Jilg W. [Autochthonous hepatitis E-virus infection as cause of acute hepatitis in Germany - a case report], Autochthonous Hepatitis-E-Virus-Infektion als Ursache der akuten Hepatitis in Deutschland - eine Kasuistik. *Z Gastroenterol* 2011;49:42–6. ger.
37. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, et al. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995;172:927–33. eng.
38. Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993;341:149–50. eng.
39. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moeckli R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* 1993;341:1355. eng.
40. Norder H, Sundqvist L, Magnusson L, et al. Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill* 2009;14. eng.

- 
41. Chadha MS, Walimbe AM, Arankalle VA. Retrospective serological analysis of hepatitis E patients: a long-term follow-up study. *J. Viral Hepat* 1999;6:457–61. eng.
42. Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008;14:547–53. eng.
43. Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med* 1999;1999:1–16. eng.
44. Malcolm P, Dalton H, Hussaini HS, Mathew J. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology* 2007;51:190–4. eng.
45. Peron J, Danjoux M, Kamar N, et al. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch* 2007;450:405–10. eng.
46. MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD. MacSween's pathology of the liver, [includes CD-ROM]. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone, 2007. 973 p. ISBN: 9780443100123. eng.
47. Baechlein C, Schielke A, Johne R, Ulrich RG, Baumgaertner W, Grummer B. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet. Microbiol* 2010;144:187–91. eng.
48. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin. Vaccine Immunol* 2007;14:562–8. eng.
49. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol. Infect* 2010;138:145–66. eng.
50. Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment. Pharmacol. Ther* 2007;26:1429–35. eng.
51. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2010;16:74–82. eng.
52. Haagsma EB, Niesters HGM, van den Berg AP, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2009;15:1225–8. eng.
53. Kamar N, Mansuy J, Cointault O, et al. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am. J. Transplant* 2008;8:1744–8. eng.

- 
54. Kamili S. Toward the development of a hepatitis E vaccine. *Virus research* 2011;161:93–100. eng.
55. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet* 2012;379:2477–88. eng.
56. Teshale EH, Grytdal SP, Howard C, et al. Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin. Infect. Dis* 2010;50:1006–10. eng.
57. Fogeda M, Avellón A, Cilla CG, Echevarría JM. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J. Med. Virol* 2009;81:1743–9. eng.
58. Preiss JC, Plenz A, Engelmann E, et al. Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection* 2006;34:173–5. eng.
59. Juhl D, Baylis SA, Blümel J, Görg S, Hennig H. Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Transfusion* 2014;54:49–56. eng.
60. Clayson ET, Shrestha MP, Vaughn DW, et al. Rates of hepatitis E virus infection and disease among adolescents and adults in Kathmandu, Nepal. *J. Infect. Dis* 1997;176:763–6. eng.
61. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, et al. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J. Infect. Dis* 1995;171:447–50. eng.
62. Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, Micco P de, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerging Infect. Dis* 2007;13:648–9. eng.
63. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* 2006;16:79–83. eng.
64. Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, Thomas L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 2001;100:9–15. eng.
65. Stark K, Koch J, Jilg W, Wichmann O. Hepatitis E - Epidemiologie und Risikofaktoren in Deutschland. *Hepatitis&more* 2010;(1):23–5.
66. Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 3/2014. Berlin, 2013.

- 
67. Wilhelm BJ, Rajić A, Greig J, et al. A systematic review/meta-analysis of primary research investigating swine, pork or pork products as a source of zoonotic hepatitis E virus. *Epidemiol. Infect.* 2011;139:1127–44. eng.
68. Schielke A, Sachs K, Lierz M, Appel B, Jansen A, Johne R. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol. J* 2009;6:58. eng.
69. Adlhoc C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet. Microbiol* 2009;139:270–8. eng.
70. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997;94:9860–5. eng.
71. Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 2000;33:842–5. eng.
72. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J. Gen. Virol* 2003;84:851–62. eng.
73. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000;33:826–33. eng.
74. Withers MR, Correa MT, Morrow M, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2002;66:384–8. eng.
75. Kaba M, Davoust B, Marié J, et al. Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *J. Med. Virol* 2009;81:1750–9. eng.
76. Widén F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol. Infect* 2011;139:361–71. eng.
77. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J. Virol* 1998;72:9714–21. eng.
78. Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol* 1990;32:58–9. eng.

- 79.** Caron M, Enouf V, Than SC, Dellamonica L, Buisson Y, Nicand E. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol* 2006;44:3440–2. eng.
- 80.** Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, et al. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerging Infect. Dis* 2009;15:381–7. eng.
- 81.** Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Vega S, Gómez MT, Pérez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest* 2006;18:462–5. eng.
- 82.** Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknegt M, Roda Husman AM de. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 2007;143:112–6. eng.
- 83.** Drobniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184:1594–7. eng.
- 84.** Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol* 2002;40:117–22. eng.
- 85.** Bouwknegt M, Frankena K, Rutjes SA, et al. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet. Res* 2008;39:40. eng.
- 86.** Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371–3. eng.
- 87.** Li T, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infect. Dis* 2005;11:1958–60. eng.
- 88.** Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004;330:501–5. eng.
- 89.** Kuniholm MH, Purcell RH, McQuillan GM, Engle RE, Wasley A, Nelson KE. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J. Infect. Dis* 2009;200:48–56. eng.

90. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis* 2003;188:944. eng.
91. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol* 2003;84:2351–7. eng.
92. Feagins AR, Opiressnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng X. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol* 2007;88:912–7. eng.
93. Kulkarni MA, Arankalle VA. The detection and characterization of hepatitis E virus in pig livers from retail markets of India. *J. Med. Virol* 2008;80:1387–90. eng.
94. Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WHM, Rutjes SA, Roda Husman AM de. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J. Food Prot* 2007;70:2889–95. eng.
95. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, et al. Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *J Infect Dis* 2010;202:825–34.
96. Feagins AR, Opiressnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol* 2008;123:32–7. eng.
97. Müller H. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Das Methodenbuch. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl., 2001. XII, 134 S. ISBN: 3-8274-1058-4.
98. Wenzel JJ, Walch H, Bollwein M, et al. Library of prefabricated locked nucleic acid hydrolysis probes facilitates rapid development of reverse-transcription quantitative real-time PCR assays for detection of novel influenza A/H1N1/09 virus. *Clin. Chem* 2009;55:2218–22. eng.
99. Wenzel JJ, Preiß J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *Journal of clinical virology* 2011;52:50–4. eng.
100. Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J. Clin. Virol* 2008;42:58–64. eng.

- 
- 101.** Schill WB, Mathes MV. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environ. Sci. Technol* 2008;42:5229–34. eng.
- 102.** Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol* 2010;82:799–805. eng.
- 103.** Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999;57:243–51. eng.
- 104.** 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, 2010. (Accessed May 8, 2011, at <http://www.destatis.de/bevoelkerungspyramide/>).
- 105.** Leblanc D, Poitras E, Gagné M, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int. J. Food Microbiol* 2010;139:206–9. eng.
- 106.** Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* 2011;149:330–8. eng.
- 107.** Jung K, Kang B, Song DS, Chae C. Prevalence and genotyping of hepatitis E virus in swine population in Korea between 1995 and 2004: a retrospective study. *Vet. J* 2007;173:683–7. eng.
- 108.** Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, et al. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011;34:419–27. eng.
- 109.** Li W, She R, Wei H, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet. Microbiol* 2009;133:75–83. eng.
- 110.** Temmam S, Besnard L, Andriamananjara SF, et al. High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;88:329–38. eng.
- 111.** Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, et al. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.* 2012;157:2363–8. eng.

- 
- 112.** Wacheck S, Werres C, Mohn U, et al. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012;9:655–60. eng.
- 113.** Berto A, Mesquita JR, Hakze-van der Honing R, Nascimento MSJ, van der Poel WHM. Detection and characterization of hepatitis E virus in domestic pigs of different ages in Portugal. *Zoonoses Public Health* 2012;59:477–81. eng.
- 114.** Lu YH, Qian HZ, Hu AQ, Qin X, Jiang QW, Zheng YJ. Seasonal pattern of hepatitis E virus prevalence in swine in two different geographical areas of China. *Epidemiol. Infect.* 2013;141:2403–9. eng.
- 115.** Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CBEM, et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res* 2009;5:7. eng.
- 116.** Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, et al. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2007;77:893–6. eng.
- 117.** Stefanidis I, Zervou EK, Rizos C, et al. Hepatitis E virus antibodies in hemodialysis patients: an epidemiological survey in central Greece. *Int J Artif Organs* 2004;27:842–7. eng.
- 118.** Zaaijer HL, Kok M, Lelie PN, Timmerman RJ, Chau K, van der Pal HJ. Hepatitis E in The Netherlands: imported and endemic. *Lancet* 1993;341:826. eng.
- 119.** Vulcano A, Angelucci M, Candelori E, et al. HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann Ig* 2007;19:181–6. eng.
- 120.** Pavia M, Iiritano E, Veratti MA, Angelillo IF. Prevalence of hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. *Infection* 1998;26:32–5. eng.
- 121.** Zanetti AR, Dawson GJ. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J. Med. Virol* 1994;42:318–20. eng.
- 122.** Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and other risk groups. *Vox Sang* 1998;75:267–9. eng.
- 123.** Buti M, Jardí R, Cotrina M, et al. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J. Virol. Methods* 1995;55:49–54. eng.

- 124.** Buti M, Domínguez A, Plans P, et al. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin. Vaccine Immunol* 2006;13:1328–32. eng.
- 125.** Bernal W, Smith HM, Williams R. A community prevalence study of antibodies to hepatitis A and E in inner-city London. *J. Med. Virol* 1996;49:230–4. eng.
- 126.** Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* 2006;38:55–8. eng.
- 127.** Sylvan SP, Jacobson SH, Christenson B. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among hemodialysis patients in Sweden. *J. Med. Virol* 1998;54:38–43. eng.
- 128.** Mansuy J, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerging Infect. Dis* 2011;17:2309–12. eng.
- 129.** Mansuy JM, Legrand-Abravanel F, Calot JP, et al. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J. Med. Virol* 2008;80:289–93. eng.
- 130.** Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Crucière C, Pavio N. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J. Clin. Microbiol* 2007;45:2009–10. eng.
- 131.** Christensen PB, Engle RE, Hjort C, et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin. Infect. Dis* 2008;47:1026–31. eng.
- 132.** Dalton HR, Fellows HJ, Gane EJ, et al. Hepatitis E in new zealand. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2007;22:1236–40. eng.
- 133.** Thomas DL, Yarbough PO, Vlahov D, et al. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J. Clin. Microbiol* 1997;35:1244–7. eng.
- 134.** Ding X, Li TC, Hayashi S, et al. Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatol. Res* 2003;27:169–73. eng.
- 135.** Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, et al. Age-specific antibody to hepatitis E virus has remained constant during the past 20 years in Japan. *J. Viral Hepat* 2005;12:439–42. eng.
- 136.** Moaven L, van Asten M, Crofts N, Locarnini SA. Seroepidemiology of hepatitis E in selected Australian populations. *J. Med. Virol* 1995;45:326–30. eng.

- 
- 137.** Rapicetta M, Kondili LA, Pretolani S, et al. Seroprevalence and anti-HEV persistence in the general population of the Republic of San Marino. *J. Med. Virol* 1999;58:49–53. eng.
- 138.** Lavanchy D, Morel B, Frei PC. Seroprevalence of hepatitis E virus in Switzerland. *Lancet* 1994;344:747–8. eng.
- 139.** Bouwknegt M, Engel B, Herremans MMPT, et al. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect* 2008;136:567–76. eng.
- 140.** Park HK, Jeong S, Kim J, et al. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC Infect. Dis.* 2012;12:142. eng.
- 141.** Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Höhle M, Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerging Infect. Dis.* 2012;18:1654–7. eng.
- 142.** Stoszek SK, Engle RE, Abdel-Hamid M, et al. Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2006;100:89–94. eng.
- 143.** Lin CC, Wu JC, Chang TT, et al. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J. Clin. Microbiol* 2000;38:3915–8. eng.
- 144.** Myint KSA, Endy TP, Gibbons RV, et al. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J. Clin. Microbiol* 2006;44:1581–3. eng.
- 145.** Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998;27:857–61. eng.
- 146.** Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79 ( Pt 3):447–56. eng.
- 147.** Robert Koch-Institut, ed. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012. Berlin, 2013. ISBN: 978-3-89606-250-5.

## **8. Eigene Publikationen**

### **Publikationen:**

**Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates.** Jürgen J. Wenzel, Julia Preiß, Mathias Schemmerer, Barbara Huber, Annelie Plentz, Wolfgang Jilg. Journal of Clinical Virology 2011;52(1):50–54.

**Test Performance Characteristics of Anti-HEV IgG Assays Strongly Influence Hepatitis E Seroprevalence Estimates.** Jürgen J. Wenzel, Julia Preiß, Mathias Schemmerer, Barbara Huber, Wolfgang Jilg. The Journal of Infectious Diseases 2013;207(3):497–500.

### **Kongressbeiträge/Poster:**

Posterpräsentation bei der *27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber 2011 in Regensburg*: „Detection and characterization of hepatitis E virus (HEV) from pig livers sold in local butcher shops in Southeastern Germany – a possible source of infection for humans?“ Julia Preiß, Jürgen J. Wenzel, Mathias Schemmerer, Barbara Huber, Wolfgang Jilg. Abstract Nr. 1613, Zeitschrift für Gastroenterologie 2011; 49; DOI: 10.1055/s-0030-1269703.

Posterpräsentation bei der *27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber 2011 in Regensburg*: „Seroprevalence of Anti-Hepatitis E Virus (HEV) IgG in Southeastern Germany and Comparison of Three Commercial Anti-HEV IgG Tests“ Jürgen J. Wenzel, Julia Preiß, Mathias Schemmerer, Barbara Huber, Wolfgang Jilg. Abstract Nr. 1610, Zeitschrift für Gastroenterologie 2011; 49; DOI: 10.1055/s-0030-1269691.

Posterpräsentation bei der *21. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) 2011, Freiburg*: „Seroprevalence of Anti-Hepatitis E Virus (HEV) IgG in Southeastern Germany and Comparison of Three Commercial Anti-HEV IgG Tests“ Jürgen J. Wenzel, Julia Preiß, Mathias Schemmerer, Barbara Huber, Wolfgang Jilg. Abstract Nr. PZOV-384.

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Er stand mir jederzeit mit gutem Rat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Wenzel für die Überlassung des interessanten Themas, der immerwährenden Begleitung, hervorragenden Unterstützung und Aufmunterung während der letzten Jahre.

Herzlichen Dank auch an das gesamte Team der Virologie für die gute Zusammenarbeit, die stundenlangen Erklärungen, Anleitungen und Kaffeepausen. Mein besonderer Dank gilt Barbara Hottenträger, Anette Rohrhofer, Bianka Ehrlich, Barbara Heldmann, Maria Kiefl, Brigitte Kreuzpaintner, Elke Kreuzpaintner, Jasmin Klein, Katja Feierabend, und Sissi Schreder-Meindl.

Vielen Dank für die logistische und informationstechnische Unterstützung an Wolfgang Huber, Albert Krön und Angela Niebauer.

Bei meinen Mitstreitern Mathias, Ulf und Stefan möchte ich mich herzlich für die Hilfe, die Gesellschaft und die lustigen Momente bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Huber, die mir jederzeit als Kollegin und Freundin sowohl fachlich als auch emotional zur Seite stand.

Großer Dank gilt meinem Freund Fabian für seine Geduld und die vielen Worte der Motivation.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für den Rückhalt auf meinem Weg und die vielen Jahre der Unterstützung danken.