

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie
Leiter: Univ.Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf

**Etablierung einer Hepatitis-E-Virus β -Aktin Duplex RT-qPCR und Anwendung zur
Bestimmung der Hepatitis-E-Virus-Prävalenz in einem Wildtierbestand**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Agnes Van Saint George

Wien, im November 2022

Betreuerin und 1. Begutachterin:

Dr.ⁱⁿ med. vet. Christiane Riedel
Institut für Virologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinischen Universität Wien

2. Begutachterin:

Ass.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. vet. Anna Küber-Heiss
Forschungsinstitut für Wildtierkunde und
Ökologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Mit freundlicher Unterstützung von Dr.ⁱⁿ Angelika Auer und Mag^a. Katharina Dimmel.

Inhaltsverzeichnis

1	Eineitung und Fragestellung	1
1.1	Einleitung und Konzept dieser Arbeit	1
1.2	Die Familie <i>Hepeviridae</i>	1
1.3	<i>Paslahepevirus balayani</i>	1
1.4	Das Hepatitis E-Virus (hier als Substitut für <i>Paslahepevirus balayani</i> verwendet)	2
1.5	Replikation von HEV	2
1.6	Epidemiologie von HEV	3
1.7	HEV Infektion von domestizierten Schweinen	3
1.8	HEV Prävalenz in Deutschland	4
1.9	HEV-3 in Rotwild	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Verwendetes Probenmaterial	6
2.1.2	Verwendetes Realtime PCR-Gerät	8
2.1.3	Verwendete Primer und Sonden	8
2.1.4	Verwendete Kits und Reagenzien	9
2.1.5	Weitere Programme und Firmen	9
2.2	Methoden	9
2.2.1	PCR Protokolle und Herstellung der Mastermixe	9
2.2.2	Probenentnahme und Transport	11
2.2.3	RNA-Extraktion	11
2.2.4	Transformation in <i>E. coli</i> HB101	12
2.2.5	Herstellung der Midipräparation	13
2.2.6	Quantifizierung der DNA-Menge	13
2.2.7	Sanger Sequenzierung	13
2.2.8	Kalkulation der Kopien/ μ l	14
3	Resultate	15
3.1	Generierung und Mengenbestimmung eines DNA-Standards	15
3.2	Temperaturoptimierung Duplex RT-qPCR	15
3.3	Sensitivitätsbestimmung	17
3.4	Auswirkungen von β -Aktin auf das HEV-Signal	17
3.5	Auswirkungen von HEV auf das β -Aktin-Signal	20

3.6 Untersuchung von Wildtierproben	21
3.7 Vergleich Duplex und Monoplex RT-qPCR an ausgewählten Wildschweinproben	24
4 Diskussion	27
5 Abstract.....	34
6 Literaturverzeichnis.....	36
7 Abbildungs- & Tabellenverzeichnis.....	40

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung und Konzept dieser Arbeit

Das Hepatitis-E-Virus (HEV) gilt als einer der bedeutendsten Hepatitis Erreger des Menschen (1). Die Anzahl der registrierten HEV-Infektionen ist innerhalb der letzten Jahre weltweit stark angestiegen. Der Verzehr von rohen oder nicht ausreichend erhitzten Schweinefleischprodukten ist vorrangig für eine Ansteckung mit dem HEV in Industrieländern verantwortlich. Während eine Infektion von Gesunden meist unbemerkt verläuft, kann eine Erkrankung bei Personen mit geschwächtem Immunsystem oder Schwangeren lebensbedrohliche Folgen haben (1). Dem zoonotischen Genotyp 3 (HEV-3), der vor allem in Westeuropa für zahlreiche Infektionen mit HEV verantwortlich ist, wird hier eine besondere Bedeutung beigemessen. Als Hauptreservoir für HEV-3 gilt die Schweinepopulation, ein Transfer des Erregers ist beispielsweise über den Konsum von Schweinefleisch, kontaminiertes Trinkwasser oder engen Kontakt mit infizierten Tieren möglich. Bei Haus- und Wildschweinen verläuft eine Infektion mit Hepatitis E ohne klinische Symptome, allerdings haben sie einen wesentlichen Einfluss auf die Verbreitung des Virus (2). Anlässlich dieser Diplomarbeit wurde eine HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR entwickelt und mit Hilfe dieser Nachweismethode das Vorkommen von HEV in einem Wildtierbestand untersucht. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Optimierungs- und Validierungsversuche für den Duplexnachweis durchgeführt und danach die HEV-Last in Wildschweinproben bestimmt.

1.2 Die Familie *Hepeviridae*

Hepeviren gehören zu den einzelsträngigen RNA-Viren. Sie sind unbehüllt, haben eine ikosaedrale Symmetrie und ihr Genom besitzt eine positive Polarität. Diese Familie beinhaltet zwei Unterfamilien, die *Orthohepevirinae* und die *Parahepevirinae*. Die *Orthohepevirinae* lassen sich in vier Gattungen klassifizieren, wobei das *Paslahepevirus balayani* für den Menschen von größter Bedeutung ist (3).

1.3 *Paslahepevirus balayani*

Die Spezies *Paslahepevirus balayani* enthält die Genotypen HEV-1 bis HEV-8 (3). Diese acht Genotypen unterscheiden sich im Hinblick auf ihr Wirtsspektrum und ihre Übertragungswege zum Teil deutlich. Genotyp 1 und 2 (HEV-1 und HEV-2) werden vorwiegend durch kontaminiertes Trinkwasser übertragen und infizieren nur den Menschen (4). HEV-3 und HEV-4 sind zoonotisch, ihr Hauptreservoir sind das Haus- und Wildschwein, bei denen eine Infektion asymptomatisch verläuft (5). Diese Genotypen können über den Verzehr von Fleischprodukten

oder engem Kontakt mit infizierten Tieren auf den Menschen übertragen werden und sind hauptsächlich in Industrieländern verbreitet, wo sie zu sporadischen Hepatitis E-Fällen führen (1). Ein Subtyp von HEV-3 ist HEV-3ra, der in Hasen vorkommt und auch auf den Menschen übertragen werden kann (6,7). Darüber hinaus konnte der Genotyp 7 ebenfalls im Menschen nachgewiesen werden, der sein Reservoir üblicherweise in Dromedaren hat und im mittleren Osten vorzufinden ist (6). HEV-5 und HEV-6 wurden ausschließlich in Wildschweinen in Japan nachgewiesen (7).

1.4 **Das Hepatitis E-Virus** (hier als Substitut für *Paslahepevirus balayani* verwendet)

Das HEV ist ein unbehülltes Virus mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität und gehört zur Familie *Hepeviridae* (siehe 1.2). Das HEV hat einen 27-34 nm (Nanometer) großen Viruspartikel und sein Genom hat eine Länge von 7.2 kb (Kilobasen). Das Virusgenom ist an seinem 5'-Ende mit 7-Methylguanodin gecapped und am 3' Ende polyadenyliert (8). Es beinhaltet drei offene Leseraster (open reading frames [ORF]) ORF1, ORF2 und ORF 3, wobei ORF1 die Nichtstrukturproteine inklusive Methyltransferase, Cystein Protease, Helikase und RNA-Polymerase, sowie drei Regionen mit unbekannter Funktion (Y, PPR, X) mit einer Länge von insgesamt 1 693 Aminosäuren kodiert. ORF 2 kodiert das virale Kapsidprotein mit einer Länge von 660 Aminosäuren, das für die Interaktion mit Zielzellen und die Immunogenität des HEV verantwortlich ist. ORF 3, der teilweise mit ORF 2 überlappt, kodiert ein kleines Protein mit 113 oder 114 Aminosäuren und ist für Morphologie und Freisetzung der Virionen zuständig (9).

1.5 **Replikation von HEV**

Der Replikationszyklus des HEV beginnt damit, dass sich das Viruspartikel an Heperansulfate und Proteoglykane auf der Oberfläche der Wirtszelle bindet, mit Rezeptoren einen Komplex bildet und durch Clathrin-vermittelte Endozytose ins Zellinnere geschleust wird (10,11). Daraufhin folgt die Freisetzung der viralen Nukleinsäure ins Zytoplasma, die direkt von den Ribosomen der Wirtszelle in Nicht-Strukturproteine (ORF1) translatiert wird. Diese Proteine bilden einen Replikationskomplex, der sowohl genomische RNA, als auch subgenomische RNA produziert. Letztere wird in Kapsidprotein (ORF2) und das membranassoziierte ORF3 Protein, das mit Interferon α interagiert, übersetzt. Die virale RNA wird mit dem Kapsidprotein verpackt und mit Hilfe des Tumor susceptibility gene 101 freigesetzt (14). Beim Verlassen der Wirtszelle werden die Partikel mit Lipiden und ORF3 Proteinen versehen, welche nach Freisetzung aus der Zelle von Gallensäuren und Verdauungsenzymen wieder beseitigt werden (12).

1.6 Epidemiologie von HEV

Eine Erkrankung mit Hepatitis E verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch und selbstlimitierend, schwere Verläufe und Todesfälle treten hauptsächlich bei Risikogruppen auf (13). Genotyp 1 und 2 (HEV-1 und -2) werden überwiegend durch verunreinigtes Trinkwasser und unsaubere Sanitärbedingungen weitergeben und stellen besonders in Afrika, Südostasien und Mexico eine Herausforderung dar. HEV-1 kann entweder durch den fäkal-oralen-Weg, über vertikale Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind, von Person zu Person oder über Bluttransfusionen übertragen werden. Im Unterschied dazu, kann HEV-2 nur fäkal-oral oder von Person zu Person weitergegeben werden (4,13). Während HEV-3 in Europa, Amerika, Afrika und Asien verbreitet ist, wurde HEV-4 vorrangig in China, Japan und Indonesien beschrieben. Eine Infektion mit HEV-3 kann bei Immunsupprimierten und Transplantationspatienten zu schweren Erkrankungsverläufen, bis hin zu Leberzirrhosen führen (14). Sowohl in Industrie-, als auch in Entwicklungsländern kommt es vermehrt zu HEV-Erkrankungen, verursacht durch HEV-3, als dessen Hauptreservoir die Schweinepopulation gilt. HEV-3, der vorrangig in Deutschland und den meisten europäischen Ländern diagnostiziert wird, gilt als potenzielle zoonotische Gefahr (15). Mögliche Übertragungswege des Virus stellen unzureichend erhitzte Lebensmittel, Umweltkontaminationen über Ausscheidungen oder enger Kontakt mit infizierten Schweinen dar (13).

1.7 HEV-Infektion von domestizierten Schweinen

HEV wurde erstmals 1997 in Schweinen entdeckt, seitdem beschreiben zahlreiche Publikationen eine hohe Prävalenz von HEV in Schweinebeständen weltweit (16). Jeder Kontinent ist betroffen, allerdings ist der Vergleich der Seroprävalenz von HEV zwischen den einzelnen Ländern schwierig, da diese sich hinsichtlich der untersuchten Proben und Methoden sehr voneinander unterscheiden (16). Das Vorhandensein von Antikörpern zeigt eine bereits überstandene HEV-Infektion an und kann auch weiter zurückliegende Infektionen detektieren, während der Nachweis von HEV-RNA auf eine Infektion zum Untersuchungszeitpunkt hindeutet (2). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass eine Übertragung von HEV von Wild- auf Hausschweine möglich ist (17). Infizierte Tiere sind durch direkten Kontakt oder über fäkal-orale Übertragung in der Lage, Hausschweine anzustecken. Davon sind besonders Schweine in Freilandhaltung betroffen, die durch den offenen Auslauf in Kontakt mit Wildschweinen gelangen können. Diese Haltungsbedingungen existieren weltweit und stellen einen bedeutenden Risikofaktor für die Schweineproduktion dar (18,19). Einige Studien bestätigen den Einfluss des Alters auf das Infektionsgeschehen mit HEV. Es

wurde nachgewiesen, dass HEV-RNA vor allem in 2-5 Monate alten Schweinen detektiert werden kann, während Tiere, die jünger sind als 2 Monate, für gewöhnlich negativ sind. Der Schutz der maternalen Antikörper, der ungefähr zwei Monate andauert und das Auftreten einer HEV-Infektion im Alter von 2-3 Monaten, untermauern die Tatsache, dass sich die Tiere nach dem Absinken der maternalen Immunität durch engen Kontakt mit Artgenossen mit HEV infizieren (20,21). Eine Virämie findet ein bis zwei Wochen nach der Infektion statt, die Virusausscheidung dauert drei bis vier Wochen mit anschließender Serokonversion (20). Deswegen erwartet man von jenen Tieren, die älter sind als 6-8 Monate, dass sie eine bereits ausgeheilte Infektion mit HEV durchgemacht haben (22,23). Die Dauer der Immunität nach einer überstandenen HEV-Infektion wurde noch nicht vollständig erforscht (15). In der experimentellen Studie von D. Thiry et al aus dem Jahr 2016 wurde jeweils eine Gruppe Ferkel intravenös oder oral mit einem HEV-3-Isolat von Wildschweinen infiziert (22). Ziel dieser Studie war es, genauere Informationen zu Übertragung und Krankheitsverlauf von HEV-3 beim Hausschwein zu bekommen. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass beide Infektionswege in der Lage sind, Hausschweine mit HEV zu infizieren und dass sich das Virus rasch innerhalb einer geschlossenen Population ausbreiten kann. Es wurden keine klinischen Anzeichen beobachtet und die Leberenzyme beider Tiergruppen befanden sich innerhalb der Norm. Bei den Tieren, die oral infiziert wurden, was den natürlichen Übertragungsweg von HEV-3 repräsentiert, wurde eine geringere Ausbreitung im Organismus, eine schwächere Virämie und ein geringerer Befall der Organe, im Vergleich zu jenen Tieren, die intravenös infiziert wurden, beobachtet. Diese Tatsache sollte bei der Risikobewertung im Hinblick auf eine Infektion mit HEV durch den Konsum von kontaminierten Schweinefleischprodukten berücksichtigt werden (22).

1.8 HEV-Prävalenz in Deutschland

Johne et al hat 2022 das Vorkommen von HEV-Infektionen in Wild- und Hausschweinpopulationen in Deutschland untersucht (2). Die Häufigkeit einer HEV-Infektion in Wild- und Hausschweinbeständen kann entweder durch den Nachweis von HEV-RNA mittels RT-qPCR oder durch den Nachweis HEV-spezifischer Antikörper durch ELISA erfolgen (22). Die Antikörperprävalenz bei Hausschweinen lag im Bereich von 42,7-68,6 %, die HEV-RNA-Prävalenz zum Zeitpunkt der Schlachtung allerdings bei 1,0-17,2 %. Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, dass sich Hausschweine in den ersten Lebensmonaten mit HEV infizieren und das Virus bis zum Zeitpunkt der Schlachtung bereits aus dem Körper eliminiert wurde. Die Untersuchung von Wildschweinen auf HEV hat ergeben, dass die

Antikörperprävalenz bei 11,5-45,0 % und die HEV-RNA-Prävalenz von 3,8-38,1 % lag. Diese Abweichungen lassen sich durch unterschiedliche Größe und Besatzdichte der einzelnen Jagdgebiete erklären, die für diesen Nachweis herangezogen wurden (2).

1.9 HEV-3 in Rotwild

HEV-3 konnte auch in Rotwild nachgewiesen werden. Jedoch waren sowohl die HEV-Seroprävalenz als auch die HEV-RNA-Detektionsraten wesentlich geringer als jene, die für Wildschweine in der gleichen geografischen Region bestimmt wurden. Anheyer-Behmenburg et al. (23) widmete sich 2017 der Untersuchung von HEV bei Wildschweinen und erforschte deren Rolle als Vektor für eine Spillover-Infektion in Rotwild. Dabei wurden konstant niedrigere Konzentrationen von HEV in Lebergewebe von Rotwild nachgewiesen, verglichen mit Wildschweinen aus der gleichen Jagdpopulation. Die Datenlage deutet darauf hin, dass es sich bei Rotwild nicht um ein Reservoir für HEV-3 handelt, sondern dass diese Tiere sich durch das Zusammenleben in einem gemeinsamen Lebensraum infizieren (23). Wildschweine wiederum scheinen ein Auslöser für Spillover-Infektionen für andere Wildtiere und den Menschen zu sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendetes Probenmaterial

Die Wildschweinproben stammen von einer alljährlichen Drückjagd im Herbst 2020, aus einem privaten Wildgehege im Osten Österreichs. Das Wildtiergehege ist 12 km² groß und eingezäunt mit einer hohen Steinmauer. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Tiere Kontakt mit wildlebenden Tieren außerhalb des Geheges hatten. Basierend auf den Ergebnissen der jährlichen Jagd und Beobachtungen der lokalen Jäger wird angenommen, dass die Population ungefähr aus 300 Stück Rotwild und 450 Wildschweinen besteht. Es sind seit 10 Jahren keine neuen Tiere in den Bestand integriert worden, man kann also davon ausgehen, dass es sich um eine geschlossene Population handelt. Dem Tierbestand wurden zusätzliche Futtermittel bereitgestellt. Für diese Arbeit wurden 45 Wildschweinproben und zwei Hirschproben analysiert, die während einer Treibjagd von erlegtem Wild gewonnen wurden. Weitere Informationen betreffend die körperliche Verfassung der Tiere, sowie Alter und Geschlecht werden in Tabelle 1 näher erläutert.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Wildtierproben

Tierart und Probennummer	Geschlecht	Alter	Gewicht in kg
WS2	m	juvenil	33
WS3	m	adult	109
WS4	m	adult	83
WS5	w	juvenil	34
WS6	w	juvenil	27
WS7	w	juvenil	20
WS8	m	adult	85
WS9	w	adult	60
WS10	m	juvenil	16
WS11	w	juvenil	21
WS12	m	adult	71
WS13	w	juvenil	26
WS14	w	juvenil	28
WS15	m	adult	106

WS16	m	adult	95
WS17	m	adult	115
WS18	m	juvenil	40
WS19	m	juvenil	35
WS20	w	juvenil	28
WS21	m	juvenil	48
WS22	m	juvenil	35
WS23	m	juvenil	25
WS24	m	adult	85
WS25	m	juvenil	18
WS26	w	juvenil	28
WS27	w	juvenil	29
WS28	m	adult	115
WS29	w	juvenil	45
WS30	w	adult	54
WS31	m	juvenil	23
WS32	w	juvenil	27
WS33	m	adult	49
WS34	w	juvenil	25
WS35	m	juvenil	36
WS36	m	juvenil	25
WS37	m	juvenil	26
WS38	m	juvenil	24
WS39	m	adult	46
WS40	w	juvenil	39
WS41	w	juvenil	36
WS42	m	juvenil	39
WS43	w	juvenil	33
WS44	w	adult	65
WS45	w	juvenil	29
WS46	w	juvenil	37
H37	w	adult	70
H38	w	juvenil	50

2.1.2 Verwendetes Realtime PCR-Gerät

Die Versuche wurden mit dem Rotor-Gene Q 5 plex (Qiagen, Germany) durchgeführt und mit der dazugehörigen Software (Version 2.3.4.3) analysiert.

2.1.3 Verwendete Primer und Sonden

Die in Tabelle 2 genannten Primer und Sonden wurden für die HEV-Monoplex RT-qPCR und HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR verwendet. Die HEV-Primer und Sonde wurden von Jothikumar et al. (2006) (24) durch Sequenzalignment von HEV-Genomsequenzen in der hochkonservierten ORF 3 Region, die als Zielsequenz für den Nachweis von HEV dient, entworfen und publiziert. Die β -Aktin RT-qPCR dient zur internen Kontrolle und stammt aus einer Arbeit von Toussaint et al. (2006) (25). Die Primer und Sonden wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

Tabelle 2: Verwendete Primer und Sonde zum Nachweis von HEV und β -Aktin.

Primer	Sonde	Sequenz	Richtung
qHEV-F, 4876		5'-GGT GGT TTC TGG GGT GAC-3'	Forward
qHEV-R, 4877		5'-AAG GGT TGG TTG GAT GAA-3'	Reverse
	qHEV-P, 4878	FAM-5'-TGA TTC TCA GCC CTT CGC- 3'-BHQ1	
q β -Aktin- 1005-F		5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C-3'	Forward
q β -Aktin- 1135-R		5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T- 3'	Reverse
	q β -Aktin- 1081-P	HEX-5'-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3'-BHQ1	

2.1.4 Verwendete Kits und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Kits und Reagenzien.

Verwendung	Kit oder Reagens	Firma
Mastermix	Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit®	NEB, Ipswich, USA
Midipreparation	Favorgen Plasmid DNA Extraction Mini Kit®	Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan
RNA-Extraktion	Tissue lyser II	Qiagen, Germany
	QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit, QIAcube HT	Qiagen, Germany

2.1.5 Weitere Programme und Firmen

Das Plasmid „pEX-A128-HepE-standard“ für die Generierung und Mengenbestimmung des DNA-Standards stammt von der Firma Eurofins Genomics. Der Promega Quantus und der Nanodrop wurden für die Bestimmung der DNA-Menge der Plasmidkopien herangezogen. Die nachfolgende Berechnung des DNA-Standards erfolgte durch den NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>).

2.2 Methoden

2.2.1 PCR-Protokolle für diese Diplomarbeit (RT-qPCR HEV, RT-qPCR (Plasmid) und Midiprep) und Herstellung der Mastermixe

PCR-Protokoll HEV-Monoplex:

Für den Nachweis des Hepatitis-E-Virus in einer Monoplex-PCR wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Zuerst wurde ein Mastermix mit dem Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB, Ipswich, USA) laut Protokoll hergestellt, siehe Tabelle 4. Die Amplifikatlänge des HEV RT-qPCR Produkts beträgt 70 bp (Basenpaare).

Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Herstellung des Mastermix für die HEV-Monoplex RT-qPCR. Angaben in μl .

Anzahl der Mastermix	40 Stück
Luna RT-reaction Mix	315
Luna RT-enzyme Mix	31,5
RNAse freies H₂O	222,6
Primer-F-(40 μM) „qHEV-F, 4876“ + R(40 μM) „qHEV-R, 4877“	12,6
Sonde (20 μM) „qHEV-P,4878“	6,3
Gesamtvolumen Mastermix	588
Zugabe Template	1

Tabelle 5: Temperaturschema der HEV RT-qPCR und der HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR.

Temperatur in °C	Zeit in Minuten/ Sekunden	Zyklen
55	10 Minuten	1
95	1 Minute	1
95	10 Sekunden	45
55	30 Sekunden	

PCR-Protokoll der HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR:

Der HEV RT-qPCR Duplex Mastermix wurde ebenfalls mit dem Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit angefertigt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: PCR-Protokoll für die Herstellung des Mastermix für die HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR. Angaben in μ l.

Anzahl der Mastermix	40 Stück
Luna RT-reaction Mix	315
Luna RT-enzyme Mix	31,5
RNAse freies H₂O	203,7
Primer-F1-(40 μM) + R1 (40 μM)	12,6
Primer-F2-(40 μM) + R2 (40μM)	12,6
Sonde 1 (20 μM)	6,3
Sonde 2 (20 μM)	6,3
Gesamtvolumen Mastermix	588
Zugabe Template	1

2.2.2 Probenentnahme und Transport

Die Entnahme der Proben erfolgte durch die MitarbeiterInnen des Forschungsinstituts für Wildtierkunde und Ökologie. Die Probenentnahme und Sektion wurden ein bis drei Stunden nach Eintreten des Todes vor Ort durchgeführt. Die Gewebeproben von Lunge und Milz wurden durch Aspiration von Gewebe mit einer Nadel (Durchmesser 14 G) und einer sterilen 10 ml Einwegspritze nach der Eröffnung der Körperhöhlen gewonnen. Danach wurden Abstriche der Tonsillen gemacht und das Feldmaterial bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren. Diese Art der Probengewinnung während der Jagd hat sich als praktisch und zeitsparend erwiesen um das Risiko einer Kreuzkontamination auf ein Minimum zu beschränken (26).

2.2.3 RNA-Extraktion

Für die Nukleinsäureextraktion wurden etwa 100 mg von Lunge und Milz in 1 ml PBS mit dem Tissue Lyser II (Qiagen, Germany) homogenisiert und bei 16 000 g 3 Minuten lang zentrifugiert. Die Tonsillarabstriche wurden mit 1 ml sterilem PBS für 10 Sekunden gevortext. Es wurden zu gleichen Teilen Tonsillarlysate und der Überstand des Lungen- und Milzlysates

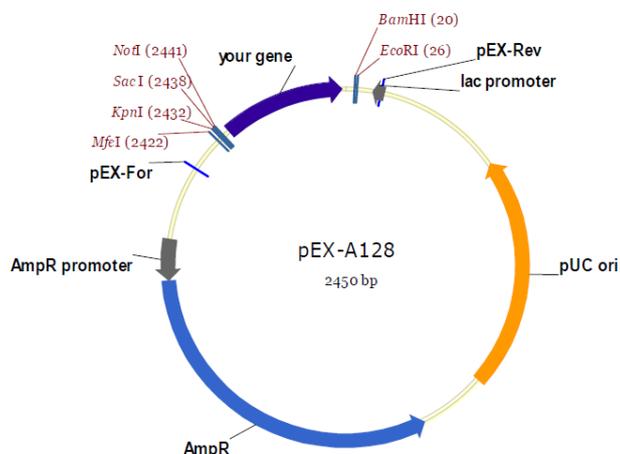
gepoolt und 200 µl davon mit dem QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit im QIAcube HT (Qiagen, Hilden, Germany) nach Anweisungen des Herstellers extrahiert.

2.2.4 Transformation in *E. coli* HB101

Eine Transformation ist die Übertragung von genetischem Material durch die Aufnahme freier DNA. Es handelt sich hierbei um ein natürliches Phänomen, dass kompetente Bakterien nutzen, um freie DNA aus ihrer Umgebung durch ihre Zellwand aufzunehmen. Ein häufig in der Molekularbiologie eingesetztes Verfahren ist die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden, weil bei dieser Methode DNA-Moleküle in zahlreicher Menge vervielfältigt werden können. Im Zuge dieser Arbeit wurden *E. coli* HB101 und ein Plasmid „pEX-A128-HepE-standard“ (in dieser Arbeit als pK 189 bezeichnet) von der Firma Eurofins Genomics mit einer Gesamtlänge von 2520 Basenpaaren verwendet. Die Karte des Plasmids ist in Abbildung 1 dargestellt. Dieses Plasmid wurde durch Einsetzen der Zielsequenz der HEV RT-qPCR in den Vektor pEX-A128 mit einer Länge von 2450 Basenpaaren generiert. Für die Transformation wurden 30 µl kompetente *E. coli* HB101 auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 37°C wurden die Zellen eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Dann wurden 200 µl LB-Medium hinzugefügt, davon 50 µl sofort auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert

Abbildung 1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids „pEX-A128-HepE-standard“ von der Firma Eurofins Genomics.

pEX-A128 vector map, multiple cloning site and full sequence



2.2.5 Herstellung der Midipräparation

Die Midipräparation wird zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien genutzt. Für die Herstellung der Midipräparation wurde der Favorgen Plasmid-Mini-Kit benutzt. Zunächst wurden vier Kulturen der am Tag zuvor retransformierten E.Coli HB101 gepickt und im Midivolumen von 50 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 35 °C im Schüttler bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 10 Minuten bei 5 000 x Umdrehungen abzentrifugiert. Durch alkalische Lyse wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Dafür wurde dem Pellet 400 µl FADP1 Puffer (+ RNase A) hinzugefügt und die Probe durch vortexen resuspendiert. Der Inhalt wurde dann in ein 2 ml Tube überführt, 400 µl FADP2 Puffer dazugegeben, 5-10 x invertiert und danach 2-5 Minuten inkubiert. Dann wurden 600 µl FADP3 Puffer hinzugegeben, nochmals 5-10x invertiert und 5 Minuten bei 18 000 x g zentrifugiert. Die Bindung der DNA erfolgte durch das zweimalige Beladen der Säule mit 700 µl Lysat, wobei der Durchfluss abgekippt wurde, bevor die Säule erneut beladen wurde. Anschließend wurde die Säule für 30 Sekunden bei 11 000 x g zentrifugiert. Das Waschen dient der Entfernung zellulärer Bestandteile und anderer Kontaminationen. Zuerst wurde mit 400 µl W1 Puffer gewaschen und der Durchfluss abgekippt. Beim zweiten Waschschrift wurden 700 µl Wash Buffer (+EtOH) verwendet und der Durchfluss wieder weggekippt. Nun wurde die Säule zunächst 30 Sekunden bei 11 000 x g zentrifugiert und dann für 3 Minuten bei 18 000 x g trocken zentrifugiert. Die trockene Säule wurde in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Für die Elution der DNA wurden 100 µl H₂O_{dd} direkt auf die Matrix aufgetragen, dann eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend eine Minute bei 18 000 x g zentrifugiert.

2.2.6 Quantifizierung der DNA-Menge:

Im Anschluss an die Midipräparation wurde die DNA-Konzentration der Plasmidpräparationen pK189#1-pK189#4 mit dem Nanodrop gemessen. Das HEV-Plasmid pK189#2, welches für die weiteren Versuche als Standard eingesetzt worden ist, wurde mit dem Promega Quantus erneut quantifiziert, um ein Ergebnis, das spezifisch für DNA ist, zu erhalten. Die Quantifizierung auf dem Promega Quantus wurde mit dem Promega OneDNA-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Sanger Sequenzierung:

Die Sequenzierung des PCR-Produkts wurde von der Firma Eurofins Genomics ausgeführt. Dafür wurden jeweils 40 ng/µl von pK189#2- pK189#4 mit dem Primer qHEV_forward sequenziert.

2.2.8 Kalkulation der Kopien/ μ l:

Die Berechnung der Plasmidkopien pro μ l Plasmidpräparation erfolgte mit dem NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>).

3 Resultate

3.1 Generierung und Mengenbestimmung eines DNA-Standards

Das verwendete Plasmid „pEX-A128-HepE-standard“ (in dieser Arbeit als pK 189 bezeichnet) stammt von der Firma Eurofins Genomics und hat eine Gesamtlänge von 2520 Basenpaaren. Dieses Plasmid wurde durch Einsetzen der Zielsequenz der HEV qPCR in den Vektor pEX-A128 mit einer Länge von 2450 Basenpaaren generiert. Nach Erhalt des Plasmids wurde eine Retransformation in kompetente *E. coli* HB101 durchgeführt und die Bakterien über Nacht auf LB-Agarplatten, die Ampicillin als Selektionsmedium enthielten, angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden vier Mikokulturen inokuliert und wieder über Nacht inkubiert. Darauf folgte die Aufreinigung der Plasmid DNA mit einer Midipräparation. Mit dem Nanodrop wurde eine DNA-Konzentration von 40 ng/μl bestimmt. Zur Validierung der Sequenz von pK189 #1 – pK189 #4 wurden jeweils 40 ng/μl Plasmid DNA mit dem Primer qHEV_forward sequenziert. Die nachfolgende Sequenzanalyse ergab, dass nur die Klone 2-4 die korrekte Sequenz enthielten. Der nächste Schritt war die erneute Bestimmung der DNA-Masse des HEV-Plasmids pK289#2, welches für die weiteren Versuche als Standard eingesetzt worden ist. Hierzu wurde nun mit dem Promega Quantus eine Messung durchgeführt, da diese spezifisch für DNA ist. Die so ermittelte DNA-Masse lag bei 22 ng/μl für pK289#2 und damit deutlich unter der Nanodrop Messung, die 60 ng/μl ergeben hatte. Die ermittelten 22 ng/μl entsprechen einer DNA-Menge von $8,508 \times 10^9$ Plasmidkopien /μl. Dies entspricht dann auch den Genomäquivalenten (GE) / μl. Die Berechnung dieses Wertes erfolgte mit dem NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>) und er dient als DNA-Standard in dieser Diplomarbeit. In weiterer Folge wurde das Plasmid zur einfacheren Berechnung auf 1×10^9 GE/μl vorverdünnt und weitere Verdünnungsreihen von dieser Verdünnung ausgehend durchgeführt.

3.2 Temperaturoptimierung Duplex RT-qPCR

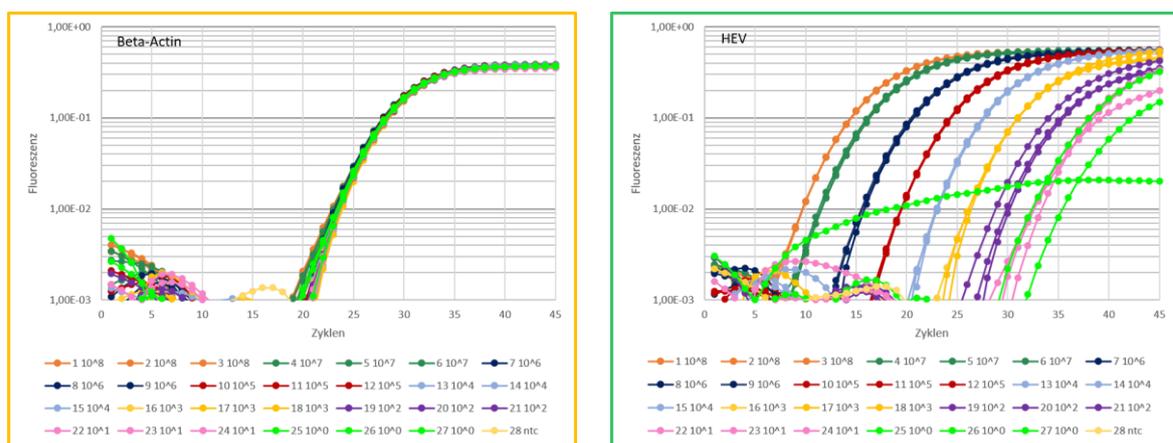
Für die HEV RT-qPCR sind zwei verschiedene Annealingtemperaturen getestet worden: 55 °C und 60 °C. Dabei wurden eine Positivkontrolle (bekannt positive Feldprobe), ein NTC (no template control), sowie der HEV-Standard pK189#2 verwendet. Aus diesem Standard wurde eine 10-fach-Verdünnungsreihe hergestellt und die Verdünnungen mit 10^{-2} GE/ Reaktion und 10^{-3} GE/ Reaktion wurden in die PCR eingesetzt. Danach wurden die RT-qPCRs einmal mit Duplex-Mastermixen (HEV und β-Aktin Primer und Probe) und einmal als Monoplex RT-qPCR (nur HEV-Primer und Probe) angesetzt und jeweils im grünen Kanal (für HEV-Nachweis) und im gelben Kanal (für β-Aktin-Nachweis) gemessen. Beim Vergleich der ausgewerteten Daten

wurde festgestellt, dass bei jenen RT-qPCR-Ansätzen, bei denen die Mastermixe β -Aktin-Primer und Probe enthielten, bei einer Annealingtemperatur von 60 °C keine Ergebnisse im grünen Kanal darstellbar waren. Bei 55 °C war die β -Aktin enthaltende Feldprobe sowohl im grünen als auch im gelben Kanal deutlich positiv. Auch die Standards lieferten positive HEV-Ergebnisse. Im Monoplex-Ansatz waren HEV-spezifische Nukleinsäuren auch bei 60 °C nachweisbar, der Ansatz bei einer Annealingtemperatur von 55 °C mit β -Aktin-Reagenzien zeigte allerdings höhere Sensitivität. Aufgrund der vorliegenden PCR-Resultate wurde ermittelt, dass eine Annealingtemperatur von 55 °C für den Nachweis von HEV-spezifischen Nukleinsäuren in Kombination mit einem β -Aktin-Nachweis besser geeignet ist als eine Annealingtemperatur von 60 °C.

3.3 Sensitivitätsbestimmung

Mit der Sensitivitätsbestimmung soll das Detektionslimit der RT-qPCR untersucht werden. Es wurde eine 10er Verdünnungsreihe hergestellt, die 10^0 bis 10^8 Kopien des DNA-Standards enthielt. Danach wurde zu jeder Verdünnungsstufe die gleiche Menge eines definiert β -Aktin positiven, HEV negativen Extrakts beigemischt, um Konditionen zu verwenden, die möglichst den zu untersuchenden Feldproben entsprechen. Anschließend wurde die Duplex RT-qPCR in drei Reaktionen pro Verdünnungsstufe angesetzt, siehe 2.2.14. Ziel dieses Versuchs war festzustellen, bis zu welcher definierten Konzentration des DNA-Standards mit dieser RT-qPCR noch alle Triplikate valide nachgewiesen werden können. Dadurch kann eine Detektionsschwelle definiert werden, die aussagt, bis wann eine Probe positiv ist und ab wann sie als fraglich gilt. Bis zu einer Verdünnung von 10^1 GE in der Reaktion konnten alle Replikate nachgewiesen werden. Beim Vorhandensein von 10^0 GE in der Reaktion waren nur noch zwei von drei Replikaten positiv (Abb. 2 und Tab. 8). Daher kann anhand dieses Versuches davon ausgegangen werden, dass Proben, die mindestens 10^1 GE/Reaktion enthalten, noch sicher nachgewiesen werden können.

Abbildung 2: Sensitivitätsbestimmung der HEV β -Aktin Duplex RT-qPCR. Untersucht wurden Triplikate einer 10er Verdünnungsreihe, die 10^0 bis 10^8 Kopien des DNA-Standards in der Reaktion enthalten. Um die Auswirkung der unterschiedlichen HEV-Mengen auf das β -Aktin-Signal zu untersuchen, wurde den Proben ein definiert β -Aktin positives, HEV negatives Extrakt beigemischt. Die grün umrahmte Grafik zeigt das HEV-Signal und die gelb umrahmte Grafik das β -Aktin Signal.



3.4 Auswirkungen von β -Aktin auf das HEV-Signal

Ziel dieses Versuchs war herauszufinden, wie sich die Anwesenheit von β -Aktin auf das HEV-Signal auswirkt. Dazu wurde ein Triplikatensatz wie unter 3.3 beschrieben angesetzt. Jedoch wurde in diesem Versuch keine definierte Menge β -Aktin zugegeben. Es wurden die Ct-Werte

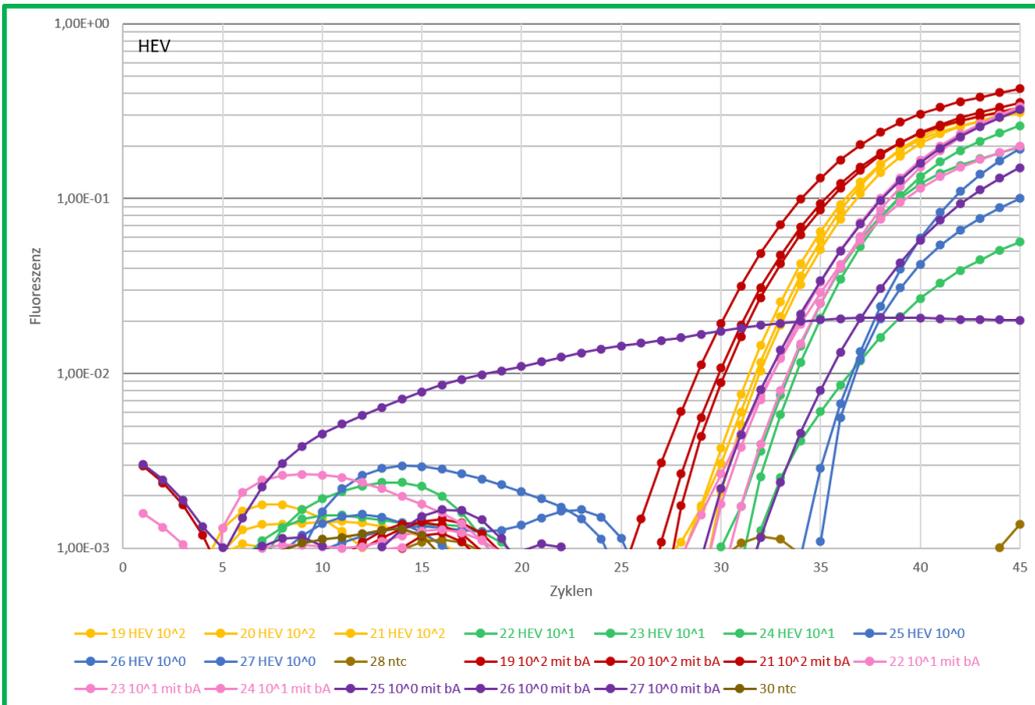
des HEV-Signals, die in den beiden Ansätzen erzielt wurden, miteinander verglichen (Tabelle 8). Die Ct-Werte des Ansatzes, dem β -Aktin hinzugefügt wurde, lagen meistens niedriger als die, denen kein β -Aktin zugesetzt wurde. Dies ist besonders bei den Proben mit geringen Konzentrationen des HEV-Standards ersichtlich (Abb. 3). Ohne das Vorhandensein von β -Aktin waren ab 10^1 GE/ Reaktion nur zwei von drei Replikaten nachweisbar. Es kann vermutet werden, dass das β -Aktin Signal das HEV-Signal durch spektrales Überlappen erhöhen kann oder dass Pipettierfehler für das beobachtete Phänomen verantwortlich sind. Auf Grund dieses Ergebnisses müssen schwach positive HEV-Signale bei stark positivem β -Aktin Signal vorsichtig interpretiert werden und die sichere Nachweisgrenze sollte mit 10^2 GE/Reaktion angenommen werden.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe des HEV-Standards. Das Plasmid pK289#2 wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^8 bis 10^0 als Triplikatansatz einmal mit und einmal ohne β -Aktin hergestellt, um die Auswirkungen des β -Aktins auf die Sensitivität der Duplex RT-qPCR zu ermitteln.

GE Menge/ Reaktion	Ct HEV mit Aktin Zugabe	Ct β -Aktin mit β -Aktin Zugabe	Mittelwert HEV pro Verdünnung mit β -Aktin Zugabe	Ct HEV ohne β -Aktin Zugabe	Ct β -Aktin ohne β -Aktin Zugabe	Mittelwert HEV pro Verdünnung ohne β -Aktin Zugabe
10^8	13,61	26,84	13,58	14,17	-	14,15
10^8	13,57	26,78		14,36	-	
10^8	13,56	26,81		13,93	--	
10^7	15,42	26,81	15,37	18,04	-	18,01
10^7	15,48	26,75		18,09	-	
10^7	15,22	26,64		17,91	-	
10^6	19,66	26,95	19,66	21,62	44,6	21,67
10^6	19,79	26,81		21,78	-	
10^6	19,54	26,68		21,62	-	
10^5	23,41	26,82	23,44	25,34	-	25,46
10^5	23,51	27,06		25,42	37,38	
10^5	23,4	26,99		25,61	-	
10^4	26,72	27,01		26,43	-	

10 ⁴	26,69	27,04	26,75	26,58	-	26,51
10 ⁴	26,85	27,1		26,51	-	
10 ³	30,07	27,17	30,11	30,79	-	30,72
10 ³	30,13	27,31		30,6	-	
10 ³	30,13	27,06		30,78	-	
10 ²	34,47	27,17	33,91	35,21	-	35,21
10 ²	34,19	27,14		35,5	-	
10 ²	33,07	27,04		34,92	40,05	
10 ¹	37,86	27,12	37,46	-	-	37,34
10 ¹	37,01	27,06		37,24	-	
10 ¹	37,51	27,03		37,43	-	
10 ⁰	-	27,05	38,98	40,16	-	40,96
10 ⁰	37,06	26,86		-	-	
10 ⁰	40,89	27,05		41,75	-	

Abbildung 3: Untersuchung der Auswirkung von β -Aktin auf die Detektionsschwelle von 10⁰ bis 10² HEV-Kopien in der Reaktion. Gezeigt sind die Fluoreszenzsignale für jeweils drei Proben der gleichen Verdünnung mit (gekennzeichnet als mit β -Aktin in der der Legende) und ohne Zugabe von β -Aktin. bA = β -Aktin.



3.5 Auswirkungen von HEV auf das β -Aktin-Signal

Bei diesem Versuch sollte festgestellt werden, wie sich die Anwesenheit von HEV auf das β -Aktin Signal in der Duplex RT-qPCR auswirkt. Dabei ist anhand des Triplikatansatzes mit Konzentrationen von 10^8 - 10^0 GE/Reaktion, welche im Triplikat angesetzt worden sind, untersucht worden, ob ein Signal im grünen Kanal, also HEV, in den gelben Kanal strahlt und ob dadurch das β -Aktin Signal verfälscht wird. Es wurden die Ct-Werte des konstant zugesetzten β -Aktins in Bezug auf die sich verändernde Menge an HEV in der Reaktion verglichen. Tabelle 9 listet die einzelnen Ct-Werte der HEV-Verdünnungsreihe von 10^8 bis 10^0 GE im Triplikatansatz auf.

Es wurde gemessen, inwiefern sich die β -Aktin Werte zwischen der höchsten und niedrigsten HEV-Konzentration unterscheiden. Die ermittelten Ct-Werte pro Verdünnung lagen zwischen 26,81 und 27,18. Die Abweichung ist sehr gering und scheint nicht mit der Menge an HEV in der Reaktion zu korrelieren. Tabelle 7 zeigt, dass bei dem Triplikatansatz ohne β -Aktin bei den HEV-Konzentrationen von 10^6 , 10^5 und 10^2 GE/ μ l ein β -Aktin Signal gemessen wurde. Es gab jeweils nur bei einem Replikat in drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen ein positives β -Aktin-Signal, was auf eine Kontamination des PCR-Ansatzes zurückzuführen sein kann, weil das Auftreten und die Höhe des Signals nicht mit der HEV-Menge in der Reaktion zu korrelieren scheint.

Tabelle 8: Verdünnungsreihe des HEV-Standards. Das Plasmid pK289#2 wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^8 bis 10^0 GE/ μ l als Triplikatansatz angefertigt und die Ct-Werte im gelben Kanal bestimmt.

HEV-Konzentration	Ct-Wert β -Aktin	Mittelwert Ct β -Aktin/Verdünnung
10^8	26,84	26,81
10^8	26,78	
10^8	26,81	
10^7	26,81	26,73
10^7	26,75	
10^7	26,64	
10^6	26,95	26,81
10^6	26,81	
10^6	26,68	

10 ⁵	26,82	26,96
10 ⁵	27,06	
10 ⁵	26,99	
10 ⁴	27,01	27,02
10 ⁴	27,04	
10 ⁴	27,1	
10 ³	27,17	27,18
10 ³	27,31	
10 ³	27,06	
10 ²	27,17	27,12
10 ²	27,14	
10 ²	27,04	
10 ¹	27,12	27,07
10 ¹	27,06	
10 ¹	27,03	
10 ⁰	27,05	26,99
10 ⁰	26,86	
10 ⁰	27,05	

3.6 Untersuchung von Wildtierproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Duplex RT-qPCR entwickelt und mit dieser Nachweismethode das Vorkommen von HEV beim Schwarzwild in einem geschlossenen, österreichischen Wildtierbestand untersucht, um die Prävalenz von HEV in dieser Population zu schätzen. Dafür sind 45 Wildschweinproben analysiert worden, siehe Abbildung 4. Die Feldproben wurden zunächst extrahiert, wie in 2.2.3 beschrieben, und dann gemeinsam mit den HEV-Standards in einer HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR angesetzt. Die HEV-Standards 10⁷ bis 10⁵ sind für die Quantifizierung der Wildschweinproben herangezogen worden und wurden wie in 2.2.14 beschrieben hergestellt. Um entsprechende Rahmenbedingungen für die zu untersuchenden Feldproben zu schaffen, wurden die HEV-Standards 10⁷ bis 10⁵ ausgewählt, denen zuvor β -Aktin zugesetzt wurde. Die Untersuchung der Prävalenz von HEV ergab, dass 14 Feldproben HEV positiv waren (siehe Abbildung 4). Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Ct-Werte der getesteten Tiere für HEV zwischen 25,45 und 43,58 lagen, siehe Tabelle 10.

Bei der Analyse des β -Aktin-Signals wurde festgestellt, dass alle Proben, bis auf zwei, WS4 und WS 11, ein Signal in der PCR zeigten. Das β -Aktin-Signal dieser Proben lag im Bereich von Ct 16 bis 27. Um auszuschließen, dass Hemmstoffe einen Nachweis in den Extrakten von WS4 und WS11 verhinderten, wurden diese Proben daraufhin in einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung gemeinsam mit den HEV-Standards nochmals in der Duplex RT-qPCR untersucht (Abbildung 5). Zusätzlich wurden hierbei auch noch zwei Hirschproben, die aus dem gleichen Bestand stammten und schwach positiv waren, ebenso verdünnt und getestet, um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen Fehler beim Ansetzen der PCR oder das Vorhandensein von Hemmstoffen handelte. Bei der Wiederholung der Untersuchung auf HEV mittels Duplex RT-qPCR an Proben, bei denen zuvor kein β -Aktin in der PCR detektiert werden konnte, konnte nun ein positives β -Aktin Signal nachgewiesen werden. Jedoch war keine Belastung der Proben mit HEV detektierbar. Um die Viruskonzentration in GE/ml Tupfer- und Gewebelysat der Feldproben zu bestimmen, wurde die von Rotor-Gene Q 5plex (Quiagen, Germany) ermittelte Konzentration der GE/ μ l aus den extrahierten Proben mit dem Umrechnungsfaktor 500 multipliziert. Basierend auf dem vorangegangenen Triplikatansatz wurde als untere Nachweisgrenze von HEV eine Konzentration von 100 GE/ μ l Extrakt definiert, weil hier sowohl mit als auch ohne β -Aktin noch 3 Replikate nachgewiesen werden konnten. Die Proben WS10 und WS16 lagen unter dieser Nachweisgrenze und wurden somit als fraglich bewertet. Von den 14 positiv getesteten Feldproben konnte in 12 Wildschweinen HEV sicher nachgewiesen werden, siehe Tabelle 9.

Anschließend wurde die Prävalenz des Feldmaterials für HEV berechnet. Dafür wurden die als positiv bewerteten Proben (12) durch die Gesamtzahl an Feldproben (45) dividiert und mit 100 multipliziert. Aufgrund der vorliegenden PCR-Resultate der getesteten Feldproben kann die HEV-Prävalenz in diesem Bestand auf 26,6 % geschätzt werden.

Abbildung 4: Untersuchung der HEV-Prävalenz mit der entwickelten Duplex PCR an Wildschweinproben gewonnen im Herbst 2020 aus einem geschlossenen Bestand. Die grün umrahmte Grafik zeigt das HEV-Signal und die gelb umrahmte Grafik das β -Aktin-Signal.

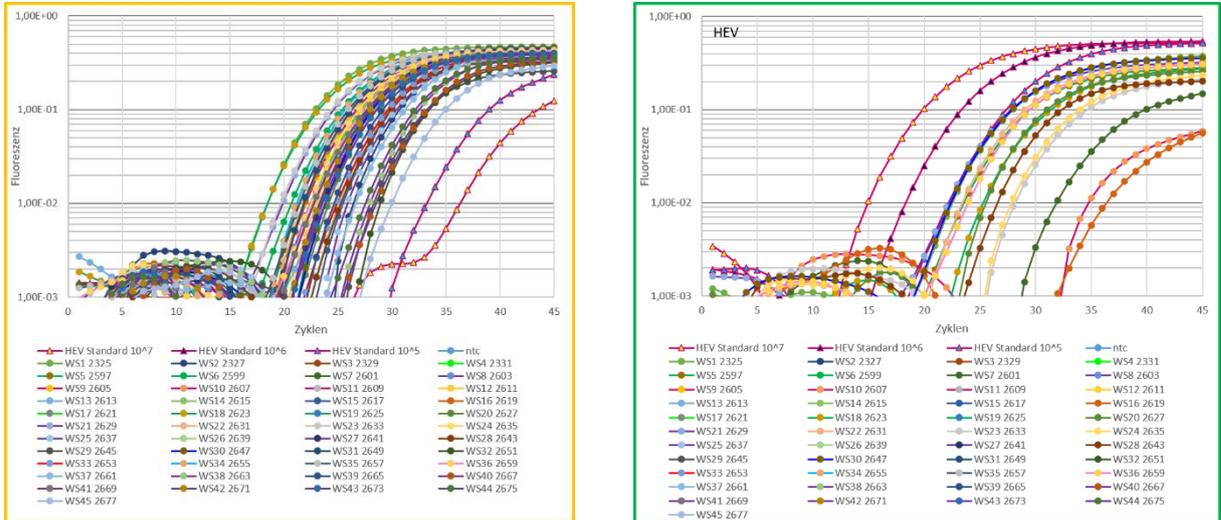


Abbildung 5: Wiederholung der Untersuchung auf HEV mittels Duplex PCR an Proben, in denen zuvor kein β -Aktin in der PCR detektiert werden konnte. Die grün umrahmte Grafik zeigt das HEV-Signal und die gelb umrahmte Grafik das β -Aktin-Signal.

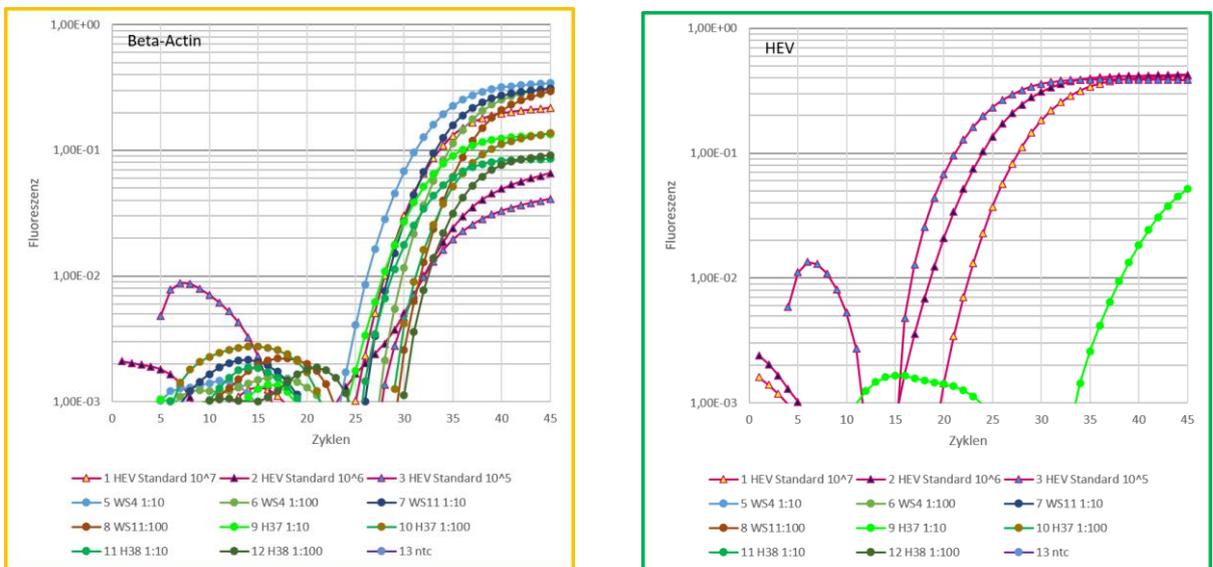


Tabelle 9: Ct-Werte und GE/ μ l der positiv auf HEV getesteten Wildtierproben und berechnete HE-Viruslast in GE/ml Probe (Tupfer-/Organlysat). HEV-spezifische Nukleinsäuren wurden in grünen, β -Aktin wurde im gelben Kanal gemessen.

Probe	Ct-Wert HEV	Ct-Wert β -Aktin	GE/ μ l Extrakt	GE/ml Lysat
WS1	25,68	19,76	7,92E+04	3,96E+07
WS5	26,97	23,88	3,56E+04	1,78E+07
WS7	36,04	22,69	1,32E+02	6,60E+04
WS10	42,31	24,55	2,74E+00	1,37E+03
WS16	43,58	23,17	1,25E+00	6,25E+02
WS18	28,70	19,82	1,23E+04	6,15E+06
WS20	28,59	25,36	1,31E+04	6,55E+06
WS21	25,45	21,25	9,13E+04	4,57E+07
WS22	26,65	23,06	4,34E+04	2,17E+07
WS23	31,70	21,04	1,92E+03	9,60E+05
WS24	31,18	23,73	2,65E+03	1,33E+06
WS28	29,75	26,57	6,40E+03	3,20E+06
WS30	25,60	25,05	8,32E+04	4,16E+07
WS36	27,17	24,04	3,16E+04	1,58E+07

3.7 Vergleich Duplex und Monoplex RT-qPCR an ausgewählten Wildschweinproben

Bei diesem Versuch wurde die Detektion von β -Aktin in der β -Aktin Monoplex-PCR mit dem β -Aktin Nachweis in der HEV β -Aktin Duplex PCR verglichen, siehe Abbildung 6. Es sind jeweils eine stark beziehungsweise drei schwach β -Aktin positive Wildschweinproben wie in 2.2.3 beschrieben, extrahiert und anschließend sowohl in der β -Aktin Monoplex, als auch in der HEV β -Aktin Duplex RT-qPCR analysiert worden. Ziel dieser Untersuchung war es, festzustellen, wie sich das Vorhandensein von HEV in einer Feldprobe auf das β -Aktin Signal auswirkt. Bei dem Vergleich der Ct-Werte der ausgewählten Wildschweinproben wurde festgestellt, dass das β -Aktin Signal in der HEV Duplex RT-qPCR höher war als in der Monoplex-PCR, siehe Tabelle 11. In Proben, in denen kein HEV-Nachweis erfolgte, waren die Ct-Werte in der Monoplex-PCR um 1,53 bzw. 2,23 höher als in der Duplex-PCR. Wenn in den Proben auch HEV nachgewiesen werden konnte, waren die Ct-Werte für β -Aktin in der Monoplex-PCR um 3,56 bzw. 8,45 erhöht, verglichen mit der Duplex-PCR.

Abbildung 6: Vergleich der Ergebnisse der β -Aktin Monoplex-PCR (M) mit dem β -Aktin Signal in der HEV β -Aktin Duplex-PCR (D). Jeweils eine stark und drei schwach β -Aktin positive Wildschweinproben aus dem Feldmaterial wurden in beiden PCRs analysiert. Die grün umrahmte Grafik zeigt das HEV-Signal und die gelb umrahmte Grafik das β -Aktin-Signal.

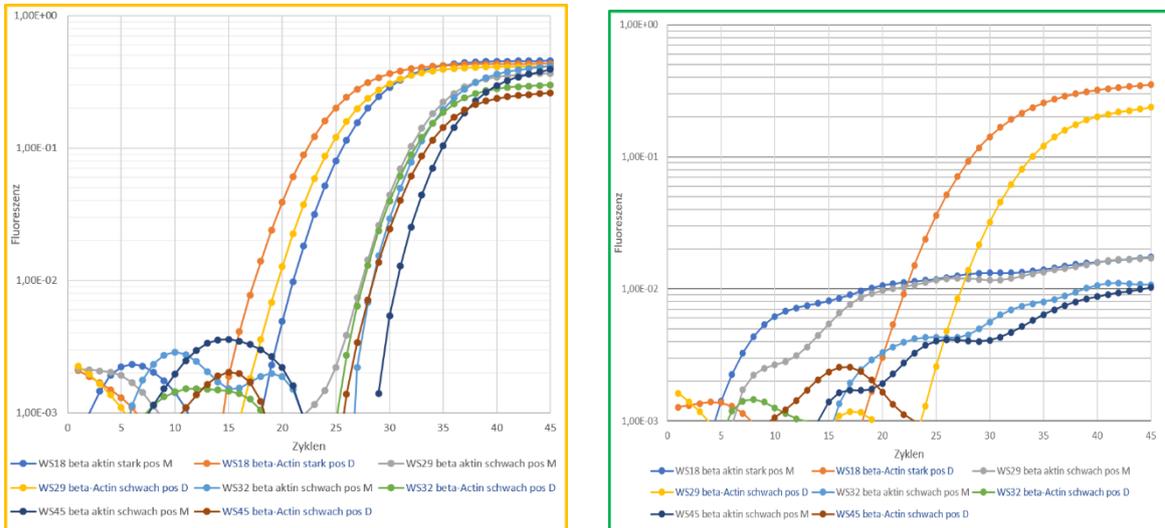
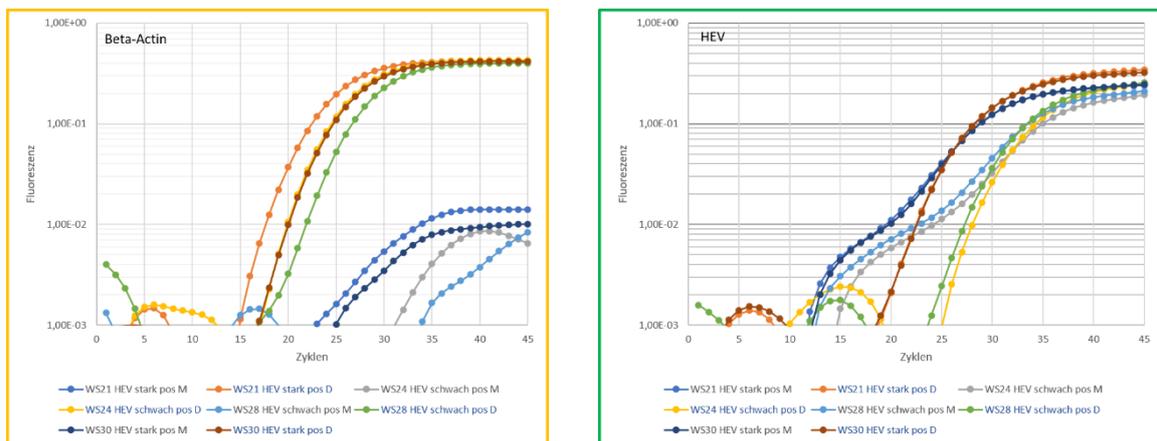


Tabelle 10: Gegenüberstellung der Ct-Werte von ausgewählten Wildschweinproben.

Probe	Ct-Wert β -Aktin Monoplex PCR	Ct-Wert β -Aktin Duplex PCR	Unterschied Ct- Wert Monoplex Duplex	Ct-Wert HEV Duplex PCR
WS18 β -Aktin stark positiv	22,92	19,36	3,56	29,16
WS29 β -Aktin schwach positiv	29,92	21,47	8,45	34,99
WS32 β -Aktin schwach positiv	30,89	29,36	1,53	-
WS45 β -Aktin schwach positiv	32,54	30,31	2,23	-

Abbildung 7: Vergleich der Ergebnisse der HEV-Monoplex PCR (M) mit dem HEV-Signal in der HEV β -Aktin Duplex-PCR (D). Jeweils zwei stark bzw. schwach HEV positive Wildschweinproben aus dem Feldmaterial wurden in beiden PCRs analysiert. Das Signal im gelben Kanal, das durch das spektrale Überlappen des HEV-Signals aus dem grünen Kanal in der Monoplex-PCR hervorgerufen wurde, ist mit dargestellt, um die Höhe des unspezifischen Signals im gelben Kanal abschätzen zu können. Die grün umrahmte Grafik zeigt das HEV-Signal und die gelb umrahmte Grafik das β -Aktin Signal.

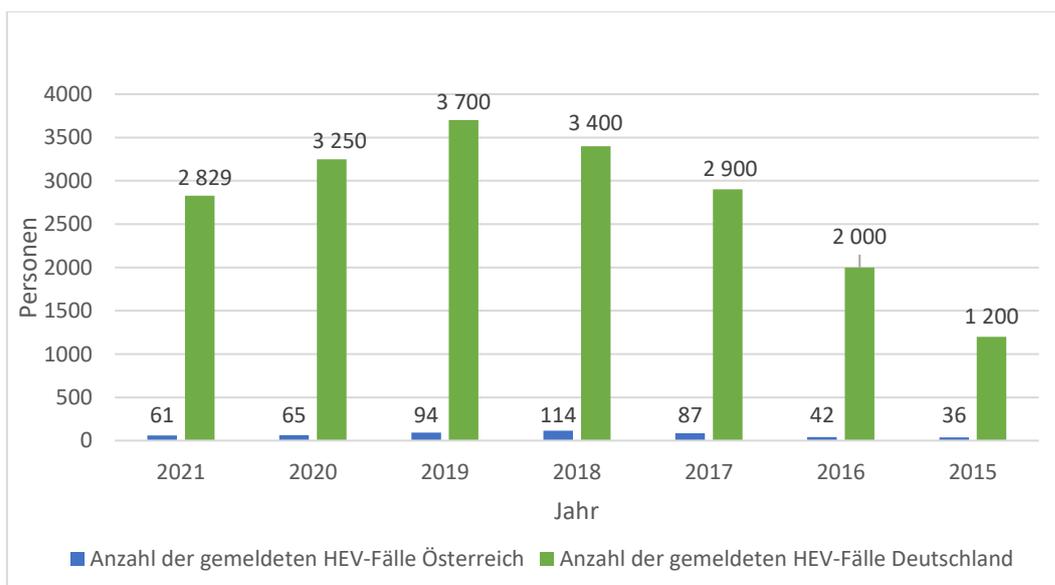


Nach dem Signalvergleich von β -Aktin zwischen Monoplex und Duplex RT-qPCR wurden im nächsten Versuch die Signale zwischen der HEV-Monoplex und Duplex RT-qPCR verglichen. Hierzu wurden wieder Wildschweinproben ausgewählt, die entweder HEV stark oder schwach positiv getestet wurden. Aus Abbildung 7 geht hervor, dass die Kurven des HEV-Signals in beiden PCRs ab einem Fluoreszenzsignal von größer 10^{-2} vergleichbar verlaufen. Unter einem HEV-Fluoreszenzsignal von 10^{-2} ist die Kurve in der Monoplex-PCR im Vergleich zur Duplex-PCR stark abgeflacht. Im β -Aktin Kanal zeigt sich, dass auch Signale durch die Monoplex-HEV-PCR, die eigentlich nur im grünen Kanal nachgewiesen werden sollten, nachgewiesen werden können. Diese liegen jedoch mehr als zehnfach niedriger als die spezifischen β -Aktin Signale und sollten daher keine starke Relevanz für eine Verfälschung eines realen β -Aktin Signals haben.

4 Diskussion

Innerhalb der letzten Jahre ist die Anzahl an Hepatitis E-Erkrankungen bei Menschen in Europa beträchtlich gestiegen (27). Eine Studie aus dem Jahr 2012, in der 4,422 Proben untersucht wurden, konnte in Deutschland eine HEV-Seroprävalenz in der humanen Population von 16,8 % bestimmen. Dabei wurden altersspezifische Unterschiede festgestellt. Bei etwa 5 % der Personen unter 30 Jahren konnten Antikörper gegen HEV nachgewiesen werden, während es bei den über 60-Jährigen 25 % waren (28). Im Jahr 2021 wurden laut der Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten des Bundesministeriums für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz in Österreich 61 Fälle mit Hepatitis E bestätigt, siehe Abbildung 8. Die meisten Fälle innerhalb Österreichs wurden 2018 nachgewiesen (29). Dieser Anstieg an Fallzahlen ist wahrscheinlich nicht auf eine tatsächliche Steigerung der Hepatitis E-Fälle, sondern auf eine erhöhte Aufmerksamkeit der Ärzte, sowie den häufigeren Einsatz von sensitiveren diagnostischen Tests zurückzuführen (30). Die meisten Fälle sind auf lebensmittelbedingte Infektionen zurückzuführen, verursacht durch die zoonotischen HEV Genotypen HEV-3 und HEV-4. Verantwortlich dafür sind vor allem rohe oder unzureichend erhitzte Schweinefleischprodukte, durch deren Verzehr das Virus von Haus- und Wildschweinen auf den Menschen übertragen werden kann (27). Aufgrund dieser Tatsache ist es von großer Bedeutung, ein sicheres Verfahren zum Nachweis von HEV-spezifischen Nukleinsäuren zu entwickeln.

Abbildung 8: Vergleich der gemeldeten HEV-Fälle in Österreich und Deutschland im Zeitraum 2015-2021 (29–38).



Der Vorteil der RT-qPCR nach Jothikumar et al. (2006) im Vergleich zu anderen Methoden ist, dass die HEV-Genotypen (HEV-1 bis HEV-4) zuverlässig nachgewiesen werden können (24). Die Entwicklung einer RT-qPCR zur Detektion aller HEV-Genotypen ist aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Genotypen sehr komplex. Die bereits bestehenden Assays unterscheiden sich im Hinblick auf die Sensitivität signifikant, was vorrangig auf die verwendete Zielsequenz und die genetische Diversität des Hepatitis-E-Virus zurückzuführen ist (39). Mokhtari et al. haben 2017 im Rahmen einer Studie verschiedene RT-qPCR Assays zum Nachweis von HEV-RNA miteinander verglichen und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass der Assay von Jothikumar et al. aus dem Jahr 2006 derzeit die zuverlässigste Methode zum Nachweis von HEV-RNA darstellt (39). Das liegt daran, dass die Sequenzen der hierbei verwendeten TaqMan® Assay Sonden und Primer bei allen HEV-Genotypen in der ORF 3-Region hochkonserviert sind und sich aus diesem Grund am besten als Zielsequenz für den Nachweis von HEV eignen (24). Für die Versuche, die im Zuge dieser Arbeit gemacht wurden, wurde ein RT-qPCR Protokoll nach Jothikumar et al. (2006) verwendet, weil es sich derzeit um die sensitivste und spezifischste Methode zum Nachweis von HEV-spezifischer RNA handelt und damit Optimierungs- und Validierungsversuche durchgeführt. Es wurde zunächst anhand eines Triplikatansatz mit einem generierten HEV-Plamidstandard beurteilt, inwiefern sich die Monoplex und Duplex RT-qPCR (inklusive β -Aktin-Nachweis) voneinander unterscheiden und welche Auswirkungen das Vorhandensein von β -Aktin auf die Sensitivität beider Verfahren hat. Um falsch negative Ergebnisse – bedingt z.B. durch inhibitorische Substanzen im Nukleinsäureextrakt oder ineffiziente Nukleinsäureextraktion – auszuschließen, ist es in der molekularen Diagnostik sinnvoll und üblich, eine interne Kontrolle mit zu amplifizieren. Hierzu wird im Rahmen des Extraktionsvorganges ein Targetmolekül zugesetzt oder auf ein Molekül zurückgegriffen, welches in diagnostischen Probenmaterialien ohnehin vorhanden ist. Lässt sich diese interne Kontrolle in einer separaten PCR nachweisen, kann ein negatives Ergebnis der PCR des nachzuweisenden Pathogens auch tatsächlich als negativ angenommen werden. In unserem Fall nutzten wir als interne Kontrolle β -Aktin. Das nachzuweisende Pathogen – in unserem Fall HEV – und die interne Kontrolle können in Einzelreaktionen (Monoplex RT-qPCRs) oder auch als Duplex RT-qPCR in einer Reaktion amplifiziert werden. Allerdings ist durch die erhöhte Anzahl von Sonden und Primern in dem Reaktionsgemisch der Duplex-PCR die Wahrscheinlichkeit höher, dass es zu ungewünschten Interaktionen zwischen den einzelnen Reaktionsbestandteilen kommt.

Multiplex-PCRs basieren auf der Detektion unterschiedlich markierter Sonden, deren emittierte Fluoreszenz bei deren Zerfall bzw. Abbau im Rahmen der Polymerase-Aktivität in unterschiedlichen Farbspektren gemessen werden kann. Da es bei den Messungen zu spektralen Überlappungen der Fluoreszenzsignale kommen kann oder die verschiedenen Sonden und Primerpaare miteinander interagieren bzw. um Bestandteile des Reaktionsgemisches konkurrieren können, ist eine sorgfältige Evaluierung dieser Interaktionen bei der Etablierung und Validierung einer neuen Duplex-PCR von großer Wichtigkeit. Im Zuge dieser Arbeit wurde festgestellt, bei welcher Annealingtemperatur die Duplex RT-qPCR am besten funktioniert, wie empfindlich das Verfahren tatsächlich ist (Sensitivitätsbestimmung) und inwiefern das HEV-Signal und das β -Aktin-Signal einander beeinflussen. Um die notwendigen Evaluierungen durchführen, wurde zunächst ein Plasmidstandard generiert und anschließend mit den Versuchen begonnen. Für die Temperaturoptimierung wurden sowohl die Monoplex als auch die Duplex-PCR mit 55 °C und mit 60 °C getestet. Dabei stellte sich heraus, dass eine Annealingtemperatur von 55 °C besser geeignet ist, um HEV-RNA in Kombination mit β -Aktin nachzuweisen. Das kann auf die Schmelztemperatur der Primer zurückzuführen sein. Bei einer zu hohen Annealingtemperatur ist die Hybridisierung mit der Zielsequenz nicht effizient genug und die Ausbeute an PCR-Produkten wesentlich geringer. Dies kann sich wiederum negativ auf die Sensitivität der Reaktion auswirken.

Danach wurde eine Sensitivitätsbestimmung mit einem Triplikatansatz durchgeführt, um das Detektionslimit der PCR bestimmen zu können und um besser zu beurteilen, ab wann eine Probe als positiv erkannt wird und ab wann sie als fraglich bzw. negativ gilt.

Dazu wurde eine Verdünnungsreihe, die 10^0 bis 10^8 Kopien des DNA-Standards in der Reaktion enthält, angefertigt und ein definiert β -Aktin positives, HEV negatives Extrakt hinzugefügt, um möglichst ähnliche Bedingungen wie in dem Feldmaterial zu schaffen. Bis zu 10^1 GE konnten in der Reaktion alle Replikate nachgewiesen werden. Bei 10^0 waren nur noch zwei der drei Replikate nachweisbar. Darüber hinaus wurde bemerkt, dass das Vorhandensein des HEV-Standards keinen Einfluss auf das β -Aktin-Signal hat, was in einer anderen Studie mit ähnlichen Rahmenbedingungen belegt werden konnte (40).

Im nächsten Versuch wurde der Einfluss von β -Aktin auf HEV anhand eines Triplikatansatz untersucht. Im Unterschied zum vorherigen Experiment wurde hier keine definierte Menge β -Aktin hinzugefügt. Besonders bei den Proben, die nur geringe HEV-Konzentrationen enthielten wurde gezeigt, dass die Ct-Werte des HEV-Signals jener Reaktionen, denen β -Aktin

beigemengt wurde niedriger waren, als bei denen, welchen kein β -Aktin zugesetzt wurde. Außerdem konnten ohne β -Aktin nur mehr zwei von drei Reaktionen nachgewiesen werden. Ursachen für dieses Phänomen können Pipettierfehler oder die inhomogene Verteilung des Plasmids in der Lösung oder auch eine Erhöhung des HEV-Signals durch spektrales Überlappen mit dem β -Aktin Signal sein. Infolgedessen sollten schwach positive HEV-Signale bei einem stark positiven β -Aktin-Signal kritisch beurteilt werden und es wurde eine Nachweisgrenze von 10^2 GE/ Reaktion festgelegt. Das ergibt bei entsprechender Umrechnung 50 000 GE/ ml Probenlysat.

Um die HEV- β -Aktin-Duplex RT-qPCR auch im Rahmen der Untersuchung von Feldproben zu evaluieren, wurden ausgewählten Wildschweinproben in der Monoplex RT-qPCR für β -Aktin und HEV und der Duplex RT-qPCR miteinander verglichen. Es wurden die HEV-Standards 10^7 bis 10^5 , denen zuvor β -Aktin zugesetzt wurde, für die Quantifizierung der Proben herangezogen, um die Viruslast bestimmen zu können. Die Ergebnisse der Duplex und Monoplex-PCR wurden gegenübergestellt. Ersichtlich war, dass die Proben, die in der Duplex-PCR liefen, deutlich geringere Ct-Werte für β -Aktin aufweisen, als jene Proben in der Monoplex-PCR. Dieses Resultat war überraschend, da im Rahmen der Sensitivitätsbestimmung der PCR kein Einfluss des HEV-Signals auf die Höhe des β -Aktin Signals festgestellt werden konnte. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem beobachteten Ergebnis um Ungenauigkeiten beim Pipettieren der Probe. Die Möglichkeit, dass das HEV-Signal das β -Aktin-Signal beeinflusst, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, vor allem wenn es sich um schwache β -Aktin Signale handelt. Daher sollten weitere Versuche mit Feldmaterial durchgeführt werden, um zu definieren, ob spektrales Überlappen oder Pipettierfehler für das beobachtete Phänomen verantwortlich sind. Bei der Analyse des β -Aktin-Signals haben zwei Feldproben kein positives β -Aktin Signal gezeigt, was auf das Vorhandensein von Hemmstoffen hindeuten kann. Um dies auszuschließen, wurden die Extrakte verdünnt und wiederholt untersucht. β -Aktin war nun nachweisbar. Bei der Verdünnung von Extrakten werden allerdings nicht nur etwaige Hemmstoffe ausverdünnt, sondern auch das nachzuweisende Pathogen. Daher ist der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung positiver Ergebnisse zu berücksichtigen.

Die Untersuchung der Feldproben ergab, dass in 14 Proben HEV-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnten. Für die Bestimmung der Viruskonzentration wurde eine untere Nachweisgrenze für HEV von 100 GE/ μ l Extrakt festgelegt. Es lagen zwei der positiv auf HEV getesteten Wildschweinproben unter dieser Nachweisgrenze und wurden somit als fraglich

beurteilt. Es wurde also in 12 von 45 getesteten Wildschweinproben Hepatitis E-spezifische Nukleinsäuren sicher nachgewiesen. Daher kann von einer HEV-Prävalenz von 26,6% in diesem geschlossenen Wildtierbestand ausgegangen werden.

Weitere Studien von HEV bei Wildschweinen im europäischen Raum berichten von vergleichbaren Prävalenzen. Die Studie von Rivero-Juarez et al. (41) aus dem Jahr 2018 hat 142 Wildschweine aus 12 Jagdgebieten in Südspanien mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von HEV getestet. Davon wurde bei 33 Tieren HEV nachgewiesen. Die Prävalenz beträgt 23,2% und war von Oktober bis November am höchsten und im Dezember am niedrigsten. Interessanterweise scheint die Prävalenz stark abhängig von der Jahreszeit zu sein (41). Die von uns verwendeten Proben wurden im Oktober und November entnommen. Verschiedene Studien innerhalb Deutschlands berichten von einer variablen Prävalenz von HEV in Wildschweinen. Eine Studie aus Norddeutschland veröffentlichte eine HEV-Prävalenz von 5,3% (42), während die im Zentrum Deutschlands bei 15,2% lag (43). In anderen Regionen Deutschlands (Brandenburg, Sachsen, Rheinland-Pfalz, Baden-Württemberg) wurde eine Prävalenz von 68% bestimmt (40). In dieser Studie wird vor allem auf die unterschiedliche geografische Verbreitung hingewiesen. In manchen Bundesländern war die Prävalenz sehr hoch (57,6%-100%) während nur 22% der Tiere aus Baden-Württemberg positiv auf HEV getestet wurden (40). Diese unterschiedlichen Werte können verschiedene Ursachen haben wie verwendetes Probenmaterial, Alter der Tiere, Populationsdichte und Kontakt zu anderen domestizierten und freilebenden Tierspezies (44).

Die Bestimmung der Viruslast innerhalb der Gewebeproben ist eine wichtige Voraussetzung um eine Infektion mit HEV nachzuweisen und zu quantifizieren. Infolgedessen wurde die durch unsere Versuche ermittelte Viruskonzentration im positiv getesteten Feldmaterial mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen. Luca de Sabato et al. hat 2018 (44) im Rahmen einer Studie während der Jagdsaison Oktober 2016 bis Januar 2017 Wildschweine aus unterschiedlichen Jagdgebieten im Zentrum Italiens beprobt. Es wurde Lebergewebe von insgesamt 92 Tieren verwendet, um die Prävalenz von HEV in diesem Jagdgebiet zu bestimmen. Dafür wurde ebenfalls das RT-qPCR Protokoll nach Jothikumar et al. (2006) (24) verwendet. Alle Proben, die einen CT-Wert über 39 hatten, oder nicht nachweisbar waren, wurden als negativ bewertet. Das Detektionslimit wurde mit 14 GE/ μ l kalkuliert. Diese Untersuchung ergab eine Prävalenz von 52,2 %, der Mittelwert der Viruslast lag bei 10^7 GE/g. Alter und Geschlecht der Tiere wurden bei dieser Studie nicht berücksichtigt. Im Vergleich dazu wurde die Studie von Adlhoch et al. aus dem Jahr 2009 gegenübergestellt (40). Hier wurden

für die Quantifizierung der Viruslast 16,7% der beprobten Tiere mit Ct-Werten unter 30 verwendet. Das entspricht $> 10^5$ GE in 1 ml Galle oder Serum oder $>10^6$ /g Leber. 33,3% der pos. Tiere waren < 1 Jahr alt, 17,4% zwischen 1-2 Jahren und 25% adult. Die höchsten Viruskonzentrationen konnten dabei in Leber und Gallenflüssigkeit detektiert werden. Es wurde in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und einer Infektion mit HEV festgestellt (40). Anschließend wurden die Resultate dieser Studien mit unseren Ergebnissen verglichen. Die von uns bestimmten HEV-Konzentrationen lagen zwischen 10^4 GE/ml Lysat und 10^6 GE/g Gewebe, der Mittelwert der Ct-Werte unserer positiv auf HEV getesteten Proben lag bei 28,6. Das entspricht ähnlichen Werten wie jenen in den zuvor genannten Studien von Adlhoch et al. (40) und Luca de Sabato et al. (44).

Sechs Wildschweine, die in dieser Arbeit positiv auf HEV getestet wurden, waren juvenil und männlich. Das entspricht 50 % der insgesamt positiv auf HEV getesteten Feldproben innerhalb dieser Untersuchungsgruppe. Infolgedessen wurden diese Ergebnisse mit anderen Studien verglichen, um herauszufinden, ob das Alter und das Geschlecht der Tiere mit der HEV-Prävalenz korreliert sind. Bei der Untersuchung von Proben einer Studie aus Spanien stellte sich heraus, dass weder das Alter, noch das Geschlecht einen Einfluss auf das Vorhandensein einer Infektion mit HEV hatten (41). Di Bartolo et al. (2008) (45) hingegen fand, dass das Alter der Tiere sehr wohl einen Einfluss auf eine Infektion mit HEV haben kann. Dafür wurden 274 zufällig ausgewählte Schweine von 6 verschiedenen Schweinefarmen in Norditalien auf das Vorhandensein von HEV getestet. Die Prävalenz von HEV war bei drei bis vier Monate alten Tieren höher (42,2%), als bei acht bis neun Monate alten Tieren (27%). Vorangegangenen Studien bestätigen, dass HEV-RNA vor allem in zwei bis fünf Monate alten Schweinen nachgewiesen werden kann, während Tiere, die jünger sind als zwei Monate für gewöhnlich negativ sind. Der Schutz der maternalen Antikörper, der ungefähr zwei Monate andauert und das Auftreten einer HEV-Infektion im Alter von zwei bis drei Monaten, verdeutlichen die Tatsache, dass sich die Tiere nach dem Absinken der maternalen Immunität durch engen Kontakt mit Artgenossen mit HEV infizieren (20,21). Eine Virämie findet ein bis zwei Wochen nach der Infektion statt, die Virusausscheidung dauert drei bis vier Wochen mit anschließender Serokonversion (20). Deswegen erwartet man von jenen Tieren, die älter sind als sechs bis acht Monate, dass sie eine bereits ausgeheilte Infektion mit HEV durchgemacht haben (45). Unsere Ergebnisse scheinen mit diesem Infektionsmuster übereinzustimmen, denn der Großteil (6 Tiere) der von uns im Rahmen dieser Arbeit positiv auf HEV getesteten

Wildschweine waren juvenil und männlich. Vorangegangene Studien berichten, dass das Geschlecht keinen Risikofaktor für eine Infektion mit HEV darstellt (41,46).

Bei der Interpretation der durch diese Diplomarbeit erhobenen Daten sollte berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um eine geschlossene Wildtierpopulation handelt und man anhand dieser Resultate keine Rückschlüsse auf die Prävalenz von tatsächlich freilebenden Wildschweinen in Österreich schließen kann. Die Anzahl der beprobten Tiere, sowie die Fütterung und Beobachtung des Bestands durch Jäger sind ebenfalls Faktoren, die bei der Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden sollten. Außerdem ist der Aufenthaltsort dieser Tiere räumlich begrenzt und die Vermutung, dass die untersuchten Tiere wahrscheinlich mehr Kontakt untereinander haben, als tatsächlich freilebende Wildschweine, ist ebenso miteinzubeziehen. Nichtsdestotrotz stellen diese Resultate eine gute Grundlage dar, um die Verbreitung von HEV innerhalb einer geschlossenen Wildtierpopulation zu monitorieren. Inwiefern man davon auf die Verbreitung von HEV innerhalb von ganz Österreich schließen kann, bleibt allerdings noch Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

5 Abstract

Das Hepatitis-E-Virus hat in den vergangenen Jahren an Bedeutung als Erreger viraler Hepatitiden in Europa gewonnen. Eine der häufigsten Ursachen für die steigende Anzahl an gemeldeten Infektionen mit Hepatitis E ist der Verzehr von nicht ausreichend erhitzten Schweinefleischprodukten. Haus – und Wildschweine gelten als Hauptüberträger von HEV auf den Menschen. Sie übertragen den zoonotischen Genotyp 3, der in Westeuropa für die meisten Infektionen mit Hepatitis E verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Optimierungs- und Validierungsversuche für eine Duplex RT-qPCR zum Nachweis von Hepatitis E und β -Aktin (interne Kontrolle) durchgeführt und danach die Viruslast in Wildschweinproben bestimmt. Zunächst wurde ein Hepatitis E-Plasmidstandard generiert und eine Mengenbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde durch eine Temperaturoptimierung die optimale Annealingtemperatur von 55 °C ermittelt. Dann wurde eine 10er Verdünnungsreihe hergestellt und im Triplikate angesetzt, um die Sensitivitätsbestimmung vorzunehmen. Der nächste Schritt war herauszufinden, welche Auswirkungen das Vorhandensein von Hepatitis-E-Virus Genom auf den β -Aktin Nachweis hat und umgekehrt. Im Anschluss an diese Versuche wurden 45 Wildschweinproben mit der Duplex RT-qPCR auf Hepatitis E untersucht. Es konnten in 14 Proben Hepatitis-E-Virus spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze der RT-qPCR wurde auf Grund der Sensitivitätsbestimmung auf 100 GE/Reaktion festgelegt. Das entspricht einer Viruslast von 5×10^4 GE/ml Probenlysat bzw. 5×10^6 GE/g Gewebe. Zwei Proben lagen unter dieser Nachweisgrenze und wurden als fraglich beurteilt. Die Prävalenz der positiv getesteten Feldproben wurde auf 26,6 % geschätzt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hepatitis E in einem österreichischen geschlossenen Wildtierbestand vor allem bei juvenilen und männlichen Wildschweinen verbreitet ist.

The hepatitis E virus has become increasingly important as a causative agent of viral hepatitis in Europe. One of the most common causes of the increasing number of reported hepatitis E infections is the consumption of undercooked pork products. Domestic pigs and wild boar are considered the main vectors of hepatitis E transmission to humans. As part of this diploma thesis, optimization and validation tests for a duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus and beta-actin were carried out and the viral load in wild boar samples was determined. First, a hepatitis E plasmid standard was generated and quantified. The optimal annealing temperature of 55 °C was then determined by temperature optimization. A dilution series of 10 was then prepared and set up in triplicate in order to determine the sensitivity. The next step

was to evaluate how the presence of hepatitis E virus genomes affects the β -actin signal and vice versa. Following these experiments, 45 wild boar samples were analyzed for the presence of hepatitis E virus using the duplex RT-qPCR. Hepatitis E virus-specific nucleic acids could be detected in 14 samples. The lower detection limit of the RT-qPCR of 100 GE/reaction was determined based on the results of the sensitivity determination in triplicate, and this is equal to 5×10^4 GE/mL sample lysat or 5×10^6 GE/g tissue. Two samples were below this detection limit and were judged as questionable. The prevalence of the positively tested field samples was 26,6%. In summary, it can be said that hepatitis E virus is particularly widespread in juvenile and male wild boars in a closed Austrian game population.

6 Literaturverzeichnis

1. Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Arbiza J, Gerona S. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* 2014 Jun;45.
2. Johne R, Althof N, Nöckler K, Falkenhagen A. Hepatitis E virus—a zoonotic virus: distribution, transmission pathways, and relevance for food safety. Vol. 65, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 202–8.
3. X-j M, der Poel WHM van, Souza de W, Yang X-L UR. Create two subfamilies (Orthohepevirinae, Parahepevirinae), four genera and five species, and rename five species (Hepelivirales: Hepeviridae). 2020.
4. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in developing countries. Vol. 8, *Viruses.* MDPI AG; 2016.
5. Wang B, Meng XJ. Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection. Vol. 59, *Current Opinion in Microbiology.* Elsevier Ltd; 2021. p. 8–15.
6. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):1044–8.
7. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, et al. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: Identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol.* 2011 Aug;156(8):1345–58.
8. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. Vol. 161, *Virus Research.* 2011. p. 47–58.
9. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. Vol. 27, *Clinical Microbiology Reviews.* 2014. p. 116–38.
10. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *J Virol.* 2009 Dec 15;83(24):12714–24.
11. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK. Hepatitis e virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat.* 2012 Jun;19(6):436–48.
12. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, et al. Hepatitis e virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: Characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr 1;48(4):1112–25.
13. Pallerla SR, Harms D, Johne R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, et al. Hepatitis e virus infection: Circulation, molecular epidemiology, and impact on global health. Vol. 9, *Pathogens.* MDPI AG; 2020. p. 1–21.
14. Velavan TP, Pallerla SR, Johne R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, et al. Hepatitis E: An update on One Health and clinical medicine. Vol. 41, *Liver International.* John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1462–73.

15. Pavio N, Doceul V, Bagdassarian E, Johne R. Recent knowledge on hepatitis e virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. Vol. 48, Veterinary Research. BioMed Central Ltd.; 2017.
16. Meng X jin, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus [Internet]. Vol. 94, Medical Sciences. 1997. Available from: www.pnas.org.
17. Schlosser J, Eiden M, Vina-Rodriguez A, Fast C, Dremsek P, Lange E, et al. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3 - Infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet Res*. 2014 Nov 26;45(1).
18. Jori F, Laval M, Maestrini O, Casabianca F, Charrier F, Pavio N. Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France. *Viruses*. 2016 Aug 20;8(8).
19. Mazzei M, Nardini R, Verin R, Forzan M, Poli A, Tolari F. Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Central Italy. *New Microbes New Infect*. 2015 Sep 1;7:41–7.
20. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV Brief Report. Vol. 143, *Arch Virol*. 1998.
21. Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, et al. DIFFERENT FECAL SHEDDING PATTERNS OF TWO COMMON STRAINS OF HEPATITIS E VIRUS AT THREE JAPANESE SWINE FARMS. 2006.
22. Thiry D, Rose N, Mauroy A, Paboeuf F, Dams L, Roels S, et al. Susceptibility of Pigs to Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Isolated from a Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Oct 1;64(5):1589–97.
23. Anheyer-Behmenburg HE, Szabo K, Schotte U, Binder A, Klein G, Johne R. Hepatitis E virus in wild boars and spillover infection in red and roe deer, Germany, 2013-2015. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jan 1;23(1):130–3.
24. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006 Jan 1;131(1):65–71.
25. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, de Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods*. 2007 Mar;140(1–2):115–23.
26. Auer A, Schweitzer L, Küber-Heiss A, Posautz A, Dimmel K, Seitz K, et al. Porcine Circoviruses and Herpesviruses Are Prevalent in an Austrian Game Population. *Pathogens*. 2022 Mar 1;11(3).
27. Pierini I, di Bartolo I, Manuali E, Pirani S, Bazzucchi M, Moscati L, et al. Hepatitis E virus (HEV) genotype 3 diversity: Identification of a novel HEV subtype in wild boar in Central Italy. *Transbound Emerg Dis*. 2021 Jul 1;68(4):2121–9.

28. Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Höhle M, Stark K. Hepatitis e virus seroprevalence among adults, germany. *Emerg Infect Dis.* 2012 Oct;18(10):1654–7.
29. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2018 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:e6c17476-27ac-4a80-ad5f-8b8b04b41284/jahresausweis_2018.pdf zuletzt aufgerufen am 10.09.2022 um 16 Uhr. 2018;
30. Koch-Institut R. Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Instituts Ausgabe 15/2015 https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/15_15.pdf?__blob=publicationFile zuletzt aufgerufen am 11.09.2022 um 7:30 Uhr. 2015.
31. Koch-Institut R. Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Instituts Ausgabe 1/2022 Seite 61 https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/Ausgaben/01_22.pdf?__blob=publicationFile zuletzt aufgerufen am 11.09.2022 um 8:17 Uhr [Internet]. 2022. Available from: www.rki.de/epidbull
32. Koch-Institut R. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020 https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile Seite 110 zuletzt aufgerufen am 11.09.2022 um 8 Uhr. 2020.
33. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2015 Stand 31.05.2016 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:54fe26be-6662-414a-a987-cc15bc4b35c5/Jahresausweis_2015.pdf zuletzt aufgerufen am 11.09.2022 um 7:30 Uhr. 2015.
34. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2016 Stand 30.04.2017 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:e3b4693b-e199-4d35-8486-4c33f9011054/Jahresausweis_2016.pdf zuletzt aufgerufen am 11.09.2022 um 7:30 Uhr. 2016.
35. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2017 Stand 06.09.2018 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:ed6a665b-c8a9-4bbf-9913-b294f309654d/jahresausweis_2017.pdf zuletzt aufgerufen am 10.09.2022 um 16 Uhr. 2017;
36. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht Meldepflichtiger Erkrankungen 2019 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:72bb448c-58d5-4666-969e-889732f3eef2/Jahresbericht_2019.pdf zuletzt aufgerufen am 10.09.2022 um 16 Uhr. 2019;
37. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht Meldepflichtiger Erkrankungen 2020 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:78379dff-05a2-466f-b2ae-b19bf3f077b3/Jahresbericht_2020.pdf zuletzt aufgerufen am 10.09.2022 um 16 Uhr. 2020;
38. Bundesministerium für Arbeit S und K. Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2021 Stand 20.05.2022 https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:789e0910-5bad-45ca-a42d-bc07c533fa5a/Surveillance_2021_Jahresstatistik.pdf zuletzt aufgerufen am 10.09.2022 um 16 Uhr. 2021;
39. Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukobza S, Jebblaoui A, Tessé S, Savary J, et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *Journal of Clinical Virology.* 2013 Sep;58(1):36–40.

40. Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G, et al. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol* [Internet]. 2009;139(4):270. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00526941>
41. Rivero-Juarez A, Rivalde MA, Frias M, García-Bocanegra I, Lopez-Lopez P, Cano-Terriza D, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: A possible seasonal pattern? *BMC Vet Res*. 2018 Feb 27;14(1).
42. Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, Faber M, Schrader C, Dremsek P, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: A cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*. 2015 Oct 22;15(1).
43. Kaci S, Nöckler K, Johne R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol*. 2008 Apr 30;128(3–4):380–5.
44. de Sabato L, Ostanello F, de Grossi L, Marcario A, Franzetti B, Monini M, et al. Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Dec 1;65(6):1749–56.
45. di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, et al. Widespread Diffusion of Genotype 3 Hepatitis E Virus among Farming Swine in Northern Italy. *Veterinary Microbiology*. 2008;132(2):47. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00532421>
46. Weigand K, Weigand K, Schemmerer M, Müller M, Wenzel JJ. Hepatitis E Seroprevalence and Genotyping in a Cohort of Wild Boars in Southern Germany and Eastern Alsace. *Food Environ Virol*. 2018 Jun 1;10(2):167–75.

7 Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids „pEX-A128-HepE standard“ von der Firma Eurofins Genomics.....	12
Abbildung 2: Sensitivitätsbestimmung der HEV β -Aktin Duplex RT-qPCR.	17
Abbildung 3: Untersuchung der Auswirkung von β -Aktin auf die Detektionsschwelle von 10^0 bis 10^2 HEV Kopien in der Reaktion.....	19
Abbildung 4: Untersuchung der HEV-Prävalenz mit der entwickelten Duplex-PCR an Wildschweinproben.....	23
Abbildung 5: Wiederholung der Untersuchung auf HEV mittels Duplex-PCR an Proben, in denen zuvor kein β -Aktin in der PCR detektiert werden konnte.....	23
Abbildung 6: Vergleich der Ergebnisse der β -Aktin Monoplex-PCR (M) mit dem β -Aktin Signal in der HEV β -Aktin Duplex-PCR (D).	24
Abbildung 7: Vergleich der Ergebnisse der HEV Monoplex-PCR (M) mit dem HEV-Signal in der HEV β -Aktin Duplex-PCR (D).	26
Abbildung 8: Vergleich der gemeldeten HEV-Fälle in Österreich und Deutschland im Zeitraum 2015-2021	27
Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Wildtierproben.....	6
Tabelle 2: Verwendete Primer und Sonde zum Nachweis von HEV und β -Aktin.....	8
Tabelle 3: Verwendete Kits und Reagenzien.....	9
Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Herstellung des Mastermix für die HEV Monoplex RT-qPCR.....	10
Tabelle 5: Temperaturschema der HEV RT-qPCR und der HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR.	10
Tabelle 6: PCR Protokoll für die Herstellung des Mastermix für die HEV- β -Aktin Duplex RT-qPCR.....	11
Tabelle 7: Verdünnungsreihe des HEV-Standards.	18
Tabelle 8: Verdünnungsreihe des HEV-Standards. Das Plasmid pK289#2 wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^8 bis 10^0 als Triplikatanatz angefertigt und die Ct-Werte im gelben Kanal bestimmt.	20
Tabelle 9: Ct-Werte und GE/ μ l der positiv auf HEV getesteten Wildtierproben und berechnete HE-Viruslast in GE/ml Probe (Tupfer-/ Organlysat).	24
Tabelle 10: Gegenüberstellung der Ct-Werte von ausgewählten Wildschweinproben	25