

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs

Kommissarischer Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Erwin Märtlbauer

Angefertigt unter der Leitung von: PD Dr. Maria Fredriksson-Ahomaa

# **Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Hepatitis E Antikörpern aus Serum und Fleischsaft des Schweins**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Carolin Werres

aus Gräfelfing

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil Heinritzi

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Wir sollten darauf achten, einer Erfahrung nur so viel Weisheit zu entnehmen, wie in ihr steckt - mehr nicht; damit wir nicht der Katze gleichen, die sich auf eine heiße Herdplatte setzte. Sie setzt sich nie wieder auf eine heiße Herdplatte - und das ist richtig; aber sie setzt sich auch nie wieder auf eine kalte.

- Mark Twain -

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Das Hepatitis E Virus.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Geschichtliches.....	3
1.2.	Taxonomie und Virusgenom.....	4
<b>2.</b>	<b>Hepatitis E Infektion.....</b>	<b>7</b>
2.1.	Mensch .....	8
2.2.	Tier .....	10
2.3.	Immunprophylaxe .....	13
2.4.	Behandlung.....	13
<b>3.</b>	<b>Epidemiologie .....</b>	<b>14</b>
3.1.	Reservoir.....	14
3.1.1.	Schwein .....	14
3.1.2.	Andere Tierarten .....	15
3.2.	Übertragungswege.....	17
3.2.1.	Mensch .....	17
3.2.2.	Schwein .....	19
<b>4.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>20</b>
4.1.	Direkter Nachweis.....	20
4.2.	Indirekter Nachweis .....	21
4.2.1.	Serum .....	21
4.2.2.	Fleischsaft.....	23
<b>5.</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b>Line Assay .....</b>	<b>28</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>Material.....</b>	<b>32</b>
7.1.	ELISA.....	32
7.2.	Line Assay.....	32
7.3.	Validierung und Prävalenz .....	33
7.3.1.	Material für Validierung.....	33

7.3.2.	Material für Prävalenz .....	33
<b>8.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>35</b>
8.1.	Testeinstellung .....	36
8.1.1.	ELISA.....	36
8.1.1.1.	<i>recomWell</i> HEV pig.....	36
8.1.1.1.1.	Beschichtung der Mikrotiterplatten.....	36
8.1.1.1.2.	Anti-Spezies-Konjugat .....	37
8.1.1.2.	Probenmaterial .....	37
8.1.1.3.	Weitere Testkomponenten.....	37
8.1.2.	Line Assay.....	38
8.1.2.1.	<i>recomLine</i> HEV IgG .....	38
8.2.	Testdurchführung .....	39
8.2.1.	ELISA.....	39
8.2.1.1.	<i>recomWell</i> HEV pig.....	39
8.2.1.2.	Axiom HEV Ab.....	40
8.2.2.	Line Assay.....	41
8.2.2.1.	<i>recomLine</i> HEV IgG .....	41
8.3.	Testauswertung.....	42
8.3.1.	ELISA.....	42
8.3.1.1.	<i>recomWell</i> HEV pig.....	42
8.3.1.1.1.	Qualitative Auswertung.....	42
8.3.1.1.2.	Quantitative Auswertung.....	43
8.3.1.2.	Axiom HEV Ab.....	43
8.3.2.	Line Assay.....	44
8.3.2.1.	<i>recomLine</i> HEV .....	44
<b>9.</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>45</b>
9.1.	Validierung des Testverfahrens.....	45
9.1.1.	Sensitivität und Spezifität.....	45
9.1.2.	Linearität .....	47
9.1.3.	Mikrotiterplattenvarianz (MTP-Varianz).....	47
9.1.4.	Interassayvarianz .....	48
9.1.5.	Intrachargenvarianz .....	48
9.1.6.	Interchargenvarianz .....	49
9.2.	Prävalenzstudie.....	49

<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>Testeinstellung .....</b>	<b>52</b>
10.1.	<i>recomWell</i> HEV pig.....	52
10.1.1.	Beschichtung der Mikrotiterplatten.....	52
10.1.2.	Anti-Spezies Konjugat .....	55
10.1.3.	Probenmaterial .....	55
<b>11.</b>	<b>Testauswertung.....</b>	<b>56</b>
11.1.	<i>recomLine</i> HEV .....	56
<b>12.</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>57</b>
12.1.	Validierung des Testverfahrens.....	57
12.1.1.	Sensitivität und Spezifität.....	57
12.1.1.1.	Vergleich <i>recomWell</i> HEV Pig IgG Serum und Fleischsaft.....	59
12.1.2.	Linearität .....	60
12.1.3.	Mikrotiterplattenvarianz.....	62
12.1.4.	Interassayvarianz .....	64
12.1.5.	Intrachargenvarianz .....	66
12.1.6.	Interchargenvarianz .....	68
12.2.	Prävalenzstudie.....	68
12.2.1.	Prävalenz für anti-HEV .....	68
12.2.2.	Daten bezogen auf Schlachthöfe .....	69
12.2.3.	Daten bezogen auf Mäster .....	70
12.2.4.	Logistische Regression.....	72
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>79</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>80</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>93</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alanin-Aminotransferase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENANB	Enterically transmitted non-A non-B hepatitis
FHF	fulminant hepatic failure
FS	Fleischsaft
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HEV	Hepatitis E Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>engl.</i> horseradish-peroxidase)
ICV	Intrachargenvarianz
IEM	Immunelektronenmikroskopie
kb	Kilo-Basenpaare
min	Minuten
MTP	Mikrotiterplatte
OD	Optische Dichte ( <i>engl.</i> optical density)
ORF	Offenes Leseraster ( <i>engl.</i> open reading frame)
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PRRS	Seuchenhafter Spätabort des Schweines ( <i>engl.</i> porcine reproductive and respiratory syndrome)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert-Koch-Institut
RT-PCR	Reverse transkriptase PCR
s	Sekunden
S/N	Signal-zu-Rauschen Verhältnis ( <i>engl.</i> signal-noise-ratio)
SD	Standardabweichung
SPF	Spezifisch pathogenfrei
TMB	Tetramethylbenzidin
VK	Variationskoeffizient

## I. EINLEITUNG

Virusbedingte Hepatitiden stellen ein weltweit verbreitetes Gesundheitsrisiko dar, welches sowohl in Entwicklungsländern, als auch in Industriestaaten eine wesentliche Rolle spielt (Panda et al., 2007). Der wichtigste Erreger sogenannter Non-A-non-B-Hepatitiden, also Leberentzündungen, die *nicht* durch den Erreger von Hepatitis A bzw. B verursacht werden, ist das Hepatitis E Virus (HEV). In Ländern mit mangelnden hygienischen Bedingungen ist Hepatitis E klassischerweise als fäkal-oral über das Wasser übertragene, in Epidemien auftretende Erkrankung bekannt, die bis vor einigen Jahren in unseren Breitengraden nur im Zusammenhang mit Reisen in endemische Gebiete auftrat. In letzter Zeit mehren sich allerdings die Beweise, dass auch eine autochthone, reiseunabhängige Form in unseren Regionen existiert. Da in unseren Gebieten die Hygienestandards sehr hoch sind, erscheint eine Infektion über das Trinkwasser sehr unwahrscheinlich.

Aber auf welchem Wege wird Hepatitis E in Industrieländern dann übertragen? Hier sorgt die Hypothese eines zoonotischen Potenzials von HEV für viel Diskussionsstoff. Insbesondere das Schwein ist als Reservoir für HEV im Gespräch, und so scheint eine Ansteckung durch den Verzehr von Rohwurstprodukten bzw. unzureichend gegartem Fleisch oder Innereien möglich zu sein (Banks et al., 2004; Di Bartolo et al., 2008; Feagins et al., 2007; Herremans et al., 2007; Meng et al., 1997). In einer aktuellen Veröffentlichung wurde bei dem Mitarbeiter eines Schlachthauses Hepatitis E diagnostiziert (Adlhoch et al., 2009b). In der darauf erfolgten Sequenzanalyse zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung des Genoms mit humanen und porcinen Isolaten aus Spanien, Frankreich und den Niederlanden. Aufgrund der Tätigkeit des Spenders liegt die Vermutung nahe, dass das krankheitsauslösende Virus seinen Ursprung im Schwein hatte (Adlhoch et al., 2009a). Zu einer ähnlichen Erkenntnis kamen Autoren in einer Studie zu Personen mit regelmäßigem Kontakt zu Schweinen (Chang et al., 2009).

Somit besteht ein Bedarf an einfachen und zuverlässigen Screening-Methoden zur Evaluierung des Ansteckungsrisikos für den Menschen durch den Kontakt zu bzw. Verzehr von Schlachtschweinen. In diesem Zusammenhang ist die



Verwendung von Fleischsaft als im Rahmen der Salmonellendiagnostik bereits vorhandenes Probenmaterial besonders hervorzuheben. Weiterhin gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine Seroprävalenzdaten zu HEV beim Schlachtschwein in Deutschland. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit neben der Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von HEV-Antikörpern aus Serum und Fleischsaft des Schweins auch die Prävalenz von anti-HEV-IgG und IgM beim Schlachtschwein untersucht werden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Das Hepatitis E Virus**

#### **1.1. Geschichtliches**

Bis zum Ende der siebziger Jahre wurden alle Hepatitis-Epidemien, die über das Wasser übertragen wurden, der Hepatitis A zugeordnet. Erst in einer 1980 veröffentlichten retrospektiven Studie mit konservierten Patientenserum, die von einer Hepatitis-Epidemie in Delhi / Indien aus dem Jahre 1955-56 stammten, fand man heraus, dass die Ursache für jene Erkrankungswelle, die infolge einer Überschwemmungskatastrophe aufgetreten war, weder das Hepatitis A- noch das Hepatitis B-Virus war. Man postulierte einen über den Darm übertragenen non-A, non-B-Hepatitis-Erreger (Wong et al., 1980). Doch erst 1983 gelang der direkte Nachweis im Immunelektronenmikroskop bei einem non-A non-B-Hepatitis-Patienten, sowie die Übertragung des nachgewiesenen Agens auf Menschen und Primaten (Balayan et al., 1983). Dieses Virus wurde zunächst als enterically transmitted non-A non-B Hepatitis Virus (ET-NANB) bezeichnet. 1988 wurde eine Studie über virusähnliche Partikel, die aus dem Stuhl dreier an ET-NANB erkrankten Probanden gewonnen worden waren, veröffentlicht (Bradley et al., 1988). Diese wiesen eine Größe von 32 nm auf, und zeigten spezifische Bindungsreaktionen mit Antikörpern aus dem Serum anderer Fälle von ET-NANB aus Asien, der Sowjetunion, Nordafrika und Nordamerika. Primaten wurden mit dem Erreger infiziert und zeigten eine deutliche Serokonversion. Dies ließ den Schluss zu, dass ET-NANB in der Hauptsache durch ein Virus oder eine Virusklasse verursacht wird (Bradley et al., 1988). 1990 konnten dann erstmals Teile des Genoms geklont und sequenziert werden (Reyes et al., 1990). In einer Studie zur Seroepidemiologie des neuentdeckten Erregers wiesen die Autoren nach, dass 16 von 17 wasserübertragene Hepatitis-Epidemien durch ET-NANB verursacht wurden (Arankalle et al., 1994).

Erste Erkenntnisse über die Empfänglichkeit von Schweinen für HEV wurden 1990 bekannt (Balayan et al., 1990). Nur ein Jahr später gelang die experimentelle Infektion von Schweinen mit virusähnlichen Partikeln (*engl.* virus-like particles, VLP's), die von einem Hepatitis E Ausbruch in der ehemaligen UdSSR stammten (Usmanov et al., 1991). Eine Übertragung von Schwein zu Schwein nach oraler

und / oder intravenöser Infektion konnte ebenfalls beobachtet werden. 1993 kam erstmals die mögliche Beteiligung von Nagern an der Ausbreitung von HEV ins Gespräch (Karenyi et al., 1993).

Der Gedanke an ein zoonotisches Potenzial von HEV wurde Mitte bis Ende der neunziger Jahre erstmals aktuell, als eine enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen humanen und porcinen HEV-Stämmen nachgewiesen werden konnte (Meng et al., 1997). Eine Vielzahl an Studien beschäftigen sich bis heute mit ebendieser Thematik, mit dem Ziel, das Risiko einer zoonotischen Übertragung des Virus auf den Menschen einschätzen und im Zweifelsfall eindämmen zu können.

## 1.2. Taxonomie und Virusgenom

Das HEV wird erst seit Kurzem taxonomisch in eine eigene Familie – die der *Hepeviridae* – mit dem Genus *Hepevirus* - eingeordnet (Panda et al., 2007). Es handelt sich um ein einzelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus mit positiver Polarität. Der Durchmesser des Virions beträgt 27-34 nm. In der elektronenmikroskopischen Darstellung zeigen sich sphärische Partikel, deren Oberflächenstruktur denen der Caliciviren ähnelt (Abbildung 1) (Previsani and Lavanchi, 2001).

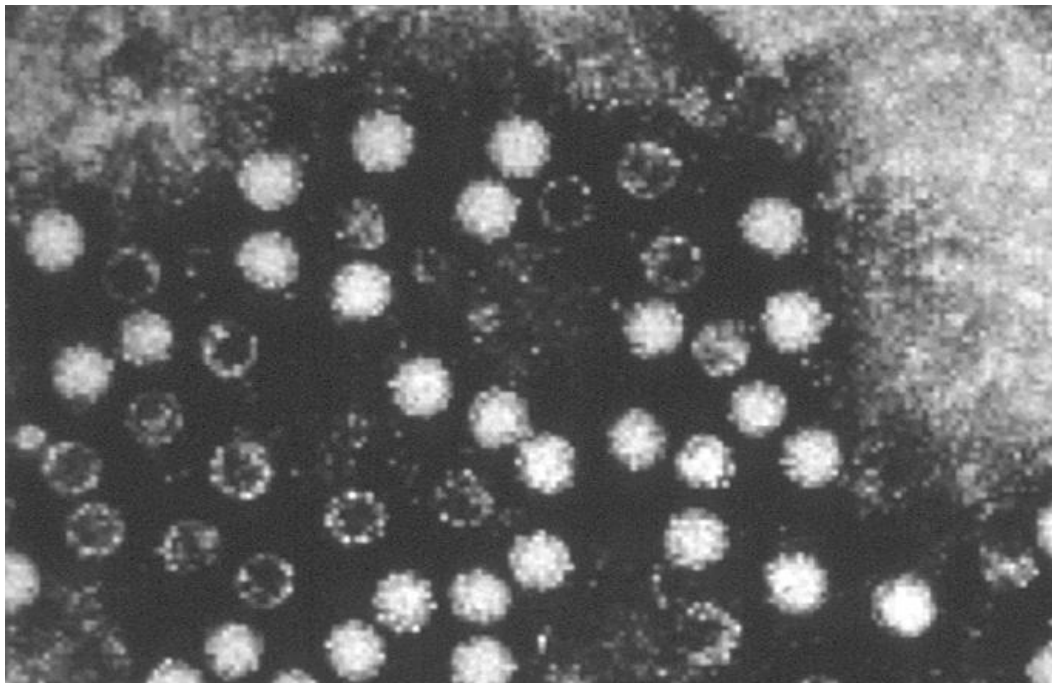


Abbildung 1: HEV-Partikel im Elektronenmikroskop. Quelle: Center of Disease Control and Prevention

Es existiert nach heutigem Stand der Wissenschaft nur ein Serotyp, man unterscheidet aber 4 Genotypen, die als humanpathogen gelten. Dabei sind Genotyp 1 und 2 vor allem für Epidemien durch kontaminiertes Trinkwasser in endemischen Regionen verantwortlich, und treten in unseren Breitengraden nur als reiseassoziierte Erkrankung auf. Die bereits beschriebenen autochthonen Infektionen gehören den Genotypen 3 und 4 an, wobei Genotyp 3 in Europa bei weitem überwiegt (Kantala et al., 2009). Im Gegensatz zum Menschen kann das Schwein anscheinend ausschließlich mit den Genotypen 3 und 4 infiziert werden, ein Nachweis von Genotyp 1 und 2 hat bislang nicht stattgefunden (Tabelle 1) (Teo, 2009).

Tabelle 1: Darstellung der HEV Genotypen und ihre weltweite Verbreitung bei Mensch und Schwein

Genotypen	Verbreitung	
	Mensch	Schwein
Genotyp 1	Asien, Mittlerer Osten, Nordafrika	nicht nachgewiesen
Genotyp 2	Mexiko, Afrika, Ägypten	nicht nachgewiesen
Genotyp 3	Europa, Japan	Nordamerika, Europa, Asien, Neuseeland
Genotyp 4	Asien	Asien

Das Virusgenom enthält neben einem 3' poly(A) Schwanz und kurzen 5' und 3' nichtkodierenden Regionen drei offene Leseraster (*engl.* open reading frames, ORFs) (Feagins et al., 2008b; Previsani and Lavanchi, 2001). Die Gesamtgröße des HEV Genoms beträgt 7500 Basenpaare (Haqshenas and Meng, 2001).

ORF1 befindet sich in der Nähe des 5'Endes und kodiert für ein Polyprotein mit über 1690 Aminosäuren, das möglicherweise posttranslational in multiple Nichtstrukturproteine gespalten wird, die für die Virusreplikation benötigt werden. Dazu zählen eine Methyltransferase, eine Zysteinprotease, eine RNA Helikase und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. ORF2 befindet sich am 3'-Ende des Genoms und kodiert für ein Strukturprotein des Viruskapsids bestehend aus 660 Aminosäuren. ORF3 beginnt mit dem letzten Nukleotid von ORF1 und überlappt vollständig mit ORF2. Es ist das kürzeste der drei Leseraster und kodiert für ein kleines, immunogenes, saures Phosphoprotein mit 123 Aminosäuren, das mit dem Zytoskelett des Virions assoziiert ist (Abbildung 2). Wahrscheinlich spielt es eine Rolle beim Zusammenbau der Viruspartikel (Harrison, 1999; He et al., 1997; Lemon, 1995; Purcell, 1996).

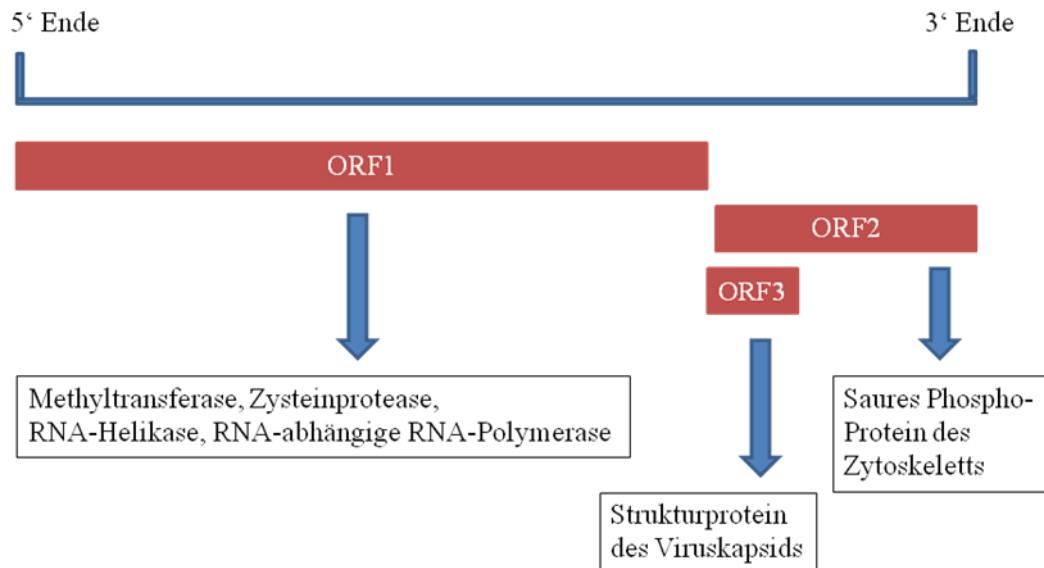


Abbildung 2: Aufbau des HEV-Genoms und Funktion der ORF-Proteine

Zwischen HEV-Isolaten verschiedener Regionen besteht eine deutliche genetische Heterogenität. Einen ersten Hinweis auf diese Diversität lieferte ein US-amerikanischer Patient mit akuter Hepatitis, der keinen Auslandsaufenthalt hinter sich hatte. Eine vollständige Sequenzierung seines Erregers stützte die These, dass es sich um eine neue Gruppe Hepatitis-E-Viren handelte, die sich deutlich von den bis dato gefundenen Isolaten unterschied (Asante, 2003).

In einer internationalen Studie wurden die 4 Genotypen von Hepatitis E anhand ihrer Nukleotidunterschiede in insgesamt 24 Subtypen untergliedert, die mit einem kleinen Buchstaben nach dem Genotyp gekennzeichnet wurden. Die Subtypen 3e und 3f scheinen die in Europa vorherrschenden zu sein, und werden anhand ihres phylogenetischen Verwandtheitsgrades klassifiziert (Abbildung 3) (Lu et al., 2006).

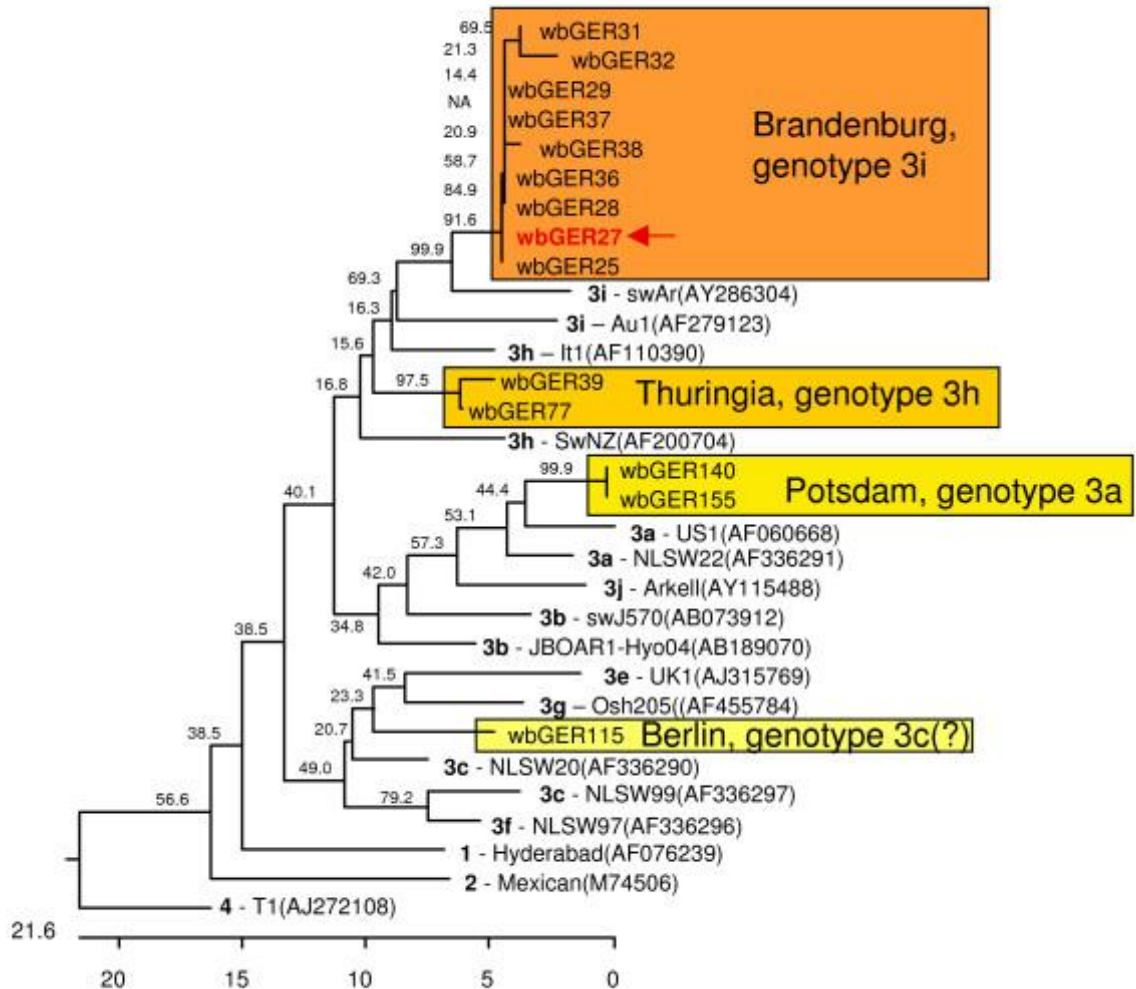


Abbildung 3: Nukleotid-Homologie und phylogenetischer Stammbaum komplett sequenzierter HEV-Isolate (Schielke et al., 2009). Deutsche Isolate sind farbig hervorgehoben

## 2. Hepatitis E Infektion

Auf zellulärer Ebene läuft eine Hepatitis E Infektion folgendermaßen ab: das Virus bindet an einen bis dato nicht näher charakterisierten Rezeptor an der Oberfläche von Hepatozyten. Daraufhin wird HEV internalisiert und das Virusgenom freigesetzt. Dann findet die Transkription der positivsträngigen RNA in negativsträngige statt. Funktionelle Proteine wie eine Methyltransferase, Helikase und Replikase entstehen und katalysieren die Umschreibung der RNA. Strukturproteine von ORF2 und ORF3 entstehen, anschließend wird das Viruspartikel zusammgebaut und aus der Zelle ausgeschleust (Abbildung 4) (Asante, 2003).

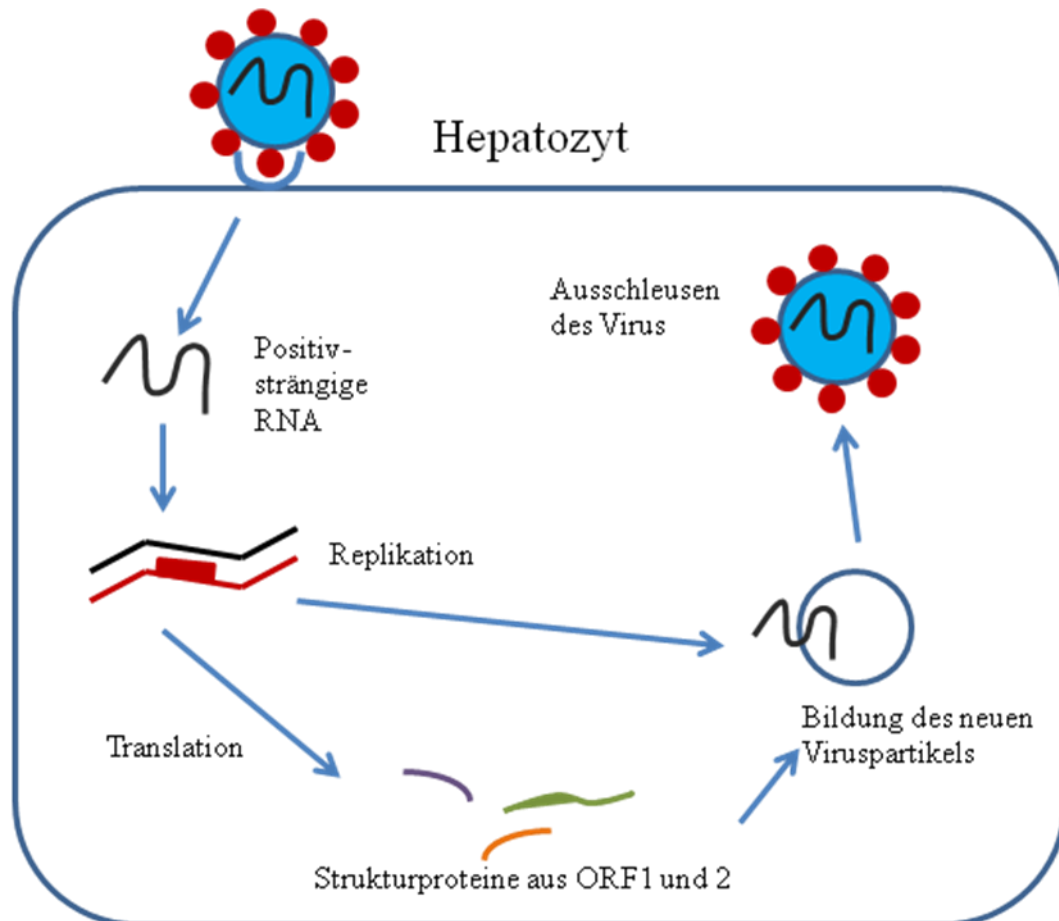


Abbildung 4: Modell der Replikation des HEV

### 2.1. Mensch

Hepatitis E unterliegt in Deutschland nach §7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) der Meldepflicht. Das Robert-Koch-Institut (RKI) erstellt demzufolge regelmäßig eine aktuelle Übersicht zur Anzahl der gemeldeten HEV-Fälle deutschlandweit. Das klinische Bild einer Hepatitis E liegt laut RKI dann vor, wenn mindestens eines der folgenden vier Kriterien erfüllt ist: Fieber, Gelbsucht, deutlich erhöhte Serumtransaminasen oder Oberbauchbeschwerden. Der labordiagnostische Nachweis einer akuten Hepatitis E erfolgt gemäß Falldefinition durch direkten (z.B. Nukleinsäurenachweis im Stuhl oder Serum / Plasma mittels PCR) oder indirekten Erregernachweis (IgM-Antikörpernachweis oder deutliche Änderung des Antikörpertiters zwischen zwei Serumproben beim Nachweis von IgG). Die Meldepflicht für HEV besteht seit 2001, und seitdem ist die Anzahl der gemeldeten Hepatitis-E-Infektionen kontinuierlich angestiegen (Abbildung 5) (Robert-Koch-Institut, 2008).

Interessant ist hierbei auch, dass die Anzahl reiseassoziiertes HEV-Infektionen in den letzten sieben Jahren weitgehend konstant geblieben ist. Der Anstieg der gemeldeten Hepatitis-E-Fälle ist somit ausschließlich auf eine Zunahme der autochthonen Infektionen zurückzuführen (Robert-Koch-Institut, 2008).

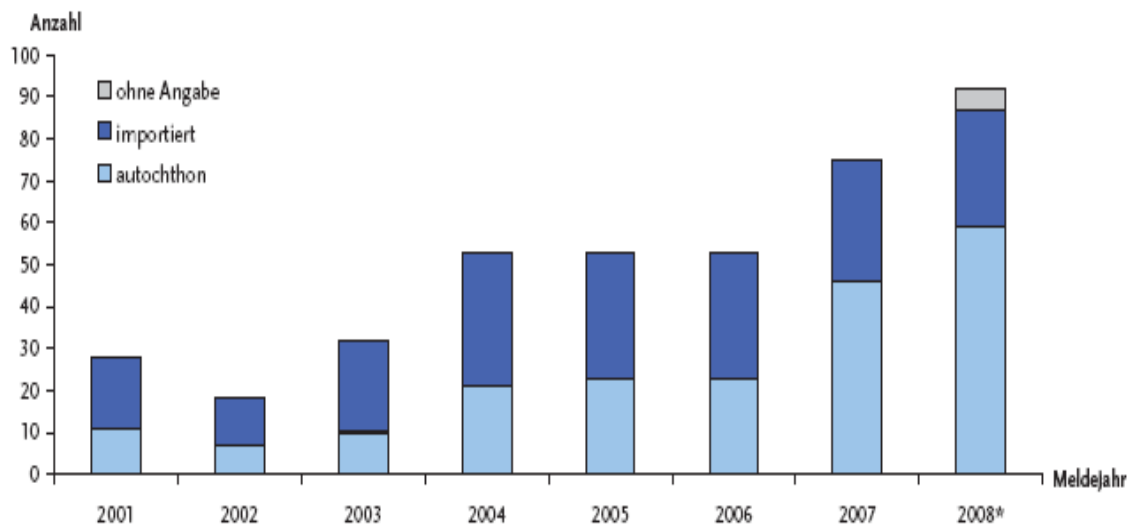


Abb. 1: Anzahl an das RKI übermittelter autochthoner und importierter HEV-Fälle, Deutschland, 2001–2008 (\* Stand: 19.11.2008)

Abbildung 5: Anzahl autochthoner und importierter HEV-Fälle in Deutschland, Stand 11/2008. Quelle: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 2008

Nach einer Inkubationsperiode von 15–60 Tagen (durchschnittlich 40) können Betroffene eine akute, oft selbstlimitierende Hepatitis durchlaufen (Previsani and Lavanchi, 2001). Die Mortalitätsrate bei einer Hepatitis-E-Infektion liegt im Durchschnitt unter einem Prozent (Feagins et al., 2008b). Typische Symptome beinhalten neben grippeähnlichen Beschwerden wie Fieber, Erbrechen, Diarrhoe, Gelenk- und Kopfschmerzen vor allem auch Ikterus, Anorexie, Hepatomegalie und abdominale Schmerzen, wobei die Schwere der Symptomatik von subklinisch bis zu fulminant reicht (Lemon, 1995). Der Höhepunkt der Virusausscheidung über den Kot liegt zeitlich innerhalb der Inkubationsperiode und frühen Phase der akuten Erkrankung und hält bis zu 14 Tage an (Previsani and Lavanchi, 2001).

Grundsätzlich weisen Menschen mit importierter HEV ein meist jüngeres Lebensalter auf als solche mit autochthoner Infektion. Dies liegt allerdings in erster Linie an den Reisegewohnheiten jüngerer Menschen, die in Urlaubsländern häufiger unter weniger hygienischen Bedingungen leben als ältere Personen



(Robert-Koch-Institut, 2008).

Die Problematik der Hepatitis E Erkrankung betrifft in erster Linie schwangere Frauen, die durch eine Infektion sehr gefährdet sind. Bei bis zu 25 % der infizierten Frauen kommt es vorwiegend im letzten Trimester der Schwangerschaft zu einem akuten Leberversagen (Panda et al., 2007). Die Schwere des Verlaufs ist wahrscheinlich zurückzuführen auf die zusätzliche Produktion toxischer Metaboliten durch den infizierten Fetus, die sich zu den durch die mütterliche Erkrankung entstehenden Toxinen addieren, und so zu einem fulminanten Leberversagen (*engl.* fulminant hepatic failure, FHF) führen können (Banait et al., 2007; Khuroo and Kamili, 2009). Eine vertikale Übertragung von der Mutter auf den Fetus führt regelmäßig zu Aborten, Missbildungen und einer erhöhten perinatalen Morbidität und Mortalität (Kumar et al., 2001).

Während der Schwangerschaft findet ein Th1 / Th2-Shift bei HEV-Infektion statt, es ist allerdings fraglich, ob das ursächlich für ein FHF sein kann (Aggarwal, 2007). Eine stille Substitution am C5907 des HEV-Genoms, die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz bei der Expression führt, scheint einen signifikanten Einfluss auf die Schwere des Verlaufs zu haben. Diese Veränderung konnte bei 100 % der Patienten mit FHF, aber nur bei 39,1 % der akuten Verläufe beobachtet werden (Inoue et al., 2009). Zur Zeit ist der einzig sichere Parameter zur Vorhersage der Schwere des Krankheitsverlaufs in der Schwangerschaft das Ausmaß der hepatischen Enzephalopathie (Aggarwal, 2007).

Eine Studie zeigt, dass ein vorzeitiges Ende der Schwangerschaft bei Hepatitis E Infektion die Mortalitätsrate gegenüber einer vollständig ausgetragenen Schwangerschaft verbessert (Banait et al., 2007). Aggarwal, 2007 kommt allerdings zu einem gegensätzlichen Schluss.

## **2.2. Tier**

Im Gegensatz zum Menschen zeigen zumindest Schweine im Rahmen von Infektionsstudien keinerlei klinische Symptomatik, wenn auch milde pathologische, pathohistologische und labordiagnostische Veränderungen im Stadium der akuten Infektion beobachtbar sind (Bouwknegt et al., 2009). Als empfängliche Tierarten wurden bisher Rinder, Ziegen, Schafe, Affen und verschiedene Nager ermittelt (Favorov et al., 2000; Karenyi et al., 1993). Dabei

zeigte sich, dass die HEV-Seroprävalenz bei Schweinen von allen getesteten Tierarten am höchsten war (Di Bartolo et al., 2008; Ibarra et al., 2007; Leblanc et al., 2007; Meng et al., 1999). Interessant an diesen Erkenntnissen ist weiterhin die Tatsache, dass zwischen humanen und porcinen HEV eine zum Teil enge genetische Verwandtschaft besteht, die eine zoonotische Übertragung der Viren vom Schwein auf den Menschen nahelegen. So ist die Übereinstimmung von Nukleinsäuresequenzen zwischen humanen und porcinen HEV einer Region größer als zwischen humanen Hepatitis-E-Stämmen unterschiedlicher Gebiete (Banks et al., 2004; Meng et al., 1997; Renou et al., 2007). In einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde eine vollständige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz eines humanen und eines porcinen HEV gefunden (Kaba et al., 2009). Auch die Übertragung eines Schweine-HEV auf Rhesusaffen und Schimpansen war erfolgreich (Meng et al., 1998).

In einer Studie zur Epidemiologie von HEV bei Wildschweinen in Deutschland wurde in 14,9 % der beprobten Tiere HEV-RNA nachgewiesen (Schielke et al., 2009). Interessant waren hierbei v.a. die signifikanten Homologien zwischen HEV Isolaten aus Wildschweinen und denen aus autochthonen Humanerkrankungen, die in Deutschland erworben worden waren (Schielke et al., 2009).

Verschiedene Infektionsversuche wurden in den letzten Jahren am Schwein durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Hepatitis E Infektion i.d.R. subklinisch verläuft. Auch findet man post mortem keine wesentlichen pathologischen Veränderungen, lediglich eine milde lymphohistiozytäre Hepatitis 28 Tage post infektionem (Bouwknegt et al., 2009). Ein fulminanter Verlauf wie vom Menschen bekannt konnte bisher nicht beobachtet werden (Kasorndorkbua et al., 2003).

Bei mikroskopischer Betrachtung aller Organe wurden neben der bereits angesprochenen milden Hepatitis auch eine milde periportale lymphoplasmazelluläre Enteritis und interstitielle Nephritis sowie synzytiale Zellen in Peyerschen Plaques und Tonsillen während der aktuen Phase der Infektion nachgewiesen (Meng et al., 1997).

Was den Zeitpunkt der Infektion betrifft, so wurde HEV bei Wildschweinen in allen Altersgruppen entdeckt (Schielke et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigt sich beim Hausschwein eine Dominanz der Infektion in der Altersklasse von 10-15

Wochen (de Deus et al., 2008; Kaba et al., 2009; McCreary et al., 2008). Dies führt dazu, dass ein Nachweis von HEV-RNA im Kot sowie der serologische Nachweis von IgM-Antikörpern zum üblichen Zeitpunkt der Schlachtung im Alter von 6 Monaten deutlich seltener gelingen dürfte als der Nachweis von anti-HEV-IgG. Im Rahmen einer experimentellen Infektion von Hausschweinen mit HEV zeigte sich von Tag 7 bis Tag 23 post infektionem eine fäkale HEV-RNA-Ausscheidung, eine Virämie konnte ab Tag 13 der fäkalen Ausscheidung festgestellt werden. Einige Tiere zeigten einen schwachen aber konstanten Anstieg der Leberenzyme (ALT / AST) im Zeitraum der fäkalen Virusexkretion (Bouwknegt et al., 2009). Bei einer experimentellen Infektion von spezifisch pathogenfreien (SPF) Schweinen konnten dagegen weder Veränderungen der Leberenzyme, des Serum-Bilirubins, noch irgendwelche Anzeichen klinischer Symptome nachgewiesen werden (Halbur et al., 2001).

Eine Studie zur Lokalisation des Virus in verschiedenen Körperorganen fand die höchste Konzentration in Hepatozyten und dem Gallengang. Außerdem konnte HEV in Dick- und Dünndarm, Lymphknoten, Tonsillen, Milz und Niere nachgewiesen werden (Choi and Chae, 2003). Der Nachweis des Virus in der Gallenflüssigkeit konnte sehr häufig realisiert werden, seltener war auch in Kot und Serum HEV-RNA festzustellen (de Deus et al., 2007). Negativsträngige RNA als Hinweis auf eine Replikation des Virus konnte in der Leber, aber auch in Dünndarm, Lymphknoten und Colon nachgewiesen werden. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass eine Virusvermehrung auch außerhalb der Leber stattfindet (Williams et al., 2001).

Li et al gelang erst kürzlich der Nachweis von HEV-RNA der Genotypen 3 und 4 in einem einzigen Tier von einer Schweinefarm in Shanghai, was zu der Hypothese führte, dass durch eine solche Koinfektion mit einem schwereren Verlauf oder sogar einer HEV Pandemie theoretisch zu rechnen wäre (Li et al., 2009).

### **2.3. Immunprophylaxe**

Zum jetzigen Zeitpunkt ist keine wirksame Vakzine gegen HEV im Handel erhältlich. Die stärksten antigenetischen und protektiven Eigenschaften weisen Oberflächenproteine von ORF2 auf, die in unterschiedlichen Varianten als Grundlage zur Bildung neutralisierender Antikörper verwendet werden (Im et al., 2001; Meng et al., 2001; Schofield et al., 2000; Schofield et al., 2003; Zhang et al., 2005; Zhou et al., 2005).

In einer plazebokontrollierten Doppelblindstudie erhielten insgesamt 2000 Probanden entweder einen Impfstoff oder einen Plazebo. Dabei hatte der Impfstoff in 95,5 % der Fälle eine protektive Wirkung. Von Impfreaktionen wurden in der Plazebo- sowie in der Impfstoff-Gruppe mit gleicher Häufigkeit berichtet. Als Impfstoff diente ein gereinigtes Polypeptid, das in *Spodoptera frugiperda* Zellen produziert wurde, die mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert worden waren. Dieses enthielt eine trunkierte HEV-Genomsequenz, die für das Kapsidantigen des Virus kodiert (Shrestha et al., 2007). In einer aktuellen Veröffentlichung wurde ein rekombinanter HEV-Impfstoff an insgesamt 457 Probanden getestet, der sich als sicher und immunogen bewährte (Zhang et al., 2009). Bei beiden eben genannten Versuchen handelt es sich um klinische Phase II Studien.

### **2.4. Behandlung**

Derzeit ist die Behandlung einer Hepatitis E Infektion nur symptomatisch möglich. In neueren Studien zeigen sich vielversprechende Erfolge durch den Einsatz von Stoffen, die die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase hemmen (Huang et al., 2009). In Untersuchungen an Schweinen konnte die Viruslast so signifikant reduziert, sowie geringere Werte bei den Leberenzym- und Bilirubin-Werten erzielt werden (Huang et al., 2009).

### 3. Epidemiologie

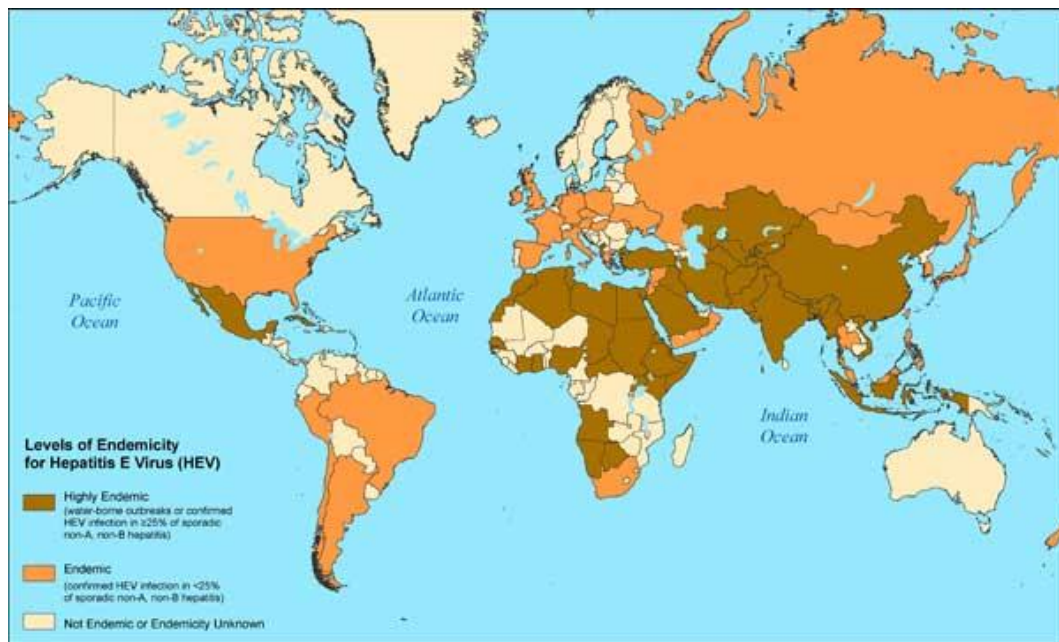


Abbildung 6: Gebiete mit epidemischem und sporadischem Auftreten von HEV beim Menschen. Quelle: Center for Disease Control and Prevention

Zum Verständnis der Epidemiologie von HEV ist die Differenzierung zwischen autochthoner und reiseassoziiertes Form essenziell. In seiner endemischen Form tritt HEV vorwiegend in Ländern mit mangelhaften hygienischen Bedingungen auf, die eine fäkal-orale Verbreitung des Virus über das Trinkwasser begünstigen. Hiervon sind vorwiegend afrikanische und asiatische Länder betroffen (Abbildung 6). Dort findet man fast ausschließlich Genotyp I, der kein zoonotisches Potenzial besitzt. Für autochthone Infektionen in Ländern der Ersten Welt ist in erster Linie Genotyp 3, vereinzelt auch Genotyp 4, verantwortlich. Man vermutet für diese Form der Hepatitis E Infektion eine zoonotische Übertragung.

#### 3.1. Reservoir

##### 3.1.1. Schwein

In Deutschland leben derzeit zwischen 3,6 und 3,7 Millionen Schweine in rund 18.500 landwirtschaftlichen Betrieben. 80 % dieser Betriebe sind auf Schweinehaltung spezialisiert. Man beobachtet eine Tendenz hin zu größeren Betrieben mit mehr als 100 Zuchtsauen bzw. über 1000 Mastplätzen (Weiß, 2009). Diese intensiven Haltungsformen begünstigen durch den engen Kontakt

der Tiere zueinander eine schnelle und vollständige Durchseuchung des Bestandes.

Von allen bisher untersuchten Tierarten findet man beim Schwein die höchsten Seroprävalenzen, diese variieren je nach Land und Autor zwischen 7 % (Chile) und 80 % (Griechenland). Auf dem afrikanischen Kontinent haben trotz vorhandener HEV-Seroprävalenzen beim Menschen bislang noch keine Studien zur porzinen HEV-Infektion stattgefunden (Grabow et al., 1996). Für Deutschland gibt es bis zum heutigen Tage keine verlässlichen Daten zur anti-HEV-IgG-Seroprävalenz beim Schwein. Eine Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zu porzinen anti-HEV-IgG Seroprävalenzen wurde im folgenden zusammengestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenzen von anti-HEV-IgG beim Schwein in verschiedenen Ländern

Land	Prävalenzrate	Literatur / Referenzen
Argentinien	22,70 %	(Munne et al., 2006)
Chile	7 %	(Ibarra et al., 2007)
China	78,8 % bzw. 40 %	(Wang et al., 2002) bzw. (Meng et al., 1999)
Frankreich	40,50 %	(Kaba et al., 2009)
Griechenland	80 %	(Asimoula et al., 2009)
Indien	54,6-74,4 %	(Arankalle et al., 2001)
Kanada	59,40 %	(Yoo et al., 2001)
Korea	60 %	(Meng et al., 1999)
Spanien	71,40 %	(Peralta et al., 2009b)
Thailand	70 %	(Meng et al., 1999)
USA	60 %	(Meng et al., 1999)

### 3.1.2. Andere Tierarten

Neben dem Schwein hat man HEV inzwischen auch bei verschiedensten domestizierten, peridomestischen und wilden Säugetieren sowie bei Vögeln nachweisen können (Arankalle et al., 2001; Haqshenas et al., 2001; Kabrane-Lazizi et al., 1999; Peralta et al., 2009b). Das Schwein scheint aber nach wie vor die empfänglichste Tierart für das Virus zu sein, Wiederkäuer zeigen deutlich geringere Prävalenzraten von ca. 7 %. Dagegen wurden in verschiedenen Nagerspezies Seroprävalenzen von über 50 % gefunden (Arankalle et al., 2001). Ob es sich bei der betreffenden Tierart um eine Nutztier- oder Wildtierspezies handelt scheint weniger Einfluss auf die Seroprävalenz zu haben, vielmehr besteht anscheinend eine tierartabhängige Empfänglichkeit für HEV. In Abhängigkeit von

der verwendeten Methode kommen die Autoren auf deutlich unterschiedliche Prävalenzraten innerhalb der getesteten Spezies. Da für ein positives Ergebnis in serologischen Testverfahren der Zeitpunkt des Kontaktes von Virus und Wirtsorganismus eine untergeordnete Rolle spielt, wird man mit einem Screening auf Antikörper stets deutlich höhere Prävalenzraten erzielen als bei dem Versuch, die Virus-RNA mittels PCR nachzuweisen.

Eine Studie aus Nepal fand Seroprävalenzen von 12 % unter verschiedenen peridomestischen Nagern. Den Autoren gelang bei 9 % der seropositiven Tiere der Nachweis von HEV-RNA, die eine Nukleotidübereinstimmung von 95 bzw. 96 % mit zwei humanen Isolaten von HEV aus Nepal aufwiesen (He et al., 2002). Auf Grundlage dieser Ergebnisse postulieren sie, dass sich Nager in der Wildnis anstecken und aufgrund ihrer peridomestischen Lebensweise das Virus dann zu Haustieren, insbesondere Schweinen, tragen.

In den USA zeigten sich Seroprävalenzen bei wilden Ratten zwischen 44 und 90 %, und zwar unabhängig davon ob sich der Lebensraum der Tiere in ländlichen oder städtischen Regionen befand (Kabrane-Lazizi et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse für verschiedene Spezies fanden sich in China (Wang et al., 2002) und Spanien (Peralta et al., 2009b). In einer aktuellen Studie zeigte sich bei Hauskaninchen von zwei unterschiedlichen Zuchten eine Seroprävalenz für anti-HEV-IgG von 57 % (191 positive von insgesamt 335 getesteten Tieren) (Zhao et al., 2009).

Da HEV im humanen Bereich in seiner endemischen Form über fäkal kontaminiertes Wasser übertragen wird, stellten sich Li et al die Frage, ob im Wasser lebende Spezies – in diesem Falle Japanmuscheln (*Corbicula japonica*) – mit HEV infiziert sein könnten. Er fand in ebendiesen Muscheln den Genotyp 3, was zu dem Schluss führt, dass japanische Flüsse mit HEV kontaminiert zu sein scheinen. Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu japanischen Isolaten von HEV bei Wild- und Hausschweinen sowie Wildwiederkäuern lag jeweils bei über 97 %. Über Krankheitsausbrüche durch Hepatitis A und Noroviren aus kontaminierten Bivalvae wurde bereits häufig berichtet. Da Japanmuscheln üblicherweise vor ihrem Verzehr gründlich erhitzt werden, ist eine Ansteckung mit Hepatitis E über den Verzehr zwar wahrscheinlich nicht sehr häufig, bei unzureichender Erhitzung aber durchaus möglich (Li et al., 2007).

Die erstmalige Entdeckung eines aviären Stammes von Hepatitis E gelang Haqshenas et al. 2001 bei Hühnern mit Hepatitis-Splenomegalie-Syndrom in den USA. Was die Seroepidemiologie von aviärer Hepatitis E betrifft, so zeigten die Autoren einer weiteren Studie folgendes: in 5 Bundesstaaten der USA enthielten 71 % aller untersuchten Herden mit Hepatitis-Splenomegalie-Syndrom seropositive Tiere, bei Jungvögeln lag die Prävalenz bei 17 %, bei adulten bei 36 % (Huang et al., 2002). Ob aviäre Hepatitis E genauso wie Schweine-HEV auf den Menschen übertragbar ist, bleibt noch unklar. In der zugehörigen Sequenzanalyse bestand eine Nukleotidsequenz-Übereinstimmung von 56 bis 61 % zwischen dem aviären und dem humanen bzw. porcinen Virus. In einer ersten europäischen Studie gelang der Nachweis aviärer HEV-RNA sowie anti-HEV IgG bei Hühnern. Dabei enthielten 27 von 29 getesteten Herden mindestens ein positives Tier. Der Anteil seropositiver Hühner variierte in den Betrieben zwischen 20 % und 80 % (Peralta et al., 2009a).

Was die Entwicklung klinischer Symptome bei einer Infektion mit aviärer HEV betrifft, so zeigte sich bei insgesamt 60 SPF Hühnern, die mit HEV infiziert waren, dass nur zwei Tiere wesentliche Läsionen in der Leber entwickelten, was die Vermutung nahelegt, dass zur Etablierung eines vollständigen Hepatitis-Splenomegalie-Syndroms noch weitere Cofaktoren vonnöten sind. Auch scheint die Infektionsdosis eine Rolle zu spielen (Billam et al., 2009). Allerdings wiesen alle Tiere, die mit dem aviären Stamm der HEV infiziert worden waren, milde mikroskopisch sichtbare Leberläsionen auf, was die bisherige Annahme, es handele sich bei der aviären Hepatitis um einen avirulenten Virusstamm, widerlegt (Billam et al., 2009).

## **3.2. Übertragungswege**

### **3.2.1. Mensch**

Ein epidemisches Auftreten von HEV infolge fäkal-oralen Infektionen über kontaminiertes Trinkwasser konnte und kann ausschließlich in Ländern mit mangelhaften hygienischen Bedingungen (insbesondere Asien und Afrika) beobachtet werden. Diese Infektionen sind stets verursacht durch die Genotypen 1 und 2. Doch in den letzten Jahren mehren sich die Berichte von HEV-Infektionen in Industrieländern, die in keinem Zusammenhang mit Reisen in Länder mit mangelhafter Hygiene stehen, sondern in Europa oder Nordamerika erworben



wurden. Solche Studien gibt es inzwischen beispielsweise aus Großbritannien (Banks et al., 2004), den Niederlanden (Borgen et al., 2008), Frankreich (Boutrouille et al., 2007), Spanien (Buti et al., 2006), Australien (Cowie et al., 2005), Griechenland, Schweden und den Vereinigten Staaten (Clemente-Casares et al., 2003). Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass diese HEV-Isolate genetisch divergent sind im Vergleich zu HEV-Stämmen aus endemischen Gebieten, sie gehören den Genotypen 3 und 4 an (Schlauder and Mushahwar, 2001).

Dokumentierte Übertragungswege des HEV beim Menschen sind derzeit neben der fäkal-oralen Infektion über das Trinken von kontaminiertem Wasser die parenterale Ansteckung durch Bluttransfusionen und die vertikale Weitergabe des Virus von der Mutter an das ungeborene Kind (Kumar et al., 2001; Mushahwar, 2008). Eine direkte Übertragung des HEV von Mensch zu Mensch gilt als unwahrscheinlich, und zwar sowohl bei sporadischen als auch bei epidemischen Infektionen (Pelosi and Clarke, 2008).

Die Vermutung dass es sich bei HEV um eine Zoonose handeln könnte, wurde erstmals nach der erfolgreichen Übertragung von humanen HEV auf Hausschweine aktuell (Balayan et al., 1990). In Japan trat eine akute Hepatitis E infolge des Verzehrs von Wildschweinfleisch auf (Masuda et al., 2005). Eine weitere japanische Studie fand bis zu 100 % Übereinstimmung von HEV-Genomen aus kommerziell verkauften Schweinelebern und infizierten Personen (Yazaki et al., 2003). So entstand die Vermutung, dass eine Ansteckung über den Verzehr von unzureichend gegartem Schweinefleisch bzw. Innereien möglich sein könnte.

Allerdings gelang der Nachweis von HEV-RNA aus Muskelfleisch verschiedener Lokalisationen nur in einem Zeitfenster von bis zu 4 Wochen nach Beginn der HEV-RNA Ausscheidung via Fäzes. Deshalb geht man zurzeit davon aus, dass eine Ansteckung nur möglich ist, wenn die HEV-Infektion zu einem späten Zeitpunkt der Mast auftritt (Bouwknegt et al., 2009). Üblicherweise findet eine HEV-Infektion beim Schwein im Alter von 2-3 Monaten statt (Meng et al., 1999). Die maximale HEV Ausscheidung über den Kot besteht in einem Altersbereich von 10-12 Wochen (McCreary et al., 2008). Somit dürften infizierte Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung mit 6 Monaten Lebensalter im Normalfall keine Virusausscheider mehr sein.

Nichtsdestotrotz erscheint eine Ansteckung über Lebensmittel vom Schwein angesichts der vorhandenen Erkenntnisse möglich. Dabei könnten insbesondere Rohwürste aus Schweinefleisch eine Rolle spielen, da hier eine unzureichende Inaktivierung des Virus stattfindet (Bouwknegt et al., 2008). Eine weitere lebensmittelbedingte Ansteckungsquelle stellen Schweinelebern dar. Von 127 in Supermärkten der USA erworbenen Schweinelebern konnte in 14 Organen HEV-RNA nachgewiesen werden. Mit den HEV-RNA haltigen Homogenisaten aus den positiv getesteten Lebern konnten andere Schweine erfolgreich infiziert werden (Feagins et al., 2007). Durch eine Erhitzung des Gewebes auf eine innere Temperatur von mindestens 71 °C über 5 min konnte eine zuverlässige Inaktivierung des Erregers erreicht werden (Feagins et al., 2008a).

In einer Studie aus Moldawien zeigte sich, dass Personen, die mit Schweinen arbeiten, eine erhöhte HEV-Antikörper-Prävalenz gegenüber Personen ohne Kontakt zu Schweinen aufwiesen. Es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen Tätigkeiten wie dem Säubern der Ställe oder auch der Geburtshilfe und der Prävalenz von Hepatitis E Infektionen bei den untersuchten Personen (Drobeniuc et al., 2001). Vergleichbare Ergebnisse fanden Galiana et al. und empfehlen in diesem Zusammenhang die Einhaltung strengerer Hygienemaßnahmen zur Vermeidung einer Ansteckung bei der Arbeit mit Schweinen (Galiana et al., 2008).

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt ist die Übertragung porziner Organe auf den Menschen im Rahmen einer Xenotransplantation. Durch Umgehung der natürlichen Barriere können Viren wie HEV, porzine Circo- oder Herpesviren sich uneingeschränkt im Empfängerorganismus verbreiten (Yoo and Giulivi, 2000).

### **3.2.2. Schwein**

Im Gegensatz zum Menschen können Schweine nur mit den Genotypen 3 und 4 infiziert werden (Teo, 2009). Es wurde im Rahmen einer Infektionsstudie an trächtigen Sauen keine vertikale Übertragung von HEV auf das Ferkel festgestellt, was sich durch die unterschiedlichen Plazentatypen bei Mensch und Schwein erklären lässt. Während der Kontakt zwischen fetalem und maternalem Anteil der Plazenta bei der humanen Placenta haemochorialis so eng ist, dass Antikörper und Erreger problemlos zirkulieren können, ist dies bei der porzinen Placenta epitheliochialis nicht möglich. Zwar waren die Ferkel – bedingt durch die

Aufnahme maternaler kolostraler Antikörper – nach ihrer Geburt zunächst Antikörper-positiv, im Alter von 71 Tagen waren diese Antikörper dann allerdings nicht mehr nachweisbar (dos Santos et al., 2009; Kasorndorkbua et al., 2003).

Das Virus kann auch beim Schwein intravenös übertragen werden, wobei dieser Weg ein eher artifizieller ist und für die natürliche Verbreitung wohl keine Rolle spielt (Bouwknegt et al., 2009). Der Nachweis von HEV-RNA im Urin von infizierten Schweinen lässt nun auch eine Übertragung via Urin möglich erscheinen (Bouwknegt et al., 2009).

Der Versuch einer fäkal-oralen Übertragung – wie sie in endemischen Gebieten für den Menschen üblich ist - gelang Kasorndorkbua et al. 2004 bei einem Tier, indem 15 g gepoolte Fäzes einer HEV-Ausscheidergruppe per Schlundsonde an drei aufeinanderfolgenden Tagen naiven Tieren verabreicht wurden. Die Tatsache dass dieser Übertragungsweg für das Schwein bisher nicht nachgewiesen werden konnte erklären sich die Autoren so, dass entweder sehr große Virusmengen oder eine wiederholte Exposition vonnöten sind um eine fäkal-orale Übertragung zu ermöglichen. Eine Übertragung des Virus durch mehrfach verwendete Injektionskanülen gelang nicht, ebenso wenig wie die Übertragung von HEV über das Sekret aus Nasen oder Tonsillen infizierter Tiere auf die Schleimhäute naiver Schweine. Der zuverlässigste Übertragungsweg war der direkte Kontakt von naiven zu infizierten und virusausscheidenden Tieren (Kasorndorkbua et al., 2004).

## **4. Diagnostik**

### **4.1. Direkter Nachweis**

Eine routinemäßige Anzucht von Hepatitis E Viren in Zellkulturen gelang bisher nicht. Zwar gibt es einzelne Versuche, so z.B. in humanen embryonalen Lungenzellen, eine langfristige und stabile Anzucht mit guter Virusreplikationsrate ist allerdings bislang nicht geglückt (Panda et al., 2007).

Vor der Etablierung molekularer Nachweismethoden war die Standardmethode zur Diagnostik von HEV der Virusnachweis im Stuhl durch Elektronenmikroskopie oder Immun-Elektronenmikroskopie. So können die 27 bis 34 nm kleinen Virionen nachgewiesen werden, die in der präkriterischen und

frühen ikterischen Phase vom Menschen ausgeschieden werden. Problematisch ist auch hier der hohe Kosten- und Geräteaufwand (Panda et al., 2007). Das Gelingen des Nachweises ist abhängig von der Menge an ausgeschiedenem Virus, die natürlich nicht konstant ist.

Heutzutage gelingt der sichere Nachweis von HEV in der akuten Phase durch das Auffinden der positivsträngigen Virus-RNA mittels reverse transkriptase PCR (RT-PCR) in Stuhl- oder Serumproben, oder auch z.B. aus kontaminierten Abwässern. Dieses Verfahren bleibt jedoch aufgrund seines hohen Material- und Geräteaufwandes einigen wenigen Speziallabors vorenthalten. Sequenzanalysen von Amplifikaten haben zudem gezeigt, dass eine Vielzahl genetischer HEV-Varianten existiert. Die Sensitivität der RT-PCR ist daher abhängig von der Übereinstimmung der Primer mit dem zu untersuchenden Isolat (Okamoto, 2007). Die notwendigen Primer zur Amplifikation von definierten Regionen des HEV Genoms setzen entweder an der Helikase, der Polymerase, oder an Teilen des 3' Endes von ORF2 an. Es ist auch möglich, durch strangspezifische RT-PCRs negativsträngige HEV-RNA nachzuweisen, die einen Hinweis auf den Grad der Virusreplikation im Organismus gibt (Panda et al., 2007).

## **4.2. Indirekter Nachweis**

### **4.2.1. Serum**

Als Methode der Wahl gilt inzwischen der serologische Nachweis von IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen die ORF2- bzw. ORF3-Epitope des Virus. Sie zeigen gute Ergebnisse für divergierende Isolate und dienen als Grundlage zur Entwicklung sensitiver und spezifischer ELISAs, die sowohl einen Antikörper-Nachweis in der akuten Phase als auch zu einem späteren Zeitpunkt ermöglichen (Anderson et al., 1999; Zhou et al., 2005). Neben dem für das Viruskapsid kodierenden ORF 2 befinden sich weitere wichtige Epitope am Carboxylende von ORF3, wobei diese ein deutlich geringeres antigenetisches Potenzial besitzen und weniger stark konserviert sind als die Epitope von ORF2. Außerdem scheinen nur ORF2-Antikörper auch eine tatsächlich protektive Wirkung zu besitzen (Ghabrah et al., 1998). Zur Anwendung kommen Immunoassays auf der Basis rekombinanter Proteine. Die Methode des serologischen Virusnachweises hat den Vorteil, dass neben akuten auch zurückliegende Infektionen nachgewiesen werden können.

Was den Menschen betrifft, so gilt der Nachweis von IgM als Beweis für eine

akute Infektion. Wird anti-HEV-IgG im Zusammenhang mit einer Hepatitis-Symptomatik bei Ausschluss von Hepatitis A, B und C nachgewiesen, so gilt dies ebenfalls als hinreichend sicherer Beweis für eine HEV-Infektion. Liegen beim Nachweis von HEV-IgG keine eindeutigen klinischen Hepatitis-Symptome vor, so sollte eine erneute Titer-Bestimmung nach 8-10 Tagen erfolgen, um einen Antikörperanstieg zu belegen (N.N., 1998).

Studien zur humanen HEV-Infektion zeigen, dass Antikörper gegen HEV (IgM und IgG) sich normalerweise zum selben Zeitpunkt entwickeln, zu dem Symptome einer Hepatitis entstehen, üblicherweise vor dem Auftreten eines Ikterus. IgM-Antikörper entstehen einige Tage vor IgG, wobei IgM-Antikörper in der frühen Phase der Rekonvaleszenz schnell in ihrer Anzahl zurückgehen. Anti-HEV-IgG persistieren über einen langen Zeitraum von mehr als 14 Jahren, und bieten einen verlässlichen Schutz gegen eine wiederholte Erkrankung, nicht aber gegen eine erneute Virusausscheidung über den Stuhl (Previsani and Lavanchi, 2001).

Das Wissen über den genauen Verlauf der HEV-Infektion beim Schwein ist noch teilweise lückenhaft. Die bislang gewonnenen Erkenntnisse über den serologischen Verlauf lassen sich anhand zweier Studien (Bouwknegt et al., 2009; de Deus et al., 2008) folgendermaßen darstellen:

- Virusausscheidung ab dem 7. Tag post infektionem für ca. 3-4 Wochen
- Schwacher Anstieg der Leberenzymwerte (Alanin-Aminotransferase, ALT) im Blut im Zeitraum der fäkalen Virusausscheidung
- Anstieg der IgG-Antikörperproduktion ab dem 13. Tag post infektionem (Bouwknegt et al., 2009)
- Anstieg der IgM-Antikörper und Abfall unter die Nachweisgrenze im Zeitraum von 4-7 Wochen post infektionem (de Deus et al., 2008) (Abbildung 7)

Beim Menschen sinkt der IgM-Antikörpertiter in der frühen Phase der Genesung (nach sieben bis neun Wochen) rasch ab. Für das Schwein existiert eine Studie an natürlich infizierten Sauen und ihren Ferkeln. Dort konnten IgM-Antikörper nur in einem Zeitraum von 4-7 Wochen post infektionem nachgewiesen werden (de Deus et al., 2008). Das Vorhandensein von IgM-Antikörpern spricht also anscheinend für eine frische Infektion, bedeutet aber nicht zwingend das

Vorhandensein einer Virämie. Denn anti-HEV IgM konnte in einer anderen Studie sowohl in der virämischen als auch in der nicht-virämischen Phase der Infektion nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2005).

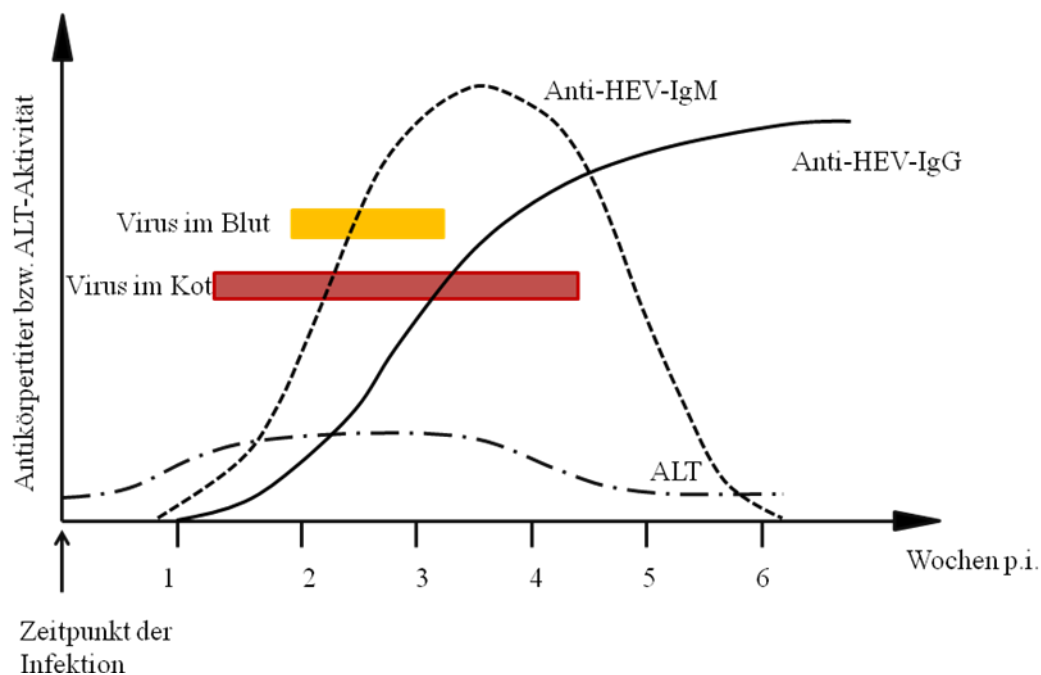


Abbildung 7: Merkmale der porcinen HEV-Infektion

Neben mehreren in-House-Verfahren zum Antikörpernachweis gibt es zur Zeit im Humanbereich einige kommerziell erhältliche Testkits, von denen allerdings keiner explizit an das Schwein adaptiert ist.

#### 4.2.2. Fleischsaft

Ein Nachweis von Hepatitis-E-Antikörpern aus dem Fleischsaft anstelle von Serum birgt in erster Linie praktische Vorteile für die Lebensmittelindustrie. Zunächst wird im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Trichinenuntersuchung an Schlachthöfen standardmäßig ein Stück Zwerchfell von allen Schweinen gewonnen. Aus diesem Material könnte potentiell auch der Fleischsaft zum Nachweis des anti-HEV-IgG gewonnen werden. Somit ist für die Diagnostik kein zusätzlicher Arbeitsschritt am Schlachtband notwendig. Des Weiteren könnte der Nachweis auch noch aus dem Lebensmittel Fleisch bei der Zerlegung, im Einzelhandel oder beim Endverbraucher stattfinden.

Testungen aus Fleischsaft finden heute zusätzlich standardmäßig zur Salmonellen-Diagnostik nach der Schweine Salmonellen VO vom 13. März 2007 statt.

Außerdem wurden Anwendungen für diverse andere Erkrankungen getestet, z.B. für die Klassische Schweinepest. Dabei bestand eine deutliche Korrelation zwischen den Antikörpertitern in Serum und Fleischsaft, wobei die Antikörperkonzentrationen im Fleischsaft signifikant niedriger waren als im Serum (Kaden et al., 2009). Auch die Verwendung von Fleischsaft zur Diagnostik des Seuchenhaften Spätaborts des Schweines (*engl.* porcine respiratory and reproductive syndrome, PRRS) im ELISA zeigte sich erfolgreich (Molina et al., 2008).

Fleischsaft kann man als natürliche Verdünnung des Serums betrachten (Nielsen et al., 1998). Demzufolge muss zur Fleischsaft-Diagnostik eine höhere Konzentration des Probenmaterials verwendet werden als bei der Anwendung von Serum. Zum Nachweis von Salmonellen im ELISA wird zum Erreichen vergleichbarer Ergebnisse bei einer Serumverdünnung von 1:400 eine Fleischsaftverdünnung von 1:30 verwendet, die dort verwendete Konzentration war folglich um den Faktor 13 höher (Steinbach et al., 2003).

Was die Verteilung der Immunglobulin-Isotypen im Fleischsaft betrifft, so konnte verschiedentlich nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von IgG in Serum und Fleischsaft besteht, nicht aber bei IgM (Steinbach et al., 2003). Eventuell ist das IgM-Molekül durch seine Größe im Fleischsaft unterrepräsentiert.

## **5. ELISA**

Der Begriff ELISA steht für „enzyme-linked immunosorbent assay“. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, an ein Antigen zu binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des jeweiligen Bindungspartners (also Antigen oder Antikörper). Das sogenannte Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration, so dass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann (Engvall et al., 1971; Goldsby et al., 2003).

Zunächst unterscheidet man kompetitive und nicht kompetitive Verfahren. Der

kompetitive ELISA zeichnet sich dadurch aus, dass enzymmarkierter und Proben-Antikörper um die Bindung an ein Antigen konkurrieren. Grundsätzlich ist zu sagen, dass hier eine umgekehrte Korrelation zwischen der Konzentration des nachzuweisenden Agens und der zu detektierenden Reaktion besteht. Im Gegensatz dazu ist beim direkten Verfahren, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, die Farbreaktion eine Funktion der Antikörperdichte in dem zu untersuchenden Material (Crowter, 2009).

Man unterscheidet sowohl für die kompetitiven, als auch für die nichtkompetitiven Assays drei Verfahrensweisen: den direkten ELISA, den indirekten ELISA und den Sandwich-ELISA. Bei der direkten Testvariante wird ein Antigen auf eine Platte beschichtet, nach einem Waschschrift wird der enzymmarkierte Antikörper aufgebracht und nach erneutem Waschen entsteht durch Zugabe des Substrates eine messbare Reaktion. Die Farbreaktion wird nach Beendigung der Inkubationszeit durch die Zugabe einer starken Säure gestoppt. Das Beschichten der Platten geschieht durch passive Bindung der Proteine an das Plastik der Mikrotiterplatte im Rahmen einer definierten Inkubationszeit.

Im Unterschied zum direkten Verfahren wird beim indirekten ELISA ein zusätzlicher Schritt zwischen Antigen-Beschichtung und dem Aufbringen des enzymmarkierten Antikörpers eingefügt. Hierbei binden die enzymmarkierten Antikörper nicht an das Antigen, denn diese Aufgabe wird von nicht markierten spezifischen Antikörpern (meist aus einer zu untersuchenden Probe) übernommen. Im Anschluss erfolgt die Bindung der markierten Antikörper an die bereits gebundenen Antikörper. Das weitere Vorgehen ist identisch zu dem des direkten ELISA. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass einzelne Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA) detektiert werden können, indem die enzymmarkierten Antikörper so beschaffen sind dass sie z.B. ausschließlich an IgM-Antikörper binden. Die enzymmarkierten Antikörper sind meist anti-Spezies-Antikörper, sprich sie reagieren mit allen Antikörpern einer bestimmten Tierart, und können so variabel eingesetzt werden.

Es soll nun das Verfahren des indirekten ELISA beispielhaft für den Nachweis von HEV-Antikörpern geschildert werden, so wie es für den für die Humandiagnostik kommerziell erhältlichen *recomWell HEV* (Firma Mikrogen Diagnostik, Neuried, Deutschland) entwickelt wurde (Abbildung 8).



Zunächst wird eine Mikrotiterplatte mit rekombinanten Antigenen beschichtet (1). Freie Bindungsstellen werden durch eine zusätzliche Absättigung mit bovinem Serumalbumin blockiert, so dass nur spezifische Bindungen an die Antigene der Plattenbeschichtung möglich sind. Dann folgt das Aufbringen der Serumproben. Sind in diesen anti-HEV-Immunglobuline vorhanden, so binden die Antikörper an die rekombinanten Antigene auf der Mikrotiterplatte (2). Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, um schwache und ungebundene Substanzen zu entfernen. Nun wird der enzymmarkierte anti-Spezies-Antikörper aufgebracht. Dieser bindet an das Fab-Stück der komplexierten anti-HEV-Antikörpers (3). Es folgt erneut ein Waschschrift, um nicht gebundenes Konjugat zu entfernen. Im nächsten Schritt wird das Substrat aufgebracht. Das an die sekundären Antikörper gebundene Enzym setzt das Substrat um und bewirkt so eine messbare Farbreaktion (4). Diese wird nach einer definierten Zeit gestoppt, und danach die Extinktion mit Hilfe eines Fotometers bei definierter Wellenlänge gemessen.

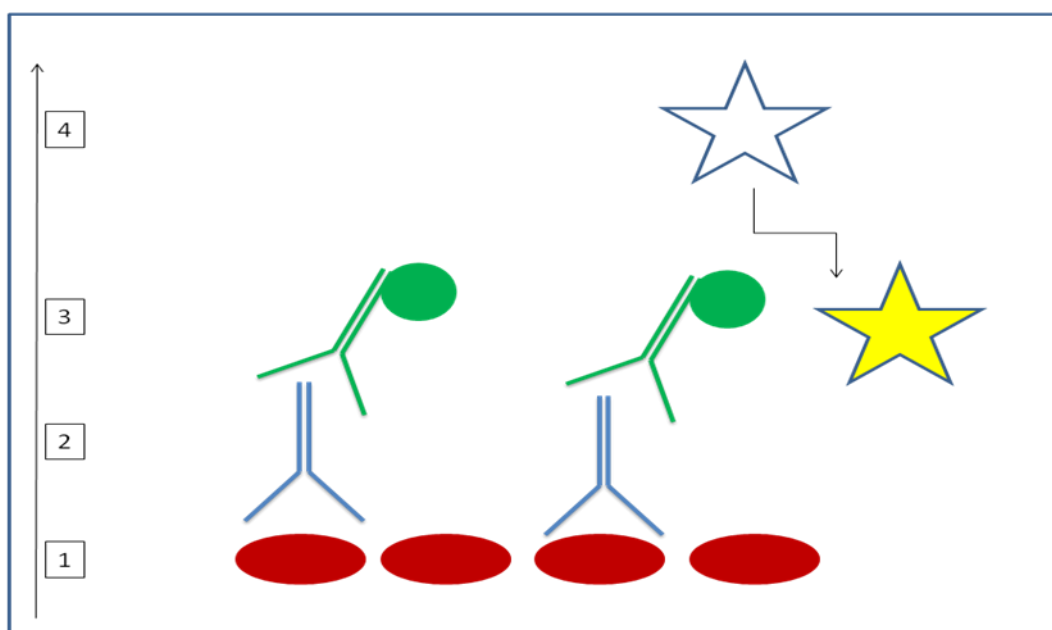


Abbildung 8: Grundprinzip eines indirekten ELISA vgl. *recomWell HEV*® (Mikrogen)

Beim Sandwich-ELISA unterscheidet man wiederum das direkte und das indirekte Verfahren. Im Grunde wird stets ein Antigen zwischen zwei Antikörpern gebunden oder umgekehrt ein Antikörper zwischen zwei Antigenen, wie dies beispielsweise beim Axiom HEV Ab (Firma Axiom GmbH, Bürstadt,

Deutschland) angewandt wird. Das direkte Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper beschichtet wird, dann erfolgt die Bindung des Antigens und schließlich das Aufbringen eines enzymmarkierten Antikörpers, der dann mit Substrat eine messbare Reaktion erzeugt. Nachteil dieses Vorgehens: das Antigen benötigt mindestens zwei Epitope, an die Antikörper binden können. Beim indirekten Sandwich-ELISA wird ein zusätzlicher Antikörper eingesetzt. Er kommt vor dem Auftragen des enzymmarkierten Antikörpers ins Spiel, so dass die Bindung des enzymmarkierten Antikörpers wiederum nicht an das Antigen, sondern an den spezifischen Antikörper erfolgt. Für den Axiom HEV Ab wird der Probenantikörper zwischen zwei rekombinanten Antigenen gebunden, von denen das zweite enzymmarkiert ist (Abbildung 9).

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit rekombinanten Antigenen entspricht dem Vorgehen für den *recomWell* HEV (Mikrogen) (1). Dann folgt das Aufbringen der Patientenprobe mit spezifischen Antikörpern. Diese binden an die Antigene der Plattenbeschichtung (2). Im Anschluss werden die enzymmarkierten rekombinanten Antigene eingesetzt. Diese binden an die zweite variable Region des Probenantikörpers (3). Nach Zugabe des Substrats erfolgt dessen enzymkatalysierte Umsetzung und die Etablierung einer Farbreaktion (4).

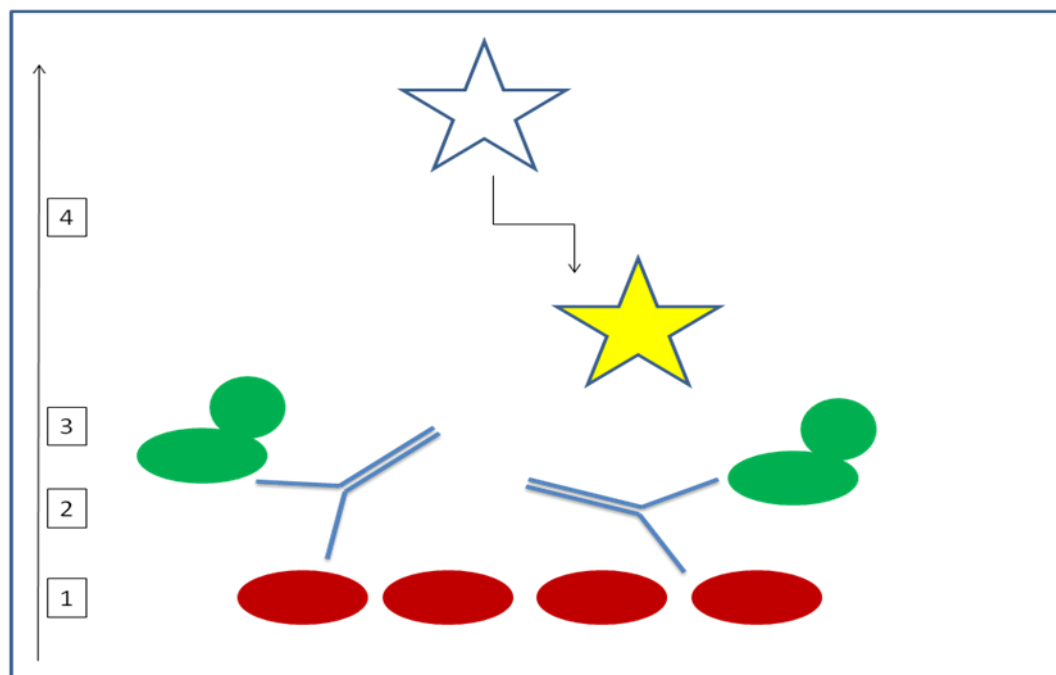


Abbildung 9: Direkter Sandwich-ELISA am Beispiel des Axiom HEV Ab

Im Rahmen eines jeden ELISA werden Kontrollseren mit definierten Extinktionswerten zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben getestet, um eine korrekte Abarbeitung und Funktionsweise des ELISA überprüfen zu können. Dabei benötigt man je eine Positiv- und eine Negativkontrolle, die meist mehrfach aufgetragen werden.

Um eine Probe anhand ihrer Extinktion, auch als optische Dichte bezeichnet (*engl.* optical density, OD), als positiv oder negativ definieren zu können, muss weiterhin ein sogenannter Cutoff festgelegt werden. Dieser legt einen Extinktionsgrenzwert fest, so dass Probenextinktionen, die gleich hoch oder höher sind, als Antikörper-positiv bewertet werden. Je nach Hersteller wird der Cutoff rechnerisch ermittelt, und zwar als Mittelwert der OD's der Negativkontrollen plus eine Konstante, die im Rahmen der Testeinstellung ermittelt wird (vgl. Axiom HEV Ab), oder eine Cutoff-Kontrolle wird mitgeliefert und bei jeder Testung eingesetzt (vgl. *recomWell* HEV, Mikrogen). So kann für Testläufe, die insgesamt höhere oder tiefere Extinktionswerte aufweisen, eine individuelle Anpassung des Cutoffs erfolgen, da auch die Cutoffkontrolle entsprechend höher oder tiefer ausfällt.

Vorteil des ELISA als Methode ist die Vielzahl von Proben, die parallel getestet werden können. Eine Mikrotiterplatte besteht aus 96 Wells, so dass abzüglich der Kontrollseren meist ca. 90 in einem Durchgang getestet werden können. Dies bedeutet auch einen relativ geringen Material- und Kostenaufwand pro Probe. Durch Verdünnungsreihen können Titer bestimmt werden, was eine zusätzliche quantitative Aussage ermöglicht. Die Auswertung erfolgt zeitsparend und unkompliziert im Photometer (Kischel, 2002). Der ELISA eignet sich deshalb in erster Linie als Screening-Test, und aufgrund der großen Anzahl an Proben, die gleichzeitig bearbeitet werden können, für seroepidemiologische Studien (Kischel, 2002).

## **6. Line Assay**

Im Gegensatz zum ELISA werden beim Line Assay die einzelnen Antigene nicht in einem Gemisch aufgetragen, welches dann an den Kunststoff der Mikrotiterplatten bindet, sondern jedes Antigen wird einzeln an einer definierten Lokalisation mit Hilfe eines sogenannten Isoflow Reagent Dispensers (Imagene Technology, Hanover, USA) auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Dieses

Gerät ähnelt einem Kamm, die einzelnen Zinken sind dünne Schläuche, von denen jeder mit einer Antigenlösung verbunden ist. Dieser Kamm wird dann über die darunterliegende Membran geführt und sprüht dabei die Antigenlösungen in dünnen Streifen auf. Somit kann jedes Antigen individuell in einer für dieses Protein optimalen Verdünnungslösung mit entsprechenden Puffern und Konservierungsmitteln gesondert angesetzt und anschließend aufgetragen werden. Bei diesem Verfahren findet im Gegensatz zum Western Blot keine Denaturierung der Proteine statt, wodurch den Probenantikörpern bei der anschließenden Testung konformationsabhängige Epitope als Bindungsstellen zur Verfügung stehen.

Neben einer definierten Anzahl von Antigenen werden zusätzlich eine Inkubationskontrolle, die sicherstellt dass bei der Testdurchführung Probenserum einpipettiert wurde, eine Kontrolle zur Antikörperklasse, die mit dem anti-Spezies-Konjugat reagiert, sowie eine Cutoff-Kontrolle aufgebracht (Abbildung 10). Letztere ergibt stets eine schwächer gefärbte Bande und dient als Entscheidungsgrundlage zur Bewertung der Bandenintensitäten für die Patientenprobe.

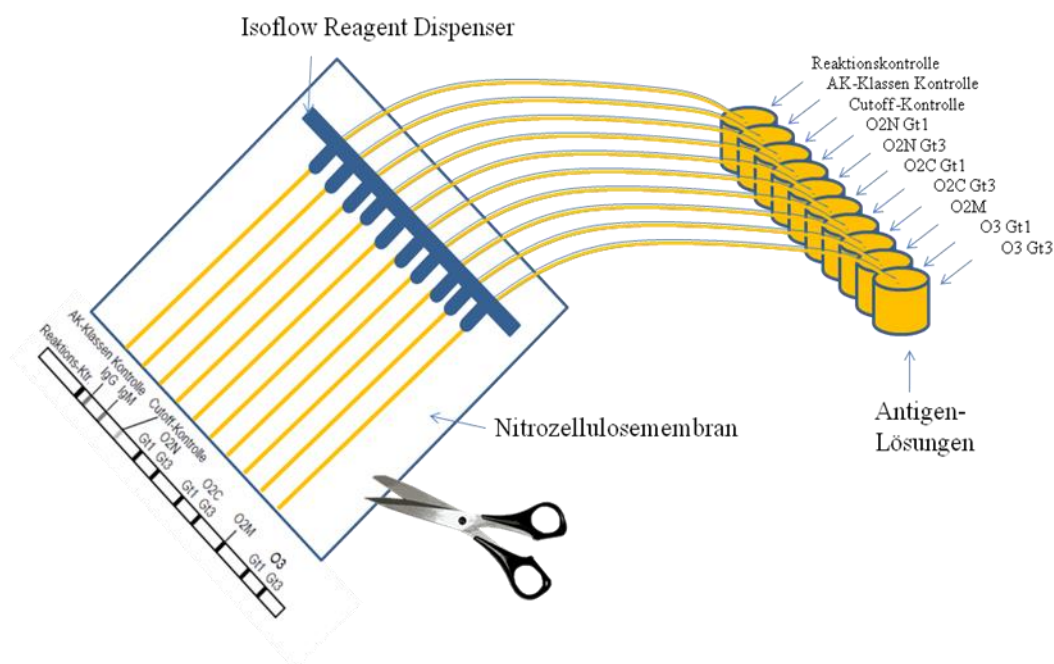


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung von Line-Assay-Teststreifen

Nach dem Aufsprühen der Antigenlösungen wird die Membran für eine Stunde unter Schutz vor Lichteinstrahlung getrocknet. Im Anschluss erfolgt die Absättigung der Nitrozellulosemembran mittels Magermilchlösung. Dies reduziert

unspezifische Bindungen der Antikörper aus dem Proben Serum an die Membran. Reste der Magermilchlösung werden dann dreimal für jeweils 5 min bei leichtem Schütteln abgewaschen. Schließlich wird die Membran über Nacht getrocknet und in 2,2 mm breite Streifen geschnitten, die quer zum Verlauf der aufgesprühten Antigene orientiert sind. Diese stellen den Line-Teststreifen dar (Abbildung 10 und 11).

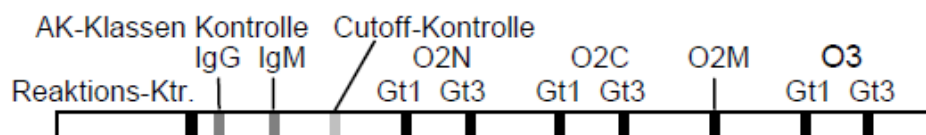


Abbildung 11: Lokalisation der rekombinanten Antigene auf dem *recomLine* HEV (Mikrogen) Teststreifen

Die Testdurchführung des Line Assays entspricht im Hinblick auf die Abarbeitung dem Vorgehen eines indirekten ELISA. Allerdings müssen die Streifen zunächst in speziellen Inkubationswannen mit Verdünnungspuffer eingetaucht werden. Anschließend erfolgt die Zugabe des Proben Serums sowie die Seruminkubation und der erste Waschschrift. Dazu wird die Probenverdünnung aus den Wannen abgesaugt und die Streifen mit sterilem Aqua dest. gespült. Das Prinzip des enzymmarkierten Antikörpers sowie der Farbreaktion mittels Substrat entspricht dem Vorgehen des *recomWell* HEV. Das Abstoppen der Farbreaktion geschieht nicht durch Einbringen von Säure, stattdessen werden die Teststreifen wiederum mit Aqua dest. gespült und im Anschluss auf saugfähigem Papier unter Schutz vor Sonnenlicht getrocknet.

Der Vorteil des Line Assay gegenüber dem ELISA liegt in der Auftrennung von Proteinen auf unterschiedliche Lokalisationen. Dies ermöglicht den Nachweis spezifischer Antikörper gegen die einzelnen HEV-Antigene. Die Sensitivität liegt im Allgemeinen höher als beim ELISA, die Durchführung gestaltet sich dafür aber aufwendiger. Auch können weniger Proben parallel getestet werden. Der Test ist durch einen höheren Materialaufwand kostenintensiver. Die Nitrozellulosestreifen müssen nach Abschluss des Verfahrens vor Licht geschützt aufbewahrt werden, und müssen mit einem speziellen Scan- und Computerprogramm analysiert werden um objektive quantitative Daten zu

erhalten. Aufgrund des höheren Aufwandes und der differenzierten diagnostischen Aussage eines Line Assay eignet sich dieses Verfahren in erster Linie als Bestätigungstest nach bereits erfolgtem ELISA (Kischel, 2002).

Anhand der aufgezeigten Informationen wird deutlich, dass der Bedarf für eine etablierte Screeningmethode zum Nachweis von HEV-Antikörpern beim Schwein als Lebensmittel gegeben ist. Derzeit gibt es auf dem Markt keinen ELISA, der den Genotyp 3 als Antigen enthält. Alle bislang verwendeten Testverfahren verlassen sich auf die vorhandene Kreuzreaktivität zwischen den Genotypen, und fragen den in unseren Regionen endemischen Virusstamm nicht spezifisch ab. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Verfügung gestellt werden, die eine verlässliche diagnostische Aussage auf Grundlage des Genotyp 3 für das Schwein ermöglicht. Um eine Einführung im Bereich der Lebensmittelindustrie und insbesondere am Schlachthof zu erleichtern, soll ein Screening auf der Grundlage von Fleischsaft als Probenmaterial ebenso möglich sein wie die Verwendung von Serum. Eine Prävalenzstudie für den Raum Bayern soll die Relevanz von HEV beim Schlachtschwein für diese Region feststellen.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 7. Material

##### 7.1. ELISA

Die Einstellung des im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten *recomWell* HEV pig für Serum und Fleischsaft (FS) fand auf Grundlage vordefinierter, firmeninterner Schweineseren der Firma Mikrogen statt.

Zur Etablierung der notwendigen Positiv-, Cutoff- und Negativkontrollen für den *recomWell* HEV pig (Mikrogen) wurde an einem separaten Probennahme-Termin an einem bayerischen Schlachthof von insgesamt 12 Tieren jeweils 500 ml Blut in Falcon®-Gefäßen (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgefangen. Das gewonnene Serum wurde mit Oxipyridin und Methylisothiazolon-HCl (jeweils 0,01g pro ml Serum) konserviert. Hiervon wurden 2-ml-Aliquots gebildet, und die Seren wurden unverdünnt mittels des *recomWell* HEV pig getestet.

Zur Einstellung der Kontrollen für die IgG-Austestungen wurde ein anti-HEV-IgG-negatives Serum, welches von dem eben angesprochenen Probennahmetermin stammte, mit firmeninternem Konjugatpuffer (Mikrogen) verdünnt bis zum Erreichen eines Extinktionsniveaus unter 0,1. Dieser Ansatz diente als Grundlage zur Verdünnung der Cutoffkontrolle auf eine OD im Bereich des Mittelwerts der Extinktionen der Negativkontrollen plus 3 Standardabweichungen (Kantala et al.) der Negativseren aus der Testeinstellung. Die Positivkontrolle wurde auf einen Wert von 100 Mikrogen-Units eingestellt, was in etwa einer OD von 1,4 entspricht. Diese Kontrollen fanden Verwendung sowohl bei der IgG-Austestung von Serum als auch von Fleischsaft.

Zur Etablierung von Positiv- und Cutoffkontrollen für die IgM-Austestung wurde ein ähnliches Vorgehen gewählt.

##### 7.2. Line Assay

Der kommerziell erhältliche *recomLine* HEV IgG diente als Referenztest zur Validierung des in dieser Arbeit entwickelten ELISA sowie des Konkurrenztests, (Axiom HEV Ab). Da dieser Line Assay für die Humandiagnostik bereits etabliert und validiert ist, fand keine Neuentwicklung statt, sondern ausschließlich ein

Wechsel des enzymmarkierten Antikörpers von anti-Human auf anti-Schwein. Mit dieser Änderung wurden einige Testläufe mit vordefinierten firmeninternen Schweineseren vorgenommen, um ein einwandfreies Funktionieren des Tests sicherzustellen.

Aufgrund der differierenden Vorgehensweise zum ELISA ist bei der Austestung im Line Assay keine Anwendung von Kontrollseren vonnöten. Jeder einzelne Teststreifen ist mit einer Konjugat-, einer Cutoff- sowie einer Reaktionskontrollbande versehen. Diese dienen als Orientierung bei der qualitativen Auswertung und als Sicherheit für die Korrektheit der Abarbeitung des Tests.

### **7.3. Validierung und Prävalenz**

#### **7.3.1. Material für Validierung**

Als Grundlage für die Überprüfung der Testvalidität dienten 516 porcine Serumproben sowie 198 Fleischsaftproben, die korrespondierenden Serumproben aus der Gesamtheit der 516 beprobten Tieren zugeordnet sind.

#### **7.3.2. Material für Prävalenz**

Serum und Fleischsaft wurde an vier verschiedenen bayrischen Schlachthöfen von Schweinen aus insgesamt 41 unterschiedlichen Mastbetrieben im Zeitraum August 2009 bis Februar 2010 entnommen. Zum Zwecke der Anonymisierung wurde jedem Schlachthof ein Großbuchstabe und jedem Mastbetrieb eine laufende Nummer zugeordnet (Tabelle 3). Beim Stechen der Tiere wurde das austretende Blut aus der Stichstelle mit Falcon®-Gefäßen (Eppendorf) aufgefangen. Die so beprobten Tiere wurden mit einem Schnitt durch die Ohrmuschel markiert. Anschließend wurde nach dem Brühen, Entborsten, Ausnehmen und Spalten der Tiere am Band die laufende Nummer des Schlachthofes von den markierten Tieren notiert, und dann Proben der Zwerchfellpfeiler in einer Größe von ca. 9 cm<sup>2</sup> aus den Schweinehälften herausgeschnitten. Anhand der laufenden Nummer wurden im Anschluss die Informationen über den Herkunftsbetrieb sowie die Ergebnisse der Klassifizierung eingeholt und die Proben entsprechend zugeordnet. Das gewonnene Material wurde anschließend gekühlt transportiert und innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme bei -20 °C tiefgefroren. Das Blut wurde in einer 5810R Zentrifuge



(Eppendorf) bis zum Erreichen einer deutlichen Abtrennung des Blutkuchens zentrifugiert, das Serum in 2 ml Safe-Lock-Gefäße (Eppendorf) abpipettiert und ebenfalls bei -20 °C eingefroren.

Zur Gewinnung der Fleischsaft-Proben wurde die zunächst bei -20 °C tiefgefrorene Zwerchfellmuskulatur bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Stunden aufgetaut. Der dabei austretende Fleischsaft wurde abpipettiert, in Safe-Lock-Gefäße (Eppendorf) umgefüllt und erneut bei -20 °C tiefgefroren. Die gewonnene Menge an Fleischsaft schwankte dabei je nach Größe und Beschaffenheit der Muskelprobe zwischen 0,3 ml und 1,5 ml. Aufgrund der räumlichen und technischen Gegebenheiten war die Sicherstellung der korrekten Zuordnung von Serum und Fleischsaft am Schlachthof nicht immer gegeben, so dass alle Fleischsaftproben, bei denen es im Rahmen der Probennahme zu Unsicherheiten hinsichtlich der Zugehörigkeit zum Serum kam, aus der Testung ausgeschlossen wurden. Schlussendlich kamen 198 Fleischsaftproben zum Vergleich mit den korrespondierenden Seren zum Einsatz.

Tabelle 3: Darstellung der beprobten Schlachthöfe unter Angabe der Mäster und der Anzahl der beprobten Tiere pro Mäster

Schlachthof	Mäster Nr.	Anzahl Tiere	Schlachthof	Mäster Nr.	Anzahl Tiere
A	1	5	B	20	50
	2	15		21	51
	3	2	C	10	22
	4	4		22	14
	5	6		23	58
	6	8		24	2
	7	8		25	2
	8	2		26	1
	9	7	D	35	42
	10	4		36	13
	11	10		37	4
	12	7		38	5
	13	10		39	1
	14	5		40	32
	15	3		41	4
	16	1			
	17	2			
	18	1			
	19	10			
	27	6			
	28	7			
	29	6			
	30	6			
	31	11			
	32	25			
	33	15			
	34	31			

## 8. Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neuer ELISA – der *recomWell* HEV pig – für die Testung von Schweineserum und Schweinefleischsaft auf HEV-Antikörper entwickelt werden und gegen einen konkurrierenden ELISA-Kit, den auf dem Markt befindlichen Axiom HEV Ab, getestet werden. Als Referenzmethode, anhand derer beide Kits verglichen wurden, diente der für die Humandiagnostik kommerziell erhältliche *recomLine* HEV.

## 8.1. Testeinstellung

### 8.1.1. ELISA

#### 8.1.1.1. *recomWell* HEV pig

##### 8.1.1.1.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten

Zur Ermittlung der optimalen Plattenbeschichtung wurden drei Beschichtungstypen parallel getestet und verglichen. Die erste Beschichtungsvariante war der für die Humandiagnostik kommerziell erhältliche *recomWell* HEV®, der ausschließlich mit rekombinanten Proteinen des Genotyp 1 beschichtet ist. Als zweiter Beschichtungstyp kam eine reine Genotyp 3 Beschichtung zum Einsatz, die dritte Variante stellte eine Kombination von rekombinanten Antigenen des Genotyps 1 *und* 3 dar. Alle Plattenbeschichtungen enthalten die Antigene von ORF3 (O3) und ORF2 variierender Genotypen. Während das ORF3-Protein komplett aufgetragen wurde, wurde nur der C- und N-terminale Anteil des ORF2-Proteins (O2C bzw. O2N) als Antigen auf die Platte aufgebracht. Welche Antigene in welcher Beschichtungsvariante genau aufgetragen wurden ist im Vergleich zum *recomLine* HEV in dargestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Rekombinante Antigene der verschiedenen Beschichtungsvarianten im Vergleich zum *recomLine* HEV

Beschichtung	O2C		O2M		O2N		O3	
	Gt1	Gt3	Gt1	Gt3	Gt1	Gt3	Gt1	Gt3
Genotyp 1	x				x		x	
Genotyp 1+3	x	x			x		x	
Genotyp 3		x				x		x
<i>recomLine</i> HEV	x	x	x		x	x	x	x

Diese drei Beschichtungsvarianten wurden dann mit 41 vordefinierten, firmeninternen Schweineseren gegeneinander verglichen. Entscheidend für die Auswahl der Plattenbeschichtung waren die Kriterien Hintergrundreaktivität, das Signal zu Rauschen Verhältnis (*engl.* signal noise ratio, S/N) und die Ergebnisübereinstimmung mit der Referenzmethode, dem kommerziell erhältlichen *recomLine* HEV (Mikrogen).

Die Hintergrundreaktivität gibt die Grundreaktivität negativer Seren an. Dieser

Wert sollte sehr niedrig sein, um einen möglichst großen Abstand zum Cutoffwert zu gewährleisten. Jeder Messwert beinhaltet zwei Komponenten: die eine Komponente enthält die interessierende Information, das Signal, die andere besteht aus zufälligen Fehlern oder Rauschen, das die erste Komponente überlagert. Das Verhältnis dieser beiden Komponenten wird als S/N angegeben und sollte einen möglichst hohen Wert aufweisen.

#### **8.1.1.1.2. Anti-Spezies-Konjugat**

Für das Screening auf Antikörper der Immunglobulinklasse IgG kam ein Peroxidase-markiertes Ziege-anti-Schwein IgG Konjugat (Firma KPL, Maryland, USA) zur Anwendung, das in lyophilisierter Form vorlag. Die Rehydratation erfolgte mit sterilem Aqua dest. nach Angaben des Herstellers. Zur Ermittlung der optimalen Konjugatkonzentration wurden im Laufe der Testeinstellung folgende Vorverdünnungen in sterilem Konjugatpuffer (Mikrogen) mit z.T. variierenden Seren getestet: 1:60, 1:105, 1:120, 1:135 und 1:250. Der Nachweis von anti-HEV-IgM erfolgte mit Hilfe eines peroxidasemarkierten Ziege-anti-Schwein-IgM Konjugats (KPL). Die Verdünnung der Konjugate erfolgte im Konjugatpuffer (Mikrogen).

#### **8.1.1.2. Probenmaterial**

Die laut Gebrauchsinformation (Mikrogen) empfohlene Verdünnung für Serum von 10 µl Serum + 1000 µl Verdünnungspuffer wurde eingehalten. Um eine entsprechende Reaktivität im Fleischsaft zu erzielen wurden zwei Verdünnungen, (1:5 und 1:10) im Vergleich zu den korrespondierenden Seren getestet. Für die 1:5 Verdünnung wurden 50 µl Fleischsaft mit 200 µl Verdünnungspuffer eingesetzt, für die 1:10 Verdünnung waren es 22,2 µl Fleischsaft und 200 µl Verdünnungspuffer. Dieser Ansatz entspricht tatsächlich einer Verdünnung von 1:10,009, und wurde so gewählt, um das zeitsparende Pipettieren des Verdünnungspuffers mit einer Multipette (Eppendorf) zu ermöglichen.

#### **8.1.1.3. Weitere Testkomponenten**

Die zur Testdurchführung notwendigen Substanzen bestanden aus Verdünnungs- und Waschpuffer, Substrat sowie Stopplösung. Sie sind für alle kommerziell erhältlichen Testkits der Firma Mikrogen standardisiert und wurden entsprechend übernommen. Der Waschpuffer wird zehnfach konzentriert geliefert und enthält Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Detergenz und Konservierungsmittel. Die

Endverdünnung erfolgte mit sterilem Aqua dest. im Verhältnis 1:10. Der Verdünnungspuffer ist gebrauchsfertig und enthält Protein, Detergenz, blauen Farbstoff und Konservierungsmittel. Weiterhin wurde ein chromogenes Substrat, nämlich Tetramethylbenzidin (TMB), sowie 24,9 % Phosphorsäure zum Abstoppen der Farbreaktion eingesetzt.

### 8.1.2. Line Assay

#### 8.1.2.1. *recomLine* HEV IgG

Der für die Humandiagnostik kommerziell erhältliche *recomLine* HEV (Mikrogen) wurde als Referenztest verwendet. Die in diesem Testverfahren auf die Nitrozellulosestreifen aufgebrauchten Proteine, die als Bindungsstellen für Probenantikörper dienen, sind mit ihrer Herkunft und Funktion in Tabelle 5 zusammengefasst. Alle Testbestandteile wurden dem kommerziellen Test entnommen, lediglich das im Testkit enthaltene anti-Human-Konjugat wurde gegen ein Kaninchen-anti-Schwein-IgG-Konjugat (Firma Rockland, Gilbertsville, USA) ausgetauscht.

Tabelle 5: Verwendete rekombinante Antigene im *recomLine* HEV

Antigen	Funktion	Herkunft
O2N	N-terminaler Teil des ORF2 Proteins (HEV-Kapsid-Protein)	Genotyp 1, Genotyp 3
O2C	C-terminaler Teil des ORF2 Proteins (HEV Kapsid Protein)	Genotyp 1, Genotyp 3
O2M	Mittlerer Teil des ORF2 Proteins (HEV Kapsid-Protein)	Genotyp 1
O3	ORF3 Protein komplett	Genotyp 1, Genotyp 3

## 8.2. Testdurchführung

### 8.2.1. ELISA

#### 8.2.1.1. *recomWell HEV pig*

Die Seren wurden im Verhältnis 1+100 mit dem firmenintern hergestellten Verdünnungspuffer verdünnt. Hierfür wurden 10 µl Serum mit 1 ml Verdünnungspuffer vorverdünnt. Nach dem Einbringen von 100 µl der verdünnten Seren sowie der Positiv-, Negativ- und Cutoff-Kontrolle in die Wells und der Abdeckung der Platte mittels Klebefolie erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Nach Ende der ersten Inkubationszeit wurden die Kavitäten insgesamt vier Mal mit je 300 µl Waschpuffer maschinell (96 Plate Washer, Firma Tecan, Männedorf, Schweiz) gewaschen. Nach Beendigung des Waschens wurde die Platte einmalig auf sauberem Zellstoff ausgeklopft. Im Anschluss wurde 100 µl Peroxidase-markierte Ziege-anti-Schwein-Konjugatlösung (KPL) in der Verdünnung von 1+100 in Verdünnungspuffer in jede Kavität pipettiert, und die Platte anschließend erneut abgeklebt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschzyklus wurde 100 µl pro Well TMB als Substratlösung zugegeben. Nun erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Platte bei Raumtemperatur unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung. Das Abstoppen der Substratreaktion erfolgte mit 24,9 prozentiger Phosphorsäure (Mikrogen). Die Extinktionsmessung erfolgte innerhalb einer Stunde mittels Photometer (Sunrise Basic, TECAN) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Zur Veranschaulichung wurden die beiden Abarbeitungsprotokolle im Folgenden tabellarisch gegenübergestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Abarbeitungsprotokolle des *recomWell HEV* (Mikrogen) und des Axiom HEV Ab

Vorgehen	Mikrogen <i>recomWell HEV pig</i>	Axiom HEV Ab
Probenmaterial	100 µl pro Well, bestehend aus Probe und Verdünnungspuffer im Verhältnis 1+100	50 µl Probe + 50 µl Verdünnungspuffer pro Well
Probeninkubation	60 min bei 37 °C	30 min bei 37 °C
Waschen	4 Zyklen mit 300 µl Waschpuffer pro Well, Einwirkzeit 10 s	5 Zyklen mit 350 µl Waschpuffer pro Well, Einwirkzeit jeweils 30-60 s
Inkubation mit Peroxidasekonjugat	100 µl HRP-Konjugat pro Well, bestehend aus Konjugat und Verdünnungspuffer 1+100 verdünnt, für 30 min bei 37 °C	100 µl HRP-Konjugat pro Well für 30 min bei 37 °C
Waschen	s.o.	s.o.
Substratreaktion	100 µl Tetramethylbenzidin pro Well, 30 min bei Raumtemperatur, Schutz vor direktem Sonnenlicht	50 µl Harnstoffperoxid und 50 µl Tetramethylbenzidin pro Well, 15 min bei Raumtemperatur, Schutz vor direktem Sonnenlicht
Abstoppen der Reaktion	100 µl 24,9 %ige Phosphorsäure	50 µl Schwefelsäure 2,0 M
Messung der Extinktion	450 nm mit Referenzwellenlänge 650 nm, innerhalb von 60 min nach dem Abstoppen	450 nm mit Referenzwellenlänge 630 nm, innerhalb von 15 min nach dem Abstoppen

#### 8.2.1.2. Axiom HEV Ab

Der Axiom HEV Ab ELISA wurde als Konkurrenztest zum neu entwickelten *recomWell HEV pig* gegen den *recomLine HEV* getestet, und wurde nach Vorgabe des Herstellers mit den im Lieferumfang enthaltenen Komponenten verwendet. Dieser ELISA besitzt eine Beschichtung aus rekombinanten HEV Antigenen, die mit den Strukturproteinen des ORF2 vom nativen Virus korrespondieren.

Verdünnungs- und Waschpuffer sowie Positiv- und Negativkontrollen waren im Lieferumfang enthalten. Der Verdünnungspuffer enthält Protein, Puffer, Casein und Saccharoselösung. Als Waschpuffer dient Phosphatpuffer mit Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween-20) als Netzmittel in zwanzigfacher Konzentration. Die Endverdünnung erfolgte 1:20 mit sterilem Aqua dest. Zwei chromogene Substratlösungen mussten zum Erzielen der Farbreaktion angewandt werden. Die erste enthält Harnstoffperoxid, die zweite

TMB in Zitronensäure gelöst. Als Stopplösung dient eine 2,0 M Schwefelsäure.

Die Abarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers und wird im Folgenden kurz zusammengefasst. Pro Well wurden 50 µl Serum und 50 µl Verdünnungspuffer pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Danach wurde mit 350 µl des im Kit beiliegenden Waschpuffers - der zuvor 1:20 mit sterilem Aqua dest. verdünnt wurde - fünf Mal in einem maschinellen Washer (Tecan) gewaschen. Die Einwirkzeit pro Waschgang betrug 60 Sekunden. Dann erfolgte die Zugabe des HRP-Konjugats und die erneute Inkubation bei 37 °C für 30 min. In den ersten beiden Inkubationsschritten wurde die Platte jeweils mit beiliegender Klebefolie abgedeckt. Nach einem erneuten Waschgang wurden jeweils 50 µl des Chromogen A (Harnstoffperoxid) und Chromogen B (TMB) zugegeben. Durch sanftes Rütteln der Platte wurden die Reagenzien in den Wells gemischt. Nach einer letzten Inkubation von 15 min bei 37 °C unter Ausschluss von Lichteinwirkung wurde 2 M Schwefelsäure als Stopplösung in einer Menge von 50 µl pro Well eingebracht. Die Auswertung per Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 630 nm Referenzwellenlänge erfolgte innerhalb von 15 min nach dem Abstoppen der Substratreaktion (Tabelle 6).

## **8.2.2. Line Assay**

### **8.2.2.1. *recomLine* HEV IgG**

Die Testdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion fand in speziellen Inkubationswannen aus Kunststoff statt, die pro Wanne aus 10 länglichen Vertiefungen bestehen, in der die Teststreifen schwimmen. In jede Vertiefung wurden 2 ml Verdünnungspuffer pipettiert. Anschließend wurde je ein Teststreifen mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht, wobei die Streifennummerierung nach oben gerichtet sein musste. Die Streifen mussten vollständig mit Verdünnungspuffer benetzt sein, was durch vorsichtiges Schwenken erreicht wurde.

20 µl unverdünntes Serum wurde an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Verdünnungspuffer einpipetiert und möglichst schnell durch Schwenken vermischt. Dann wurde die Inkubationsschale mit einem Kunststoffdeckel abgedeckt und auf dem Schüttler eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Für den Waschvorgang wurde aus jeder Kavität der Puffer abgesaugt, wobei nach



jedem Zyklus die maschinelle Absaugvorrichtung mit sterilem Aqua dest. gespült wurde. In jede Vertiefung wurde anschließend 2 ml Waschpuffer eingebracht und die Streifen durch je 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Dieser Zyklus wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Kaninchen-anti-Schwein Peroxidase-Konjugat (Rockland), indem erneut 2 ml des eben beschriebenen Waschpuffers in die Kavitäten pipettiert wurde. Dann wurde 20 µl des Konjugats an ein Ende des Teststreifens in die Pufferlösung pipettiert und zügig vermischt. 45 min Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur folgten. Dabei wurden die Inkubationsschalen wiederum mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

Nach einem erneuten Waschgang wurden in jede Vertiefung 1,5 ml TMB gegeben und mindestens 8 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der Färbeprozess nach achtminütiger Inkubationszeit abgebrochen. Das Abstoppen erfolgte durch Abschütten der Substratlösung und dreimaligem Waschen der Streifen mit sterilem Aqua dest. in den Inkubationswannen. Anschließend wurden die Streifen mit einer Plastikpinzette aus den Inkubationswannen entnommen und zwischen zwei Lagen saugfähigen Papiers für mindestens eine Stunde getrocknet.

### **8.3. Testauswertung**

#### **8.3.1. ELISA**

##### **8.3.1.1. *recomWell* HEV pig**

Der *recomWell* HEV pig arbeitet mit Cutoffkontrollseren, die zusätzlich zu den Positiv- und Negativkontrollen bei jedem Testlauf aufgetragen werden. Der Mittelwert der Extinktionen der Cutoffkontrollen aus einem Testlauf definiert dann individuell den Cutoff für jeden einzelnen Test.

##### **8.3.1.1.1. Qualitative Auswertung**

Der Extinktionswert der Cutoff Kontrolle definiert die Grenze, ab der ein Probenserum als positiv zu bewerten ist. Es wurde ein Graubereich definiert, dessen untere Grenze die OD des Cutoffs darstellte, die obere Grenze war der Cutoff x 1,2. Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereichs wurden als positiv betrachtet, Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches

wurden als negativ angesehen. Proben mit Extinktionswerten im Graubereich galten als grenzwertig.

#### **8.3.1.1.2. Quantitative Auswertung**

Hierfür erfolgte eine Zuordnung der Antikörperaktivität zu einer fiktiven Messgröße, die als Units pro ml angegeben wird. Diese berechnet sich, indem die OD der entsprechenden Probe durch den Wert der Cutoff-Kontrolle geteilt und dann mit 20 multipliziert wird.

U/ml Probe > 24	positive Testergebnis
U/ml Probe < 20	negatives Testergebnis
$20 \leq \text{U/ml Probe} \leq 24$	grenzwertiges Testergebnis

Damit der Test als auswertbar galt, mussten folgende Qualitätskriterien erfüllt werden: (1) die Extinktionswerte der Doppelbestimmung der Cutoffkontrolle durften nicht mehr als 20 % von ihrem Mittelwert abweichen, (2) die Extinktion der negativen Kontrolle lag unter 0,150, (3) die Differenz aus Cutoffkontrolle und Negativkontrolle war größer als 0,050, und (4) die Differenz aus Extinktion der Positivkontrolle und Extinktion der Cutoffkontrolle war größer als 0,300. Wurden diese Bedingungen nicht erfüllt, so musste der Test wiederholt werden.

#### **8.3.1.2. Axiom HEV Ab**

Der Axiom HEV Ab berechnet den Cutoff als Mittelwert der drei Negativkontrollen + 0,12. Zur quantitativen Auswertung wurde die jeweils erzielte OD durch den berechneten Cutoff dividiert (OD Probe / Cutoff). Wurde dabei ein Wert zwischen 0,9 und 1,1 errechnet, so wurde die Probe als fraglich, bei Werten größer 1,1 als positiv eingestuft.

Damit ein Test als auswertbar gilt, mussten folgende Qualitätskriterien erfüllt sein: (1) Die Negativkontrollen mussten OD's unter 0,1 besitzen, falls ein Wert darüber lag, durfte er aus der Berechnung des Cutoffs ausgeschlossen werden. Lagen zwei oder mehr Negativkontrollen über dem angegebenen Wert so musste der gesamte Test wiederholt werden, und (2) die Positivkontrollen mussten Extinktionswerte von mindestens 0,8 erzielen.

### 8.3.2. Line Assay

#### 8.3.2.1. *recomLine* HEV

Für die Auswertung der Teststreifen wurden diese auf den eigens für diesen Zweck entwickelten Auswertebogen aufgeklebt. Das Aufkleben erfolgte so, dass die Reaktionskontrollbanden der Teststreifen auf einer Linie mit der Markierungslinie lagen. Kein Klebstoff durfte rechts von der Reaktionskontrollbande aufgebracht werden, weil dadurch die Färbung verändert werden könnte.

Folgende Voraussetzungen mussten für die Auswertbarkeit der Teststreifen erfüllt werden: (1) die Reaktionskontrollbande musste deutlich gefärbt sein, was beweist dass Serum eingebracht wurde, (2) die Konjugatkontrollbande (zweite und dritte Bande) musste eine deutliche Färbung der entsprechenden reagierenden Antikörperklasse (IgG oder IgM) aufweisen, und (3) die Cutoffkontrolle (vierte Bande) musste schwach aber sichtbar gefärbt sein.

Die Bewertung der Reaktion erfolgte im Vergleich zur Cutoff-Kontrolle. Zur Erleichterung und Objektivierung der Auswertung der gefärbten Banden wurde die *recomScan*-Software (Mikrogen) verwendet. Alternativ kann die Auswertung auch durch Betrachtung der Teststreifen nach der abgebildeten Bewertungsskala erfolgen (Tabelle 7 und 8). Die Cutoff-Kontrollbande dient dabei immer als Bezugspunkt. Eine Färbung der Banden wird je nach Lokalisation mit einer definierten Punktzahl bewertet, die für jeden Teststreifen addiert wird und so zu einer Bewertung der Gesamtreaktivität als positiv oder negativ führt (Tabelle 7). Zu beachten ist, dass für die Reaktion der O2N-, O2C- und O3-Banden nur einmal der Punktwert berechnet wird, unabhängig davon welche und wie viele der O2N-, O2C- und O3-Genotyp Banden reagieren.

Tabelle 7: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Banden	Intensität
Keine Reaktion	-
Sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	+/-
Schwache Intensität (entspricht Cutoff-Bande)	+
Starke Intensität (stärker als Cutoff-Bande)	++
Sehr starke Intensität	+++

Tabelle 8: Punktebewertung der HEV-Antigene und Beurteilung der Testergebnisse

Antigen	Punkte
O2N	2
O2C	4
O2M	2
O3	3

Summe der Punkte	Beurteilung
$\leq 2$	Negativ
3	Fraglich
$\geq 4$	Positiv

## 9. Statistische Analyse

### 9.1. Validierung des Testverfahrens

Die Methodenvvalidierung für den *recomWell HEV pig* fand auf Grundlage der Zertifizierungskriterien für die Markteinführung neuer Testverfahren statt. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Tests wurden verschiedene Leistungskenndaten getestet, die im Folgenden näher erläutert werden.

#### 9.1.1. Sensitivität und Spezifität

Sensitivität und Spezifität prüfen die Richtigkeit eines Testsystems. Dabei erfolgt ein Vergleich der Messwerte aus dem zu etablierenden Verfahren mit den entsprechenden Messwerten aus einem Referenzverfahren. Eventuell vorhandene systematische Messabweichungen werden so identifiziert. Diese beiden Parameter wurden anhand von Vierfeldertafeln bestimmt, in denen der *recomLine HEV* als Referenzmethode diente. Die Sensitivität ist ein Maß für die Anzahl richtig positiver Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der positiven Ergebnisse. Sie wurde berechnet als  $\text{Sensitivität} = a / a+b$ . Die Spezifität gibt die Anzahl richtig negativer Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der negativen Ergebnisse an. Sie wurde wie folgt ermittelt:  $\text{Spezifität} = d / d+c$  (Tabelle 9) Sensitivität und Spezifität wurden getrennt für Serum IgG und IgM sowie Fleischsaft IgG für den *recomWell HEV pig* berechnet.

Tabelle 9: Darstellung der Vierfeldertafel zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität

		Prüfmethode		
		positiv	negativ	Summe
Referenzmethode (= "wahr")	positiv	a	b	a+b
	negativ	c	d	c+d
	Summe	a+c	b+d	a+b+c+d

Sensitivität:	a/a+b	Spezifität:	d/d+c
---------------	-------	-------------	-------

Weiterhin wurde der positive und der negative prädiktive Wert ermittelt. Dabei werden die Ergebnisse der bereits etablierten Referenzmethode als „wahre“ Werte definiert. PPV und NPV hängen von der Prävalenz in der Stichprobe ab, wenn diese hoch ist, entsteht ein hoher PPV und einen niedrigen NPV, bei geringer Prävalenz verhält es sich umgekehrt.

Der positive prädiktive Wert (*engl.* positive predictive value, PPV) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein positives Testergebnis auf einem tatsächlich positiven Ergebnis beruht.

$$\text{PPV} = \frac{\text{Anzahl der Tiere, die in beiden Testverfahren positiv sind}}{\text{Anzahl der Tiere, die in der Prüfmethode positiv sind}} = \frac{a}{a+c}$$

Der negative prädiktive Wert (*engl.* negative predictive Value, NPV) trifft eine Aussage darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein negatives Testergebnis auch tatsächlich negativ ist.

$$\text{NPV} = \frac{\text{Anzahl der Tiere, die in beiden Testverfahren negativ sind}}{\text{Anzahl der Tiere, die in der Prüfmethode negativ sind}} = \frac{d}{b+d}$$

### 9.1.2. Linearität

Biologische bzw. biochemische Reaktionen in der Laboratoriumsmedizin haben oft die Form einer S-Kurve mit drei Bereichen: 1. exponentieller Anstieg, 2. linearer Bereich, 3. Sättigung. Zur Berechnung der Linearität wird i.d.R. die Regressionsgerade für den linearen Abschnitt berechnet, und die davon abweichenden Kurvenverläufe als Endpunkte angegeben. Das sich ergebende  $R^2$  ( $R^2 = \text{Bestimmtheitsmaß} = \text{Steigung der Kurve}$ ) ist beim Faktor 1 optimal - Werte zwischen 0,999 und 0,95 sind zulässig.

Zur Berechnung der Linearität des entwickelten ELISA wurden in unserem Falle für die Serumverdünnung 1 ml, für die Fleischsaftverdünnung 100  $\mu\text{l}$  Verdünnungspuffer vorgelegt, und dann in absteigender Menge 10, 9, 8 usw.  $\mu\text{l}$  einer schwach positiven Probe einpipetiert. Positiv-, Cutoff- und Negativkontrolle liefen im Doppelansatz mit, und die Testung der Verdünnungen erfolgte jeweils im Vierfachansatz.

### 9.1.3. Mikrotiterplattenvarianz (MTP-Varianz)

Zur Ermittlung der Schwankungen innerhalb der Beschichtung einer Mikrotiterplatte wurde ein schwach positives Serum auf 6 Riegel mit jeweils 8 Wells (also insgesamt 48 Wells) einer Platte in immer gleicher Verdünnung aufgebracht. Um Fehler durch Abarbeitung und Pipettieren zu vermeiden, wurde ein großer Verdünnungsansatz von 6 ml Verdünnungspuffer und 60  $\mu\text{l}$  Serum in einem autoklavierten 25 ml Erlenmeyerkolben hergestellt. Dieser wurde mit einem Magnetrührer für 5 min gut durchgemischt. Im Anschluss wurden jeweils 700  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes in eine Reihe eines 2 ml Masterblocks® mit 8 Vertiefung eingebracht, und aus diesem Ansatz mit der 8-Kanal-Pipette je 100  $\mu\text{l}$  auf 8 Riegel der zu testenden Mikrotiterplatte übertragen. Dabei wurde nur jeder zweite der insgesamt 12 Riegel der Mikrotiterplatte verwendet, die letzten drei Riegel wurden umgedreht eingesteckt, um Variationen durch die Abarbeitung auszuschließen. Durch die Auswertung im Photometer erhält der Untersucher schließlich eine tabellarische Darstellung der einzelnen Extinktionswerte für das Testserum in 6 Riegeln zu je acht Wells. Nun wurde für jede Reihe und Spalte zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung der Extinktionswerte berechnet. Anschließend wurden daraus die Variationskoeffizienten in Prozent für jede Reihe / Spalte bestimmt, der sich als Mittelwert der Reihe bzw. Spalte geteilt

durch deren Standardabweichung multipliziert mit 100 errechnet. So erhält man insgesamt  $6 + 8 = 14$  Variationskoeffizienten, deren Mittelwert dann die Qualität des Tests widerspiegelt und unter 10 % liegen soll. Auch sollte möglichst keiner der 14 einzelnen Variationskoeffizienten einen Wert über 10 % erreichen. Die Bestimmung der MTP-Varianz fand unabhängig voneinander für Serum und Fleischsaft statt, das Serum wurde auf die Antikörperklassen IgG und IgM getestet, der Fleischsaft nur auf IgG.

#### **9.1.4. Interassayvarianz**

Die Interassayvarianz dient der Sicherstellung der Präzision eines Testverfahrens. Bei der Ermittlung der Präzision geht es in erster Linie um den Grad der Übereinstimmung zwischen einzelnen, unabhängigen Messergebnissen. Die Präzision wurde von Analyseserie zu Analyseserie in Form einer *Interassay*-Varianz untersucht. Dabei wurde ein Pipettierschema bestehend aus jeweils 9 Seren mit unterschiedlichen Extinktionswerten sowie der Positiv-, Cutoff- und Negativkontrolle für alle drei zu prüfenden Testvarianten (Serum IgG, Serum IgM, Fleischsaft IgG) erstellt. Dieses wurde jeweils identisch und unabhängig voneinander von derselben Person abgearbeitet, und die Extinktionen der Proben anhand ihrer Standardabweichung und der Variationskoeffizienten miteinander verglichen. Dabei sollte die Schwankung in den Extinktionen für jede einzelne Probe so gering sein, dass für jedes Serum sowie die Kontrollen ein Variationskoeffizient von unter 10 % erreicht wurde.

#### **9.1.5. Intrachargenvarianz**

Zur Ermittlung der Intrachargenvarianz, also der Schwankungen innerhalb einer Produktionseinheit von Mikrotiterplatten, wurden jeweils zwei Riegel von drei verschiedenen Mikrotiterplatten vom Anfang, der Mitte und dem Ende der Produktionsreihe einer Charge zusammengesteckt und gegen zwei Riegel einer Referenzplatte aus einer anderen Produktions-Charge verglichen. Neben Positiv-, Cutoff- und Negativkontrolle wurden noch drei positive und zwei negative Seren aufgetragen, so dass insgesamt 8 Seren in einer Reihe jeweils 8 mal aufgebracht wurden. Es wurde dann die Schwankung innerhalb der verschiedenen Seren auf den Riegeln unterschiedlicher Herkunft miteinander verglichen. Hierzu wurde für jedes der 8 Seren die Standardabweichung, der Mittelwert und der Variationskoeffizient über die Riegel unterschiedlicher Herkunft berechnet. Der

Variationskoeffizient soll für jedes einzelne Serum unter 15 % liegen.

### 9.1.6. Interchargenvarianz

Zur Ermittlung der Interchargenvarianz wurden jeweils insgesamt 42 Seren inklusive Positiv-, Cutoff- und Negativkontrolle verwendet. Die Interchargenvarianz wurde für Serum IgG, Serum IgM und Fleischsaft IgG jeweils getrennt ermittelt. Dabei wurden zwei Produktionschargen der neuen Plattenbeschichtung (Nr. 0912 und 1001) mit denselben 42 Seren verglichen. Zur Validierung wurden die Mikrogen-Units für jedes Serum berechnet und anhand der Formel

$$(U/ml \text{ auf Charge } 1001) \div (U/ml \text{ auf Charge } 0912) \times 100$$

die sogenannte Wiederfindung für jedes der 42 getesteten Seren berechnet. Die Wiederfindung liegt im Idealfall bei 100 %, Werte von bis zu +/- 25 % liegen im Toleranzbereich. Einzelne Ausreißer können im Kontext akzeptiert werden.

Für die Serum IgG Austestung waren von den 42 getesteten Seren 12 Negativproben, 2 fragliche Proben und 28 Positivproben. Im Serum IgM waren aus Mangel an Positivproben insgesamt 30 Negativproben, 5 fragliche Proben und 7 Positivproben vertreten. Die Fleischsaft-IgG-Austestung wurde mit 6 Negativproben, 5 fraglichen Proben und 31 Positivproben durchgeführt.

### 9.2. Prävalenzstudie

Die anti-HEV-Seroprävalenz wurde zunächst für jeden der drei verwendeten Tests (*recomWell* HEV pig, Axiom HEV Ab und *recomLine* HEV) einzeln berechnet, sowie zusätzlich mit dem *recomWell* HEV pig für Fleischsaft als Probenmaterial. Im Anschluss wurde eine Gesamtprävalenz berechnet, sowie daraus die Seroprävalenzen in Abhängigkeit vom Schlachthof bzw. vom Mastbetrieb. Eine Probe wurde immer dann als positiv gewertet, wenn sie in mindestens einem der vier ELISA's (Axiom HEV Ab, *recomWell* HEV pig für IgG sowie IgM im Serum sowie *recomWell* HEV pig IgG für Fleischsaft) ein fragliches oder positives Ergebnis erzielte, und dieses durch ein positives Resultat im *recomLine* HEV bestätigt wurde.

Zu näheren Charakterisierung der Einflussgrößen auf die Seropositivität der Schlachtschweine wurde eine logistische Regression berechnet. Insbesondere



interessierte in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Herkunft der Tiere aus einem bestimmten Mastbetrieb oder der Schlachthof an dem das Tier getötet wurde einen Einfluss auf dessen Seropositivität haben.

Grundsätzlich werden bei einer Regressionsanalyse Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen festgestellt. Das zu erklärende Merkmal – in unserem Fall die Seropositivität – wird als abhängige Variable bezeichnet, die erklärenden Merkmale (Schlachthof und Mastbetrieb) als unabhängige Variablen. Bei einem einfachen linearen Regressionsmodell unterstellt man stets einen linearen Zusammenhang zwischen abhängiger Variable  $y$  und unabhängiger Variable  $x$ . Der Wert von  $y$  wird aus den jeweiligen Ausprägungen der zufälligen Variablen  $x$  – die mit geeigneten Gewichten, den sogenannten Regressionskoeffizienten oder Parametern  $\beta$  multipliziert werden – vorhergesagt.

Das Problem des linearen Regressionsmodells ist, dass die abhängige Variable  $y$  metrisch skaliert ist, und theoretisch alle Ausprägungen von  $-\infty$  bis  $+\infty$  annehmen kann, und dass nicht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer bestimmten Ausprägung von  $y$ , sondern die konkrete Ausprägung von  $y$  selbst vorhergesagt wird. Die logistische Regression unterstellt hingegen einen nicht-linearen Zusammenhang zwischen der dichotomen, abhängigen und mindestens einer unabhängigen Variablen als Modellprämisse. Die abhängige Variable  $y$  wird mit 1 und 0 kodiert, in unserem Fall bedeutet 1 „das Schwein ist anti-HEV-positiv“ und 0 „das Schwein ist anti-HEV-negativ“. Änderungen der unabhängigen Variablen in den Extrembereichen von positiv und negativ führen nicht mehr zu wesentlichen Änderungen der Eintrittswahrscheinlichkeit. Die logistische Funktionskurve hat eine geschwungene, S-förmige Gestalt und verläuft punktsymmetrisch, wobei die Symmetrie auf den jeweiligen Wendepunkt der Kurve bezogen ist. Dieser Wendepunkt liegt immer bei einer Eintrittswahrscheinlichkeit  $p_i$  für  $y=1$  von 0,5 (Abbildung 12).

Zur Berechnung des Schlachthofeffekts wurde ein Schlachthof – in unserem Fall der Schlachthof D – willkürlich als Referenzkategorie festgelegt, um die anderen Schlachthöfe hinsichtlich signifikanter Abweichungen in der Seroprävalenz mit diesem Schlachthof vergleichen zu können. Das identische Verfahren wurde für die Betrachtung der Mastbetriebeffekte angewandt, hierbei diente Betrieb Nr. 41 als Referenzkategorie. Für jeden Betrieb bzw. Schlachthof wurde der bereits

beschriebene Parameter  $\beta$  sowie der  $p$ -Wert zur Ermittlung der Signifikanz berechnet. Ein signifikanter Effekt bedeutet, dass ein Schwein aus diesem Mastbetrieb bzw. Schlachthof eine höhere Wahrscheinlichkeit hat HEV-positiv zu sein als ein Tier aus der Referenzkategorie und entsteht immer dann wenn  $\beta$  signifikant von 1 abweicht.

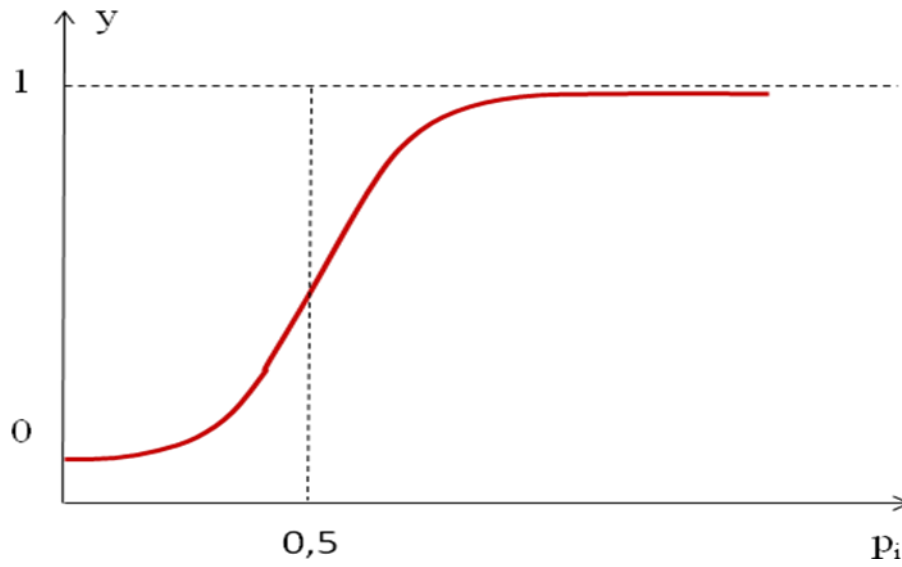


Abbildung 12: Darstellung der logistischen Regressionskurve

## IV. ERGEBNISSE

### 10. Testeinstellung

#### 10.1. *recomWell HEV pig*

##### 10.1.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten

Beim Vergleich der drei Plattenbeschichtungen (Genotyp 1, Genotyp 3 sowie Genotyp 1+3) anhand von 41 vordefinierten firmeninternen porzinen Seren zeigte sich, dass der niedrigste S/N-Wert (4,156) bei der reinen Genotyp 3 Beschichtung erzielt wurde. Zusätzlich wies diese Beschichtung eine höhere Hintergrundreaktivität und niedrigere OD's der positiven Seren auf als die beiden anderen Beschichtungsvarianten (Tabelle 10). Dies führte zum Ausschluss dieser Beschichtung.

Tabelle 10: Vergleich der drei Beschichtungstypen

Formel	Genotyp 1+3	Genotyp 1	Genotyp 3
Mittelwert der Negativproben	0,190	0,143	0,107
Mittelwert der Positivproben	1,356	0,900	0,444
Signal/Noise Ratio	7,154	6,587	4,156
Standardabweichung der Negativproben	0,067	0,035	0,016
Mittelwert+2*Standardabweichung der Negativproben	0,324	0,212	0,138

Beim Vergleich der kommerziellen Genotyp 1 Platte (*recomWell HEV*) mit der experimentellen Genotyp 1+3 Beschichtung zeigte letztere Platte eine höhere S/N-Ratio (Tabelle 10). Im Vergleich mit der Referenzmethode (*recomLine HEV*) zeigten alle drei Beschichtungsvarianten eine Spezifität von 100 %, in Bezug auf die Sensitivität wies die Genotyp 1+3 Beschichtung mit 96,55 % den höchsten Wert auf, gefolgt von der kommerziellen Genotyp 1 Beschichtung mit 90 % und der Genotyp 3 Beschichtung (86,21 %) (Tabelle 11). Im Vergleich mit dem Axiom HEV Ab zeigte bei gleichbleibender Spezifität von 100 % die kommerzielle Genotyp 1 Beschichtung die höchste Sensitivität (94 %), 91 % erreichte die Genotyp 1+3 Beschichtung, die Genotyp 3 Platte wies eine Sensitivität von 79 % auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Genotyp 1+3 Beschichtung als die beste Variante für alle weiteren Austestungen verwendet.

Tabelle 11: Vergleich der drei Beschichtungstypen mit dem Referenztest *recomLine HEV*

		Prüfmethode (GT 1)		
Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )		positiv	negativ	Summe
	positiv	27	3	30
	negativ	0	11	11
	Summe	27	14	41

Sensitivität:	90,00 %	Spezifität:	100,00 %
---------------	---------	-------------	----------

		Prüfmethode (GT 1+3)		
Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )		positiv	negativ	Summe
	positiv	28	1	29
	negativ	0	12	12
	Summe	28	13	41

Sensitivität:	96,55 %	Spezifität:	100,00 %
---------------	---------	-------------	----------

		Prüfmethode (GT 3)		
Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )		positiv	negativ	Summe
	positiv	25	4	29
	negativ	0	12	12
	Summe	25	16	41

Sensitivität:	86,21 %	Spezifität:	100,00 %
---------------	---------	-------------	----------

Tabelle 12: Vergleich der drei Beschichtungsvarianten mit der Konkurrenzmethode (Axiom HEV Ab)

		Prüfmethode (GT 1)		
Referenzmethode (Axiom HEV Ab)		positiv	negativ	Summe
	positiv	31	2	33
	negativ	0	8	8
	Summe	31	10	41

Sensitivität:	94 %	Spezifität:	100 %
---------------	------	-------------	-------

		Prüfmethode: GT 1+3		
Referenzmethode (Axiom HEV Ab)		positiv	negativ	Summe
	positiv	30	3	33
	negativ	0	8	8
	Summe	30	11	41

Sensitivität:	91 %	Spezifität:	100 %
---------------	------	-------------	-------

		Prüfmethode: GT 3		
Referenzmethode (Axiom HEV Ab)		positiv	negativ	Summe
	positiv	26	7	33
	negativ	0	8	8
	Summe	26	15	41

Sensitivität:	79 %	Spezifität:	100 %
---------------	------	-------------	-------

### **10.1.2. Anti-Spezies Konjugat**

Zur Anwendung kam das Ziege-anti-Schwein IgG (KPL), das für alle IgG-Austestungen Verwendung fand. Dieses Konjugat wurde in mehreren Verdünnungsstufen getestet. Dabei zeigt sich die beste S/N Ratio sowie die niedrigste Hintergrundreaktivität bei einer Anwendung des anti-Schwein Konjugats in einer Vorverdünnung von 1:250 im hauseigenen Konjugatpuffer der Firma Mikrogen. Die IgM Austestung erzielte die besten Ergebnisse bezüglich Reaktivität und Hintergrundreaktivität mit einer Verdünnung des Ziege-anti-Schwein IgM (KPL) 1:12,5. Die Endverdünnung erfolgt im kommerziellen Verdünnungspuffer (Mikrogen) 1:100, so dass für die IgG-Austestung eine Endverdünnung von 1:25.000 und für die IgM-Austestung 1:1250 entstand.

### **10.1.3. Probenmaterial**

Zwei Fleischsaftverdünnungen (1:5 und 1:10) wurden gegeneinander getestet, im kommerziell erhältlichen Verdünnungspuffer der Firma Mikrogen. Zunächst schnitt die 1:5 Verdünnung in Hinblick auf S/N Ratio und Hintergrundreaktivität besser ab. Dabei wurden die zwei angesprochenen Verdünnungsstufen des Fleischsaftes gegen die korrespondierenden Seren getestet, und daraus mit Hilfe der Mittelwerte aus Positiv- und Negativproben die S/N Ratio berechnet und verglichen. Ziel war eine möglichst hohe Übereinstimmung der Signalstärken von Fleischsaft und Serum sowie eine möglichst hohe Diskriminierung zwischen Positiv- und Negativproben (Tabelle 13). Allerdings zeigte sich im Laufe der Testvalidierung bei der Ermittlung der Mikrotiterplattenvarianz, dass durch den geringen Verdünnungsfaktor von 1:5 ein höherer Variationskoeffizient (über 35 %) entstand. Deutlichregelmäßigere Ergebnisse lieferte dagegen eine 1:10 Verdünnung; diese erzielte eine MTP-Varianz von 6,7 %. Zur Veranschaulichung wurden die je 48 ermittelten Extinktionswerte der zwei Verdünnungsansätze in einer Grafik gegeneinander aufgetragen (Abbildung 13).

Tabelle 13: Vergleich der zwei Fleischsaftverdünnungen (1:5 und 1:10) mit den korrespondierenden Seren

Formel	Serum IgG	FS IgG 1:5	FS IgG 1:10
Mittelwert der Negativproben	0,155	0,169	0,225
Mittelwert der Positivproben	1,064	0,924	0,846
Signal/Noise Ratio	6,880	5,472	3,761
Standardabweichung der Negativproben	0,077	0,053	0,066
Mittelwert+2xStandardabweichung der Negativproben	0,308	0,275	0,357

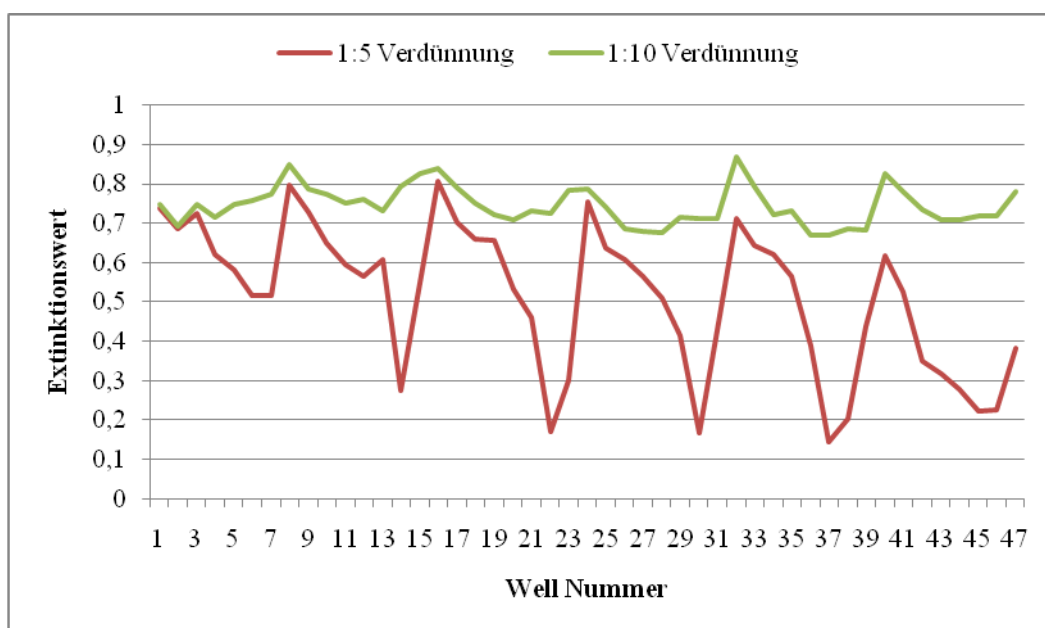


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Schwankung der zwei Fleischsaftansätze in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 auf insgesamt je 48 Kavitäten einer MTP

## 11. Testauswertung

### 11.1. *recomLine* HEV

Im *recomLine* HEV pig konnten über die Summe der Reaktivitäten auf den einzelnen Antigenbanden Rückschlüsse auf die von den Probenantikörpern am stärksten präferierten Epitope gezogen werden. Die höchste Gesamtreaktivität über alle Proben hinweg wies der C-terminale Anteil des ORF 2 vom Genotyp 3 auf, gefolgt vom ORF2C Genotyp 1. Umgekehrt verhielt es sich bei den Genotypen 1 und 3 der N-terminalen Anteile des ORF2, die die zweithöchsten Reaktivitäten zeigen. ORF3 reagierte relativ selten, dabei war der Genotyp 3 geringfügig häufiger und stärker nachzuweisen als der Genotyp 1 (Tabelle 14).

Tabelle 14: Darstellung der Summen der Reaktivitäten für die einzelnen Antigene, fragliche Banden wurden mit 0,5 bewertet, positive je nach Stärke mit 1, 2 oder 3 Punkten

Antigen	O2N1	O2N3	O2C1	O2C3	O2M	O3_1	O3_3
Gesamtreaktivität	499	387	1251	1744	56	185	199

## 12. Statistische Analyse

### 12.1. Validierung des Testverfahrens

#### 12.1.1. Sensitivität und Spezifität

Sensitivität und Spezifität wurden anhand des *recomLine* HEV als Referenzmethode für den *recomWell* HEV pig aus Serum und Fleischsaft und den Axiom HEV Ab bestimmt. Für den *recomWell* HEV wurden Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Mittelwerts der Cutoffkontrollen zur Testvalidierung als positiv gewertet. Im Folgenden sind beide Parameter sowie der positive und der negative prädiktive Wert auf der Grundlage von Vierfeldertafeln aufgeführt. Für den *recomWell* HEV pig errechneten sich im Vergleich zum *recomLine* HEV eine Sensitivität von 90,96 % und eine Spezifität von 94,04 %. Der PPV betrug 97,36 %, der NPV 81,14 % (Tabelle 15). Der Axiom HEV Ab erreichte im Vergleich zum *recomLine* HEV eine Sensitivität und Spezifität von 95,62 % bzw. 80,79 %. Der PPV lag bei 92,32 %, der NPV betrug 88,41 % (Tabelle 16). Bei Verwendung von Fleischsaft als Probenmaterial im *recomWell* HEV pig lag die Sensitivität bei 86,39 %, die Spezifität bei 98,04 %. Die Berechnung des PPV ergab einen Wert von 99,22 %, die des NPV 71,43 % (Tabelle 17). Die Ergebnisse der letzten Berechnung sind unter dem Gesichtspunkt zu betrachten, dass die Resultate des *recomLine* HEV aus Serum generiert wurden, so dass an dieser Stelle nicht nur zwei differierende Testverfahren sondern auch zwei unterschiedliche Probenmaterialien miteinander verglichen wurden.



Tabelle 15: Sensitivität und Spezifität des *recomWell HEV pig* im Vergleich zum *recomLine HEV* als Referenzmethode

Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )	Prüfmethode ( <i>recomWell HEV Pig IgG</i> )			
		positiv	negativ	Summe
positiv		332	33	365
negativ		9	142	151
Summe		341	175	516

Sensitivität:	90,96 %	Spezifität:	94,04 %
---------------	---------	-------------	---------

Positiver prädiktiver Wert:  $332 / 341 = 97,36 \%$

Negativer prädiktiver Wert:  $142 / 175 = 81,14 \%$

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität des *Axiom HEV Ab* im Vergleich zum *recomLine HEV* als Referenzmethode

Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )	Prüfmethode ( <i>Axiom HEV Ab</i> )			
		positiv	negativ	Summe
positiv		349	16	365
negativ		29	122	151
Summe		378	138	516

Sensitivität:	95,62 %	Spezifität:	80,79 %
---------------	---------	-------------	---------

Positiver prädiktiver Wert:  $349 / 378 = 92,32 \%$

Negativer prädiktiver Wert:  $122/138 = 88,41 \%$

Tabelle 17: Vergleich des *recomWell HEV pig* für Fleischsaft (FS) mit dem *recomLine HEV* als Referenzmethode

Referenzmethode ( <i>recomLine HEV</i> )	Prüfmethode ( <i>recomWell HEV Pig FS IgG</i> )			
		positiv	negativ	Summe
positiv		127	20	147
negativ		1	50	51
Summe		128	70	198

Sensitivität:	86,39 %	Spezifität:	98,04 %
---------------	---------	-------------	---------

Positiver prädiktiver Wert:  $127 / 128 = 99,22 \%$

Negativer prädiktiver Wert:  $50 / 70 = 71,43 \%$

#### 12.1.1.1. Vergleich *recomWell HEV Pig IgG Serum* und *Fleischsaft*

Die Korrelation zwischen dem *recomWell HEV pig* für Serum und für Fleischsaft lag bei 0,94 und wurde in einem Punktediagramm veranschaulicht (Abbildung 14).

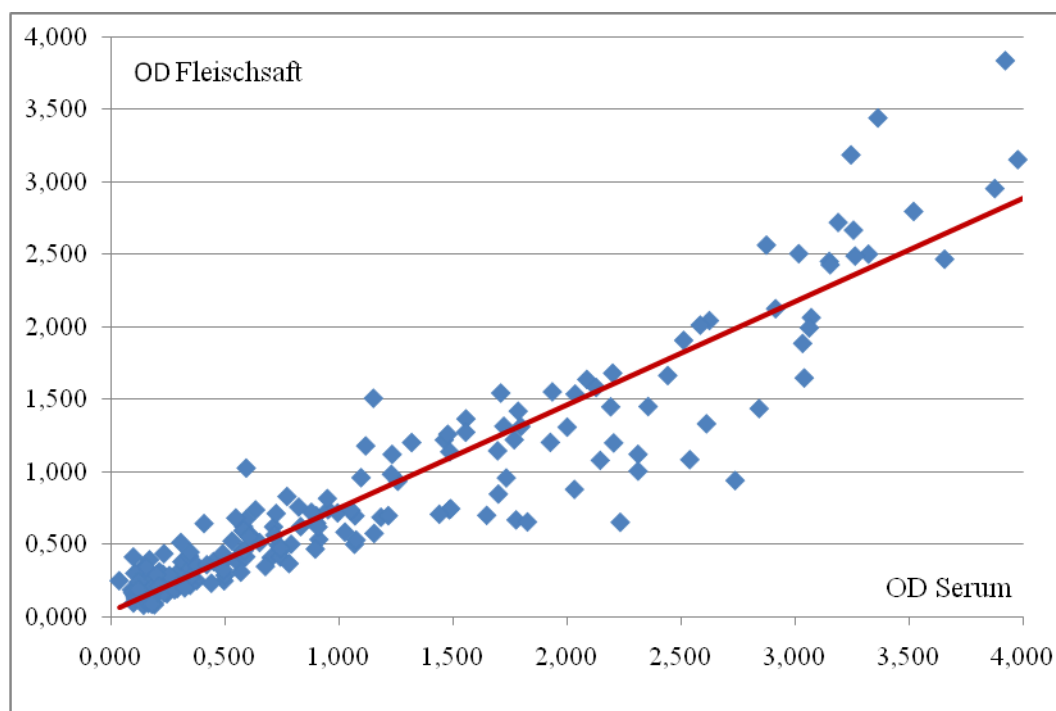


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen den Extinktionen im Serum und im korrespondierenden Fleischsaft im *recomWell HEV pig*

Beim Vergleich der Serum- sowie der Fleischsaftaustestung in einer Vierfeldertafel errechnete sich für den recomWell HEV pig FS als Prüfmethode eine Sensitivität von 97,64 % und eine Spezifität von 94,37 % (Tabelle 18).

Tabelle 18: Vergleich des *recomWell HEV pig* für Fleischsaft und Serum

		recomWell HEV pig FS		
		positiv	negativ	Summe
recomWell HEV pig	positiv	124	3	127
	negativ	4	67	71
	Summe	128	70	198

Sensitivität:	97,64 %	Spezifität:	94,37 %
---------------	---------	-------------	---------

### 12.1.2. Linearität

Die Bestimmung des linearen Bereiches erfolgte für die Serumaustestung mit den Immunglobulinklassen IgG und IgM, in der Fleischsafttestung wurde IgG abgefragt. Für die Serum-IgG-Austestung wurde ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,9951 errechnet (Abbildung 15). Nach demselben Prinzip wurde  $R^2$  für Serum-IgM-Antikörper bestimmt, dabei ergab sich ein Wert von 0,9781 (Abbildung 16). Die Bestimmung des linearen Bereiches für den Fleischsaft mit einer um den Faktor 10 niedrigeren Verdünnung führte zu einem  $R^2$  von 0,9962 (Abbildung 17). Damit ergaben alle drei Linearitätsbestimmungen Werte, die deutlich über dem geforderten  $R^2$  von 0,95 liegen.

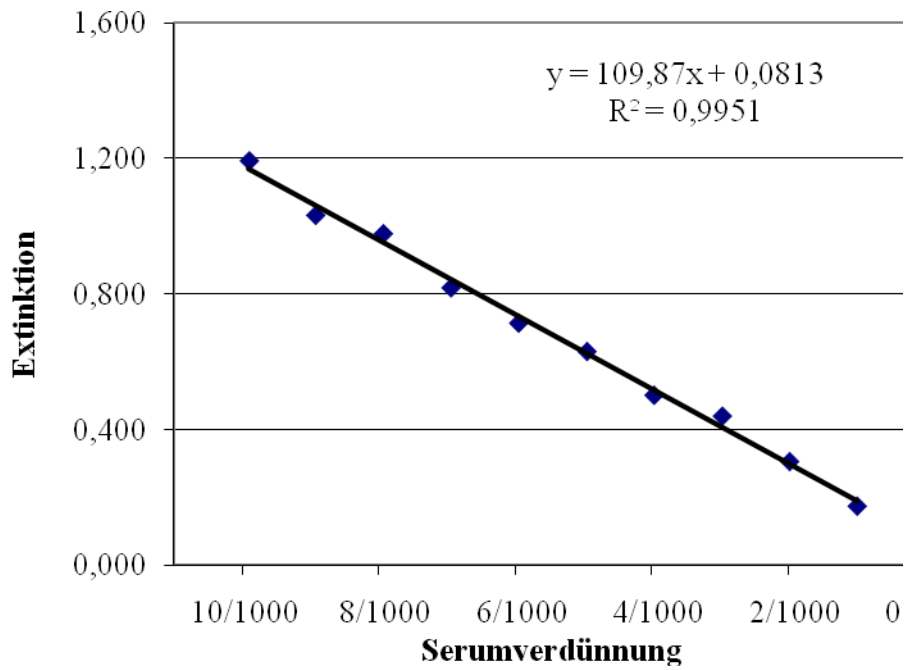


Abbildung 15: Linearität für den recomWell HEV pig IgG

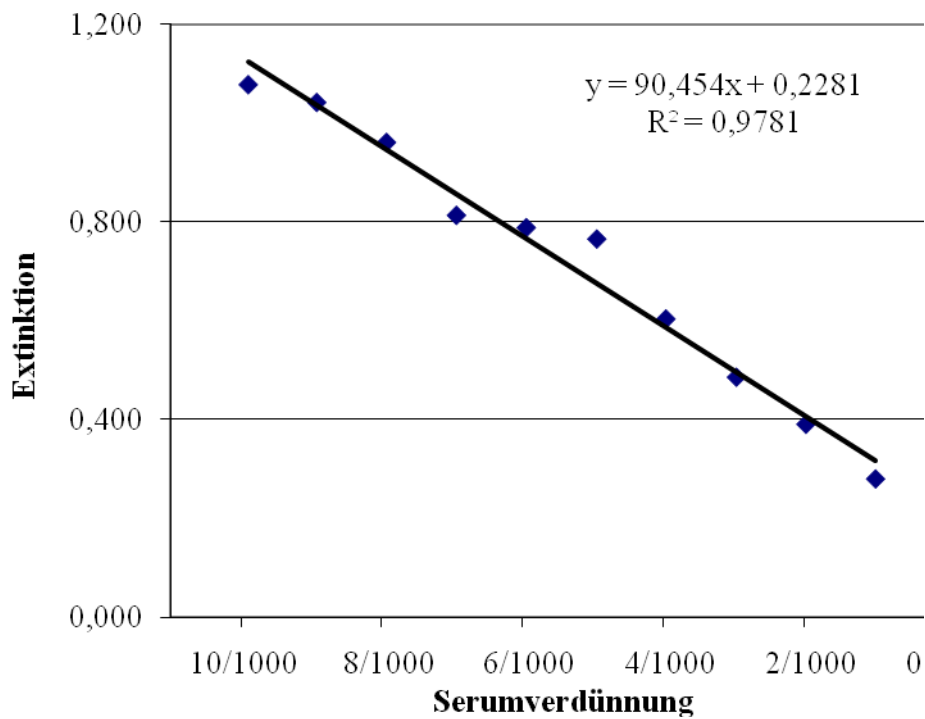


Abbildung 16: Linearität für den recomWell HEV pig IgM

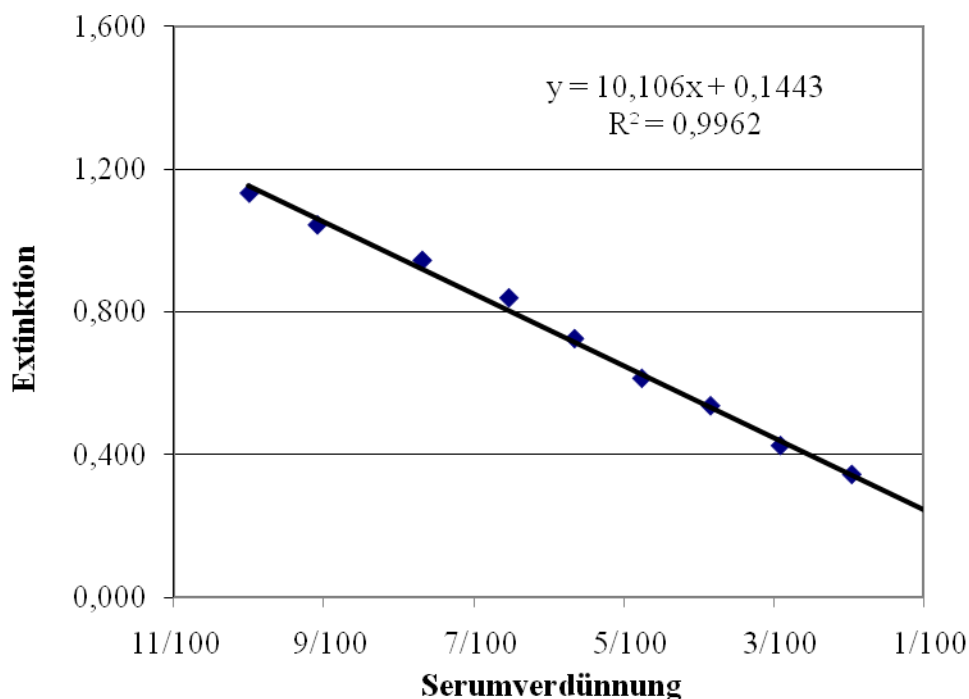


Abbildung 17: Linearität für den *recomWell* HEV pig IgG FS

### 12.1.3. Mikrotiterplattenvarianz

Die MTP-Varianz lag für den *recomWell* HEV pig in der IgG-Austestung mit Serum als Probenmaterial bei 7,2 %. Der Variationskoeffizient (Mittelwert / Standardabweichung \* 100) wurde für alle Zeilen und Spalten der insgesamt 48 Einzel-Extinktionswerte separat berechnet. Das Minimum lag für diese Austestung bei 1,1 %, das Maximum bei 9,5 %. Die Testung eines ausgewählten Serums auf IgM-Antikörper in 48 Wells ergab eine MTP-Varianz von 6,7 % mit einem Minimum von 2,8 % und einem Maximum von 8,5 %. Für den Fleischsaft-ELISA errechnete sich eine MTP-Varianz von 6,7 %. Hier lag das Minimum bei 3,0 % und das Maximum bei 6,9 %. Zur Veranschaulichung wurden die Schwankungen der Extinktionen in den 48 Wells als Diagramme dargestellt, und zwar für die Austestung auf IgG im Serum (Abbildung 18), für Serum IgM (Abbildung 19) und Fleischsaft IgG (Abbildung 20).

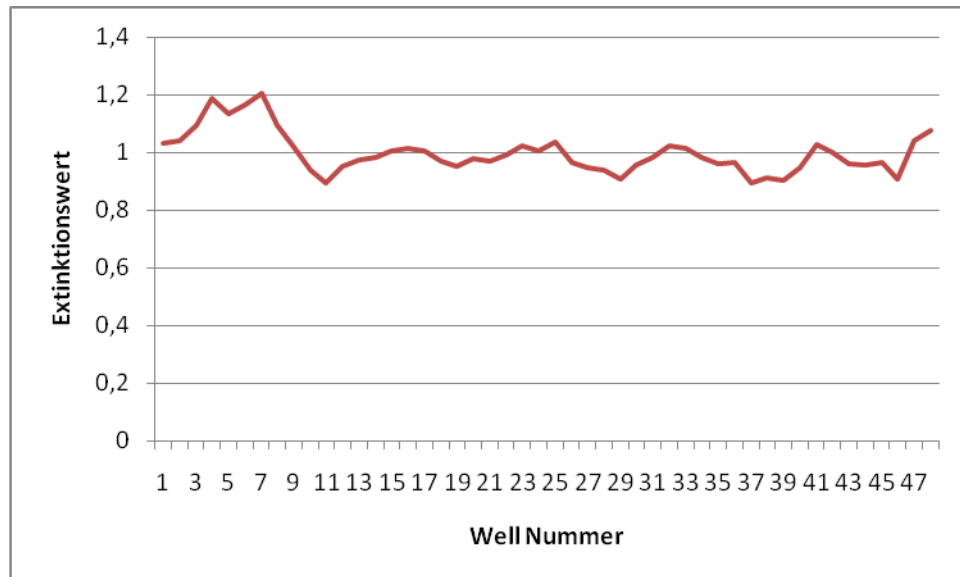


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des *recomWell HEV pig IgG*

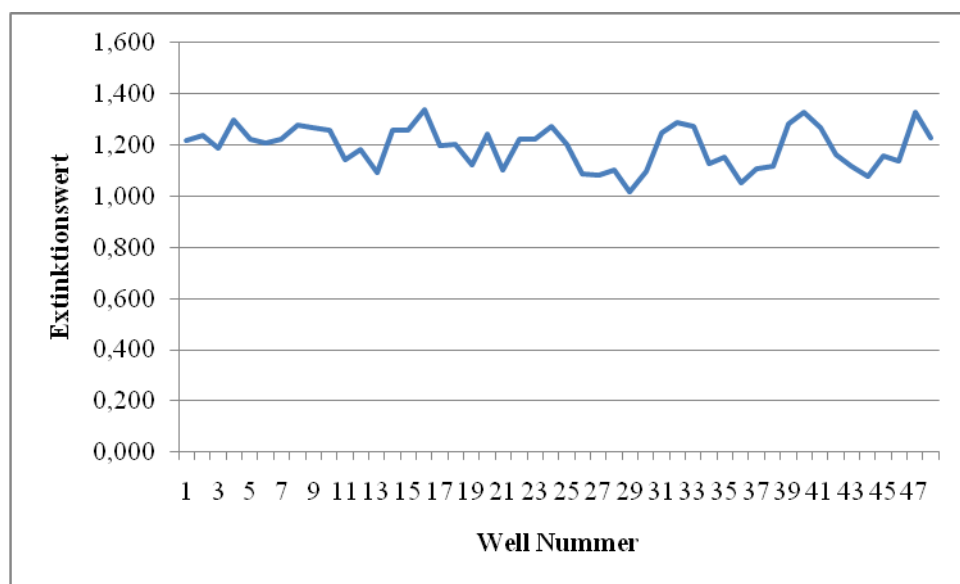


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des *recomWell HEV pig IgM*

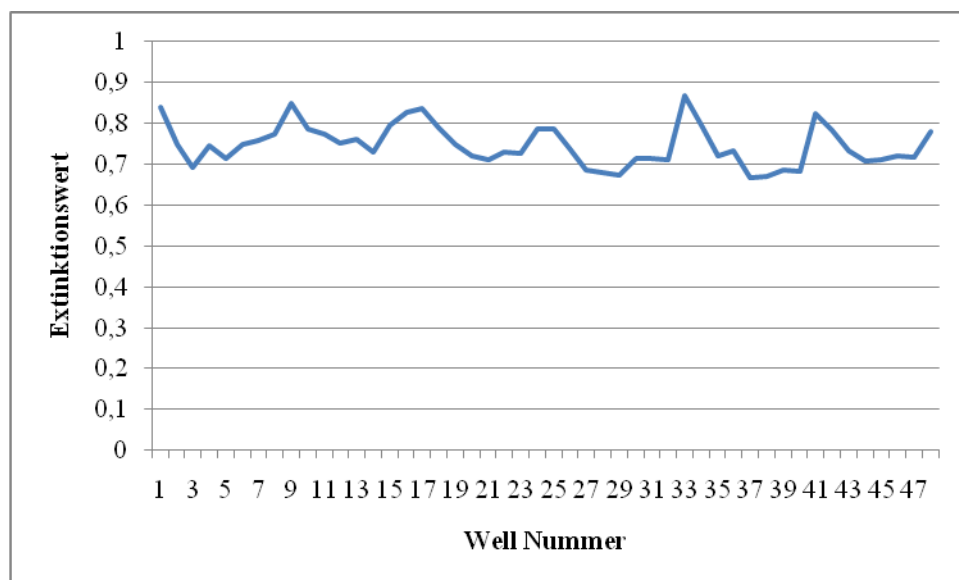


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des *recomWell HEV pig IgG* mit Fleischsaft als Probenmaterial

#### 12.1.4. Interassayvarianz

Für die Interassayvarianz, die ebenfalls in allen drei Testversionen abgefragt wurde, ergaben sich für die jeweils 12 getesteten Seren folgende Werte: die Serum-IgG-Austestung erreichte eine mittlere Interassayvarianz von 7,5 % bei einem Minimum von 6,3 % und einem Maximum von 9,8 % (Tabelle 19). Für den *recomWell HEV pig* ergab sich bei der IgM-Variante eine mittlere Interassayvarianz von 7,4 % mit einem Minimum von 6,3 % und einem Maximum von 9,9 % (Tabelle 20). Bei der Verwendung von Fleischsaft als Probenmaterial wurde eine Interassayvarianz von 6,5 % bei einem Minimum von 4,2 % und einem Maximum von 9,9 % bestimmt (Tabelle 21). Alle Werte lagen somit unter dem erforderlichen Grenzwert von 10 %, womit auch dieses Validierungskriterium für alle drei Testvarianten erfüllt wurde.

Tabelle 19: Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Serum IgG

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{x}$ (Units)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{x} / SD * 100$ )
PK	94,15	6,05	6,43
CK	20,00	0,00	0,00
NK	4,61	0,40	8,76
Probe 1	37,33	3,12	8,37
Probe 2	37,50	3,37	8,99
Probe 3	65,83	4,79	7,27
Probe 4	49,40	4,86	9,84
Probe 5	71,82	4,56	6,34
Probe 6	82,64	7,48	9,05
Probe 7	98,15	8,03	8,19
Probe 8	43,14	4,22	9,78
Probe 9	46,39	3,15	6,79
Mittlere Interassayvarianz:			<b>7,48</b>

Tabelle 20: Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Serum IgM

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{x}$ (Units)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{x} / SD * 100$ )
PK	67,83	6,63	9,77
CK	20,00	0,00	0,00
NK	7,36	0,65	8,84
Probe 1	7,84	0,53	6,78
Probe 2	22,72	1,91	8,41
Probe 3	38,17	3,18	8,34
Probe 4	20,24	2,00	9,88
Probe 5	21,67	1,81	8,37
Probe 6	57,32	3,82	6,66
Probe 7	25,97	2,20	8,46
Probe 8	53,51	3,37	6,29
Probe 9	23,59	1,78	7,53
Mittlere Interassayvarianz:			<b>7,44</b>



Tabelle 21: Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Fleischsaft IgG

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{x}$ (Units)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{x} / SD * 100$ )
PK	88,29	3,78	4,29
CK	20,00	0,00	0,00
NK	4,79	0,25	5,21
Probe 1	60,07	5,67	9,44
Probe 2	56,32	5,12	9,09
Probe 3	87,25	5,37	6,16
Probe 4	55,93	5,38	9,62
Probe 5	48,60	3,13	6,44
Probe 6	63,06	6,24	9,89
Probe 7	42,23	2,25	5,34
Probe 8	76,38	3,24	4,24
Probe 9	77,62	6,22	8,02
Mittlere Interassayvarianz:			<b>6,48</b>

### 12.1.5. Intrachargenvarianz

Zur Erfüllung dieses Validitätskriteriums musste für jedes einzelne getestete Serum ein Variationskoeffizient von unter 15 % erreicht werden. Die tabellarische Darstellung listet die jeweiligen 8 getesteten Seren auf, die dann in einer Reihe auf 3 verschiedenen Riegeln einer Charge und einem Riegel aus einer Referenzcharge jeweils im Doppelansatz aufgetragen wurden. Die Resultate der Referenzcharge wurden aus der Berechnung ausgeschlossen. Es wurde für jedes Serum der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Dabei ergab sich für den Nachweis von anti HEV IgG mit dem *recomWell* HEV pig mit Serum ein mittlerer Variationskoeffizient von 4,2 %, das Minimum lag bei 2,8 %, das Maximum bei 6,3 % (Tabelle 22). In der Austestung auf IgM-Antikörper wurde ein mittlerer Variationskoeffizient von 6,9 % mit einem Minimum von 2,6 % und einem Maximum von 13,3 % erreicht (Tabelle 23). In der dritten Austestung wurde anti-HEV IgG im Fleischsaft nachgewiesen. Der mittlere Variationskoeffizient lag hier bei 5,2 % mit einem Minimum von 2,3 % und einem Maximum von 9,8 % (Tabelle 24). Somit wurde in allen drei Austestungsvarianten die Intrachargenvarianz als Validitätskriterium erfüllt.

Tabelle 22: Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig IgG

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{X}$ (Extinktionen)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{X} / SD * 100$ )
PK	1,147	0,058	5,022
CK	0,236	0,008	3,183
NK	0,044	0,001	2,882
317	0,096	0,004	3,689
343	1,012	0,064	6,276
345	1,058	0,041	3,857
348	0,120	0,005	4,488
350	0,940	0,039	4,146
Mittlere Intrachargenvarianz:			<b>4,193</b>

Tabelle 23: Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig IgM

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{X}$ (Extinktionen)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{X} / SD * 100$ )
PK	1,288	0,079	6,157
CK	0,324	0,016	4,995
NK	0,100	0,006	6,321
315,000	0,128	0,017	13,346
316,000	0,105	0,009	8,562
321,000	0,961	0,052	5,366
327,000	0,490	0,013	2,553
345,000	0,324	0,024	7,562
Mittlere Intrachargenvarianz:			<b>6,858</b>

Tabelle 24: Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig FS IgG

Proben Nr.	Mittelwert $\bar{X}$ (Extinktionen)	SD	Variations-Koeffizient ( $\bar{X} / SD * 100$ )
PK	1,176	0,027	2,299
CK	0,256	0,011	4,350
NK	0,055	0,003	5,933
317	0,116	0,007	6,336
343	0,648	0,049	7,623
345	0,533	0,019	3,545
348	0,682	0,014	2,095
350	0,221	0,022	9,814
Mittlere Intrachargenvarianz:			<b>5,249</b>

### 12.1.6. Interchargenvarianz

Für die Serum IgG Austestung wurde eine mittlere Wiederfindung von 100,1 % erreicht. Ein Serum lag in der Wiederfindung oberhalb des Toleranzbereiches von 100 % +/- 25 % mit einem Wert von und 134,8 %, wobei es sich hierbei um ein negatives Serum handelte und es zu keiner Änderung der Bewertung kam. Bei der Ermittlung der Interchargenvarianz für Serum IgM erfüllten alle 42 Seren die Anforderungen. Die mittlere Wiederfindung lag bei 100,0 %. In der Fleischsaft-IgG Variante lag die mittlere Wiederfindung bei 90,7 %, zwei Proben lagen unterhalb des Toleranzbereichs. Bei einem der Seren handelte es sich um eine negative Probe (61,5 %) und bei der positiven Probe war die Abweichung nur 31,2 %. Es kam zu keiner Bewertungsänderung.

## 12.2. Prävalenzstudie

Zur Ermittlung der anti-HEV-Seroprävalenz wurde im *recomWell* HEV pig mit der Beschichtung aus rekombinanten Antigenen des Genotyp 1 und 3 gearbeitet. Die Serumverdünnung von 1+100 (10 µl Serum + 1 ml Verdünnungspuffer) wurde eingehalten. Für die IgG-Austestung fand das Ziege-anti-Schwein-IgG-Konjugat (KPL) in einer Endverdünnung von 1:25.000 Verwendung, für die IgM-Austestung das Ziege-anti-Schwein-IgM-Konjugat (KPL) in einer Endverdünnung von 1:1250. Für die Fleischsaftverdünnung wurden 22,2 µl Fleischsaft mit 200 µl Verdünnungspuffer (Mikrogen) angesetzt. Das IgG-Konjugat war für Serum- und Fleischsaftaustestung identisch. Alle weiteren Testkomponenten stammten aus dem kommerziellen *recomWell* HEV für die Humandiagnostik. Die Abarbeitung des Axiom HEV Ab erfolgte streng nach Protokoll, für den *recomLine* HEV wurde das Kaninchen-anti-Schwein Konjugat (Rockland) in einer Endverdünnung von 1:7500 verwendet. Alle weiteren Komponenten wurden auch hier dem kommerziellen Test entnommen und entsprechend angewandt.

### 12.2.1. Prävalenz für anti-HEV

Die Seroprävalenz für anti-HEV-IgG der 516 beprobten Tiere betrug im *recomWell* HEV pig IgG (Mikrogen) 67,8 %, im Axiom HEV Ab ELISA lag sie bei 73,3 %, im *recomLine* HEV lag die Seroprävalenz bei 71,3 %. Für den Fleischsaft berechnete sich eine anti-HEV-IgG-Prävalenz von 67,6 %. Die endgültige Bewertung der Proben als positiv bzw. negativ beruhte auf einer Reaktivität der Probe in mindestens einem der drei ELISAs (Axiom HEV Ab,

*recomWell HEV pig IgG* und *recomWell HEV pig IgM*) und einer Bestätigung der Positivität im *recomLine HEV*. Auf Grundlage dieses Entscheidungskriteriums ergab sich eine endgültige anti-HEV-IgG-Seroprävalenz bei bayerischen Schlachtschweinen von 68,6 %.

Im *recomWell HEV pig IgM* zeigten sich 7,0 % der porcinen Seren reaktiv, d.h. fraglich oder positiv, das sind 36 der 516 beprobten Tiere. 2,5 % (13 Tiere aus den 516 beprobten Schlachtschweinen wiesen fragliche Ergebnisse auf. Von den 36 IgM-reaktiven Proben waren 8,3 % (3 Tiere) IgG-negativ, die restlichen Seren waren sowohl IgG- als auch IgM-reaktiv.

### 12.2.2. Daten bezogen auf Schlachthöfe

Jedem Schlachthof wurde zur Anonymisierung ein Großbuchstabe (A, B, C und D) zugeordnet. Anschließend wurde für alle vier Schlachthöfe die jeweilige anti-HEV-IgG-Seroprävalenz berechnet. Dies ergab folgende Werte: für Schlachthof A lag die Seroprävalenz der dort beprobten Tiere bei 71,0 %, für Schlachthof B bei 91,1 %, für Schlachthof C bei 34,3 % sowie für Schlachthof D bei 71,3 % (Abbildung 21).

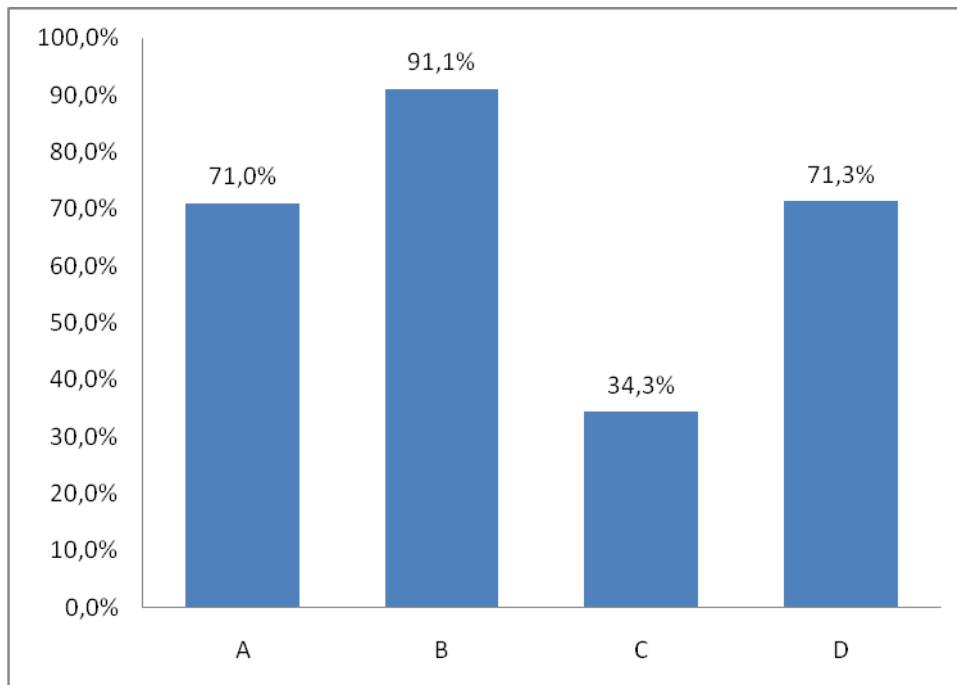


Abbildung 21: Anti-HEV-IgG Seroprävalenzen an den vier beprobten Schlachthöfen

### 12.2.3. Daten bezogen auf Mäster

Jedem Mastbetrieb wurde zum Zweck der Anonymisierung eine fortlaufende Nummer in chronologischer Reihenfolge der Probennahme zugeteilt. Im Anschluss wurde für jeden Mäster einzeln der Prozentsatz positiver Tiere berechnet und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 22). Bei Ausschluss der Betriebe, von denen weniger als 10 Tiere beprobt wurden, zeigte sich in den meisten Betrieben eine Prävalenz von mindestens 70 %. Ein Betrieb zeigte eine anti-HEV-IgG-Prävalenz von 46,2 %. Außerdem wurde ein Betrieb mit einer Seroprävalenz von 0,0 % gefunden sowie ein weiterer Mäster mit 6,9 % (Abbildung 23).

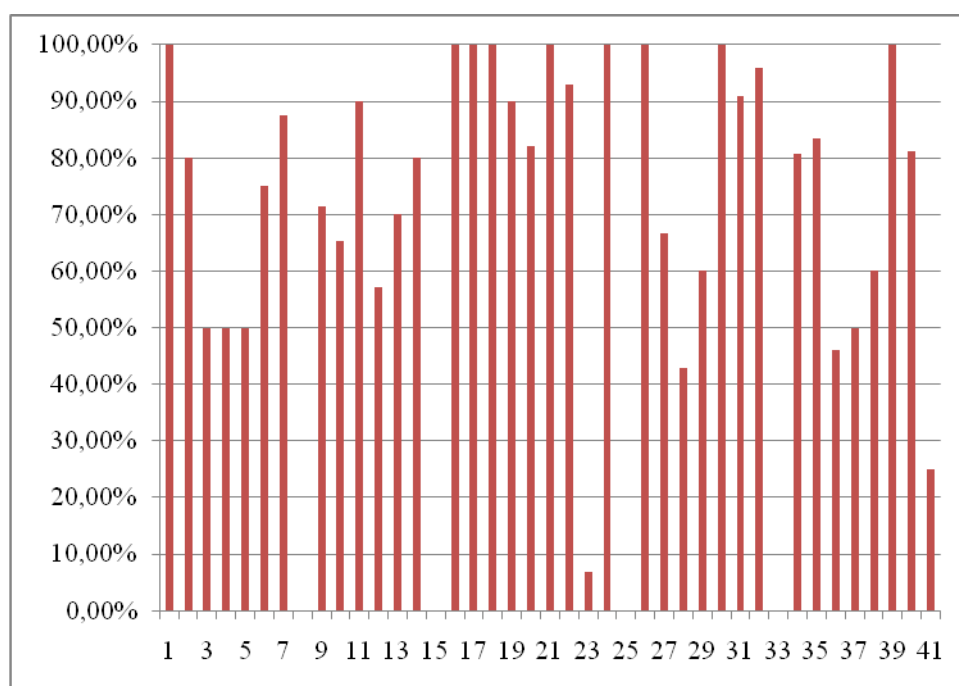


Abbildung 22: Darstellung der Seroprävalenzen anhand der einzelnen Mastbetriebe

Auf der Grundlage der Herkunftsinformationen wurde eine thematische Landkarte erstellt, um die Lokalisation der einzelnen Mäster sowie die Spannen der Seroprävalenzen für jeden beprobten Mastbetrieb in Bayern darzustellen. Je größer das den Herkunftsort der Schweine markierende Kreuz, desto höher war die Seroprävalenz des Mästers (Abbildung 24).

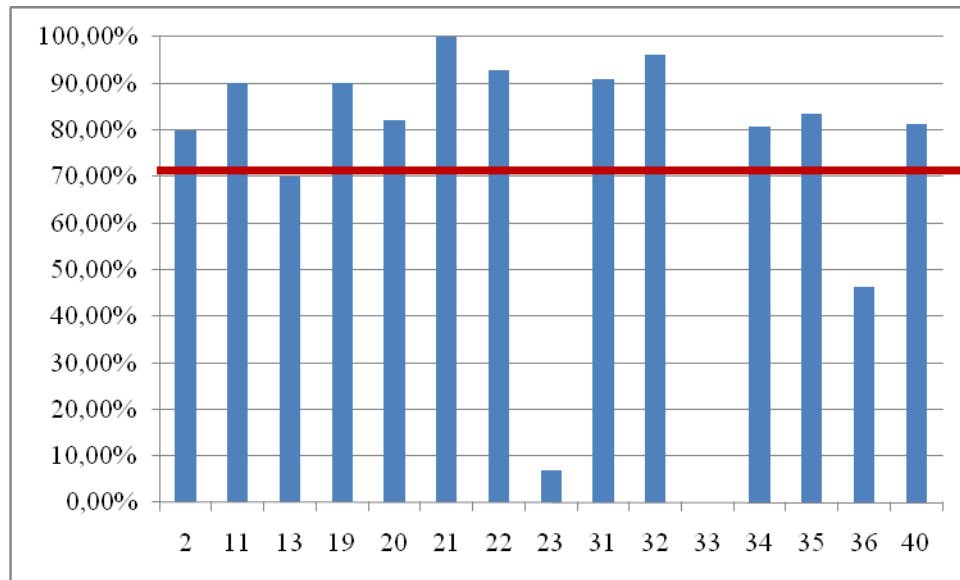


Abbildung 23: Darstellung der Seroprävalenzen anhand der Mastbetriebe für alle Teilstichproben mit mehr als 10 Schweinen

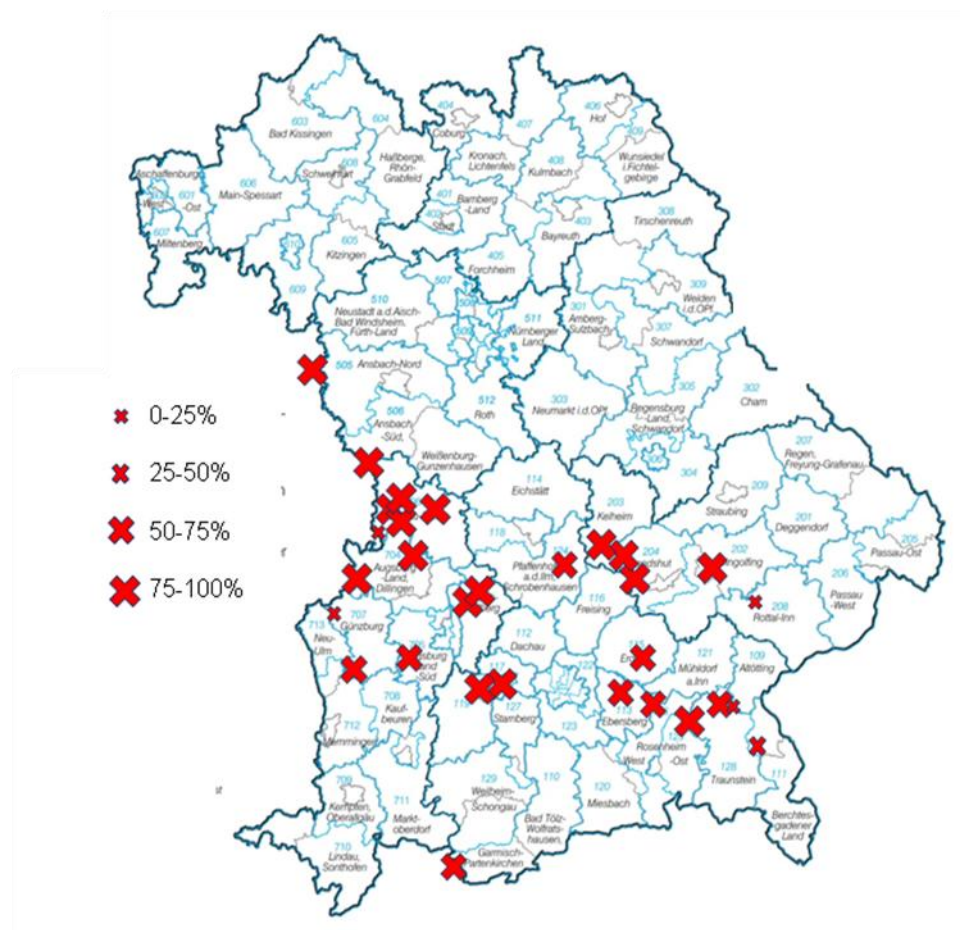


Abbildung 24: Darstellung der Lokalisation der beprobten Mastbetriebe und ihre jeweilige anti-HEV-IgG-Seroprävalenz

Betrachtet man die Verteilung der Seroprävalenzen in den einzelnen Mastbetrieben in Abhängigkeit vom Schlachthof, so sieht man, dass bei den Schlachthöfen A bis C die Mäster mit Seroprävalenzen im Bereich von 75-100 % am stärksten vertreten sind. Nur der Schlachthof D weist einen Peak bei den Prävalenzen von 25-50 % auf (Abbildung 25).

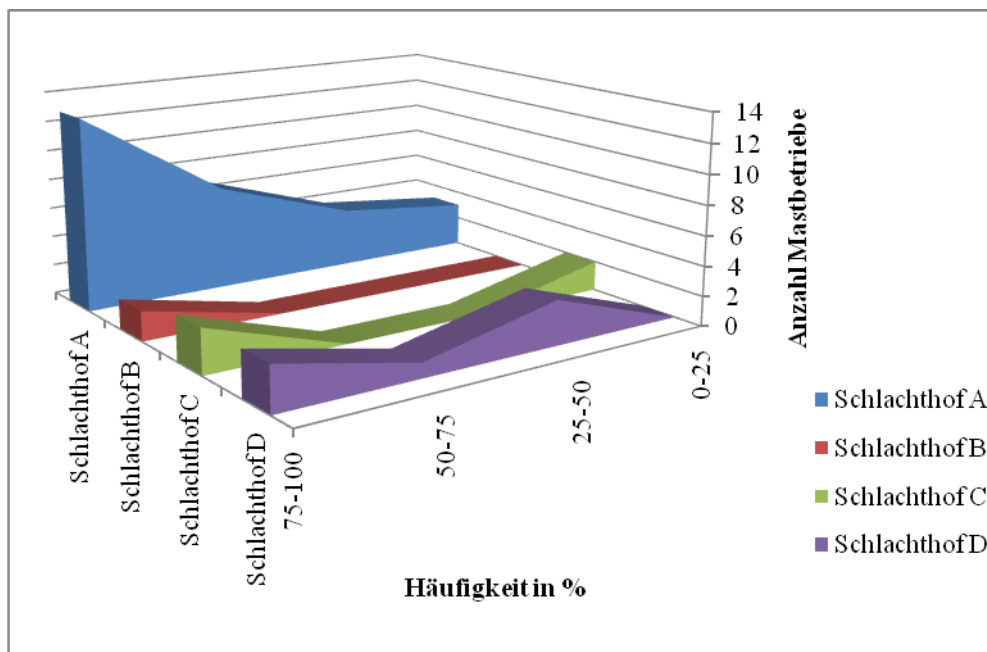


Abbildung 25: Darstellung der Anzahl an Mastbetrieben in vier Kategorien von Seroprävalenzen (0-25 %, 25-50 %, 50-75 %, 75-100 %) in Abhängigkeit vom Schlachthof

#### 12.2.4. Logistische Regression

Zunächst wurden die Parameterschätzungen für die Schlachthöfe berechnet. Dabei wurde der Schlachthof D als Referenzkategorie festgelegt, anhand derer die anderen Schlachthöfe verglichen wurden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Effekt hinsichtlich der Erklärung der abhängigen Variable Seropositivität für den Schlachthof B ( $\alpha = 0,05$ ) sowie ein hochsignifikanter Effekt für den Schlachthof C ( $\alpha = 0,001$ ). Der Parameter für Schlachthof B gibt an, dass ein Tier aus diesem Schlachthof eine um den Faktor 2,847 höhere Wahrscheinlichkeit hat anti-HEV-positiv zu sein als ein Schwein aus Schlachthof D. Für den Schlachthof A liegt der Parameter bei 0,703, für den Schlachthof C bei 0,189 (Tabelle 25). Somit hat ein Tier aus Schlachthof C eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit, anti-HEV-positiv zu sein als eines aus Schlachthof D.

Tabelle 25: Darstellung des Einflusses des Schlachthofs auf die Seropositivität der Mastschweine in Bezug auf den Referenschlachthof D

Schlachthof	Parameter $\beta$	$p$ -Wert
Schlachthof A	0,703	0,216
Schlachthof B	2,847	0,014
Schlachthof C	0,189	0,000

Nach demselben Prinzip wurden die Parameter und Signifikanzen zur Ermittlung des Mastbetriebeffekts berechnet. Dabei zeigten insgesamt neun Betriebe signifikante Abweichungen hinsichtlich der Erklärung der abhängigen Variable „Seropositivität“ zum Referenzmastbetrieb Nr. 41 ( $\alpha = 0,05$ ). Dies waren die Mastbetriebe Nr. 11, 19, 20, 22, 31, 32, 34, 35 und 40. Für den anti-HEV-freien Betrieb Nr. 33 zeigte sich kein signifikanter Effekt ( $p = 0,999$ ), da für diesen Betrieb aufgrund des völligen Fehlens von anti-HEV-positiven Tieren keine Wahrscheinlichkeit berechnet werden kann, mit der ein Schwein aus Nr. 33 positiv ist (Tabelle 26).

Tabelle 26: Darstellung des Einflusses des Mastbetriebs auf die Seropositivität der Mastschweine in Bezug auf den Referenzmastbetrieb Nr. 41

Mastbetrieb	Parameter $\beta$	$p$ -Wert	Mastbetrieb	Parameter $\beta$	$p$ -Wert
Mäster Nr. 1	4,846E+09	0,999	Mäster Nr. 21	4,846E+09	0,997
Mäster Nr. 2	12,000	0,060	Mäster Nr. 22	39,000	0,018
Mäster Nr. 3	3,000	0,547	Mäster Nr. 23	,412	0,468
Mäster Nr. 4	3,000	0,472	Mäster Nr. 24	4,846E+09	0,999
Mäster Nr. 5	6,000	0,214	Mäster Nr. 25	1,857E-09	0,999
Mäster Nr. 6	9,000	0,120	Mäster Nr. 26	4,846E+09	1,000
Mäster Nr. 7	21,000	0,053	Mäster Nr. 27	6,000	0,214
Mäster Nr. 8	1,857E-09	0,999	Mäster Nr. 28	2,250	0,558
Mäster Nr. 9	7,500	0,158	Mäster Nr. 29	6,000	0,214
Mäster Nr. 10	6,750	0,121	Mäster Nr. 30	6,000	0,214
Mäster Nr. 11	27,000	0,035	Mäster Nr. 31	30,000	0,029
Mäster Nr. 12	4,000	0,317	Mäster Nr. 32	72,000	0,006
Mäster Nr. 13	7,000	0,148	Mäster Nr. 33	1,857E-09	0,999
Mäster Nr. 14	12,000	0,122	Mäster Nr. 34	12,500	0,042
Mäster Nr. 15	1,857E-09	0,999	Mäster Nr. 35	15,000	0,027
Mäster Nr. 16	4,846E+09	1,000	Mäster Nr. 36	4,800	0,223
Mäster Nr. 17	4,846E+09	0,999	Mäster Nr. 37	3,000	0,472
Mäster Nr. 18	4,846E+09	1,000	Mäster Nr. 38	12,000	0,122
Mäster Nr. 19	27,000	0,035	Mäster Nr. 39	4,846E+09	1,000
Mäster Nr. 20	13,667	0,031	Mäster Nr. 40	21,000	0,017



## V. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA zum Nachweis von Hepatitis-E-Antikörpern beim Schwein entwickelt. Der Line Assay *recomLine* HEV wurde als Referenztest definiert, gegen den die beiden konkurrierenden ELISAs Axiom HEV Ab und *recomWell* HEV pig verglichen wurden. Die Gründe für dieses Vorgehen sind die folgenden: (1) Der Line Assay verwendet von allen drei Testverfahren die größte Anzahl an unterschiedlichen rekombinanten Antigenen. Während der Axiom HEV Ab nur mit rekombinanten Proteinen des ORF 2 Genotyp 1 arbeitet, besitzt der *recomWell* HEV pig zusätzlich Teile des ORF 2 vom Genotyp 3 und ORF 3 Genotyp 1. Nur der *recomLine* HEV ist zusätzlich zu den im *recomWell* HEV pig verwendeten Antigenen mit dem mittleren Teil des ORF2, sowie dem ORF 3 Genotyp 3 ausgestattet. (2) Durch das Auftrennen der Antigene auf unterschiedliche Lokalisationen ermöglicht der Line Assay eine differenziertere diagnostische Aussage als ein ELISA. (3) In der Standarddiagnostik wird ein Streifentest häufig als Bestätigungstest für den Screening-ELISA eingesetzt.

Beim Vergleich der drei Beschichtungsvarianten (kommerzielle Genotyp 1 Beschichtung, Genotyp 1+3 und Genotyp 3) erwies sich die Genotyp 1+3 Beschichtung als die beste Variante, gefolgt von der kommerziell bereits erhältlichen reinen Genotyp 1 Beschichtung und der Genotyp 3 Variante. Da die in unseren Breitengraden auftretende autochthone HEV-Infektion fast ausschließlich auf Erreger des Genotyp 3 zurückzuführen sind, und dies neben dem nur in Asien nachgewiesenen Genotyp 4 auch der einzige Genotyp ist, der beim Schwein zu finden ist, müsste eine reine Beschichtung mit Genotyp 3 Antigenen die besten Resultate hinsichtlich Sensitivität/Spezifität/S/N-Ratio etc. erzielen. Tatsächlich zeigte diese Beschichtungsvariante jedoch die schwächsten Ergebnisse. Viele der bisherigen Untersuchungen auf porcine HEV-Antikörper verließen sich ausschließlich auf die starke Kreuzreaktivität der verschiedenen Genotypen, und arbeiteten durchgängig mit Genotyp-1 rekombinanten Antigenen. Nichtsdestotrotz scheint die Wahl des passenden Genotypen neben der Auswahl der Epitope hinsichtlich ihrer Lokalisation auf den verschiedenen ORFs wichtig zu sein. Nach Betrachtung der Gesamtreaktivitäten für die einzelnen Antigenbanden auf dem Line Assay Teststreifen besteht wohl keine reine

Abhängigkeit der Reaktivität vom verwendeten Genotyp, sondern diese scheint für jedes verwendet rekombinante Antigen zu variieren.

In einigen Fällen sind Seren, die im ELISA positiv reagieren, im Line als negativ zu bewerten. Betrachtet man die *recomLine* HEV Teststreifen dabei genauer, so stellt man fest, dass eine gewisse Reaktivität auf mehreren Banden sichtbar wird, die aber in ihrer Ausprägung unterhalb der Cutoff-Kontrollbande bleibt. Diese Einzelreaktivitäten, die im Line unabhängig voneinander im Vergleich mit der Cutoff-Kontrollbande beurteilt werden, sind zu schwach ausgeprägt um ein positives Ergebnis zu erlangen, addieren sich auf der Mikrotiterplatte dann aber zu einer insgesamt positiven OD auf. Für solche Proben wäre es sicherlich interessant, weitere Untersuchungen wie z.B. eine PCR anzustreben, da sie momentan durch das diagnostische Raster fallen.

Während es sich bei dem neu entwickelten Prototypen um einen indirekten ELISA mit HRP-markierten anti-Spezies-Antikörpern handelt, arbeitet der Axiom HEV Ab mit enzymmarkierten rekombinanten Antigenen im Sinne eines Sandwich-ELISAs. Vorteil der letzteren Methode ist, dass bei einer Untersuchung verschiedener Spezies kein Wechsel des Detektionskonjugates notwendig wird. Allerdings liegt der Marktpreis des Konkurrenzverfahrens bis zu 200 % über dem des *recomWell* HEV pig. Der Axiom HEV Ab erwies sich in unseren Untersuchungen im Vergleich zum Line Assay (Referenztest) gegenüber dem *recomWell* HEV pig als sensitiver, allerdings lag seine Spezifität niedriger. Teilweise zeigte der Axiom HEV Ab hoch positive Ergebnisse, die in keinem der anderen Testverfahren bestätigt werden konnten. Was den Komfort der Abarbeitung betrifft, verlangt das Protokoll des Axiom HEV Ab Waschzyklen mit jeweils 60 s Einwirkzeit. Bei der Verwendung maschineller Washer geht im Laufe dieser langen Pause meist das Vakuum verloren. Dieses muss dann erneut aufgebaut werden, so dass die Einwirkzeit meist überschritten wird, und eine permanente Kontrolle des Waschvorganges notwendig ist. Man benötigt für einen Einfachansatz 50 µl Serum pro Tier, die Verdünnung erfolgt 1:2 im mitgelieferten Puffer. Diese große Menge an Probenmaterial ist zwar beim Schlachtschwein kein Problem, insbesondere bei der Austestung von kleineren Spezies könnte sie einen limitierenden Faktor darstellen. Durch die geringe Verdünnung ist eine Adaptierung des Testkits auf Fleischsaft nicht möglich, weil dies einen zehnfach geringeren Verdünnungsfaktor erfordern würde. Im Gegensatz zum *recomWell*

HEV pig, bei dem die Serumverdünnungen stets im Masterblock vorgelegt werden um dann mit der 8-Kanal-Pipette übertragen zu werden, wird beim Axiom HEV Ab das Serum direkt auf die Platte pipettiert. Will man eine ganze Mikrotiterplatte mit 96 Wells in Einzelwerten abarbeiten, so benötigt man für das Pipettieren von 96 Seren etwa 10 bis 15 min. Somit dauert die Seruminkubation für die am Anfang pipettierten Seren ca. 10 min länger als für die Seren am Ende der MTP. Dies kann beim Axiom HEV Ab zu einer gewissen Verfälschung der Extinktionsniveaus führen. Der *recomWell* HEV pig benötigt pro Probe nur 10 µl Serum pro 1010 µl Ansatz bzw. 100 µl Fleischsaft pro 1000 µl Ansatz. Die Waschzyklen erfordern deutlich kürzere Einwirkzeiten. Durch das Ansetzen der Verdünnungen im Masterblock werden alle Proben fast gleichzeitig mit der 8-Kanal-Pipette auf die Mikrotiterplatte übertragen. Dieses Vorgehen ist für den Axiom HEV Ab nicht möglich, da für den Ansatz im Masterblock ein gewisser Überschuss vorgelegt werden muss, um exakt pipettieren zu können. Dies würde eine noch größere Menge an Probenmaterial erfordern.

Ein weiterer zentraler Punkt dieser Arbeit war die Verwendung von Fleischsaft als alternatives Probenmaterial zum Nachweis von anti-HEV-IgG beim Schwein. Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur Referenzmethode liefert vergleichbar gute Ergebnisse für Serum und Fleischsaft. Im Hinblick auf die Validierung des ELISAs erzielte der Fleischsaft bei den Validierungskriterien Linearität, Mikrotiterplattenvarianz und Interassayvarianz sogar geringfügig bessere Resultate als das Serum. Auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen wurden konstante Extinktionen erzielt. Mit 22,2 µl Fleischsaft + 200 µl Verdünnungspuffer kann der Nachweis von anti-HEV-IgG durchgeführt werden, so dass eine Eingliederung dieses Verfahrens in die bereits standardmäßig erfolgende Salmonellendiagnostik aus Fleischsaft ohne nennenswerten Mehraufwand zu realisieren wäre.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt ist der Nachweis von IgM-Antikörpern bei schlachtreifen Tieren im Alter von 6 Monaten. Humaninfektionen zeichnen sich durch einen signifikanten Abfall des IgM-Titers 4 Wochen post infektionem aus, so dass der Nachweis dieser Antikörperklasse beim Menschen den Rückschluss auf eine aktuelle oder erst kurz zurückliegende Virämie erlaubt (Robert-Koch-Institut, 2008). In einer Studie zu natürlich infizierten Sauen und ihren Ferkeln wurde ein signifikanter Abfall des anti-HEV-IgM-Titers 4-7

Wochen post infektionem nachgewiesen (de Deus et al., 2008). Folglich würde der IgM-Nachweis beim Schlachtschwein im Alter von 6 Monaten bedeuten, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung eine frische Infektion mit HEV durchlaufen, und nicht wie bisher angenommen ausschließlich im Alter von 2-3 Monaten infiziert werden. Somit bestünde die Gefahr einer zoonotischen Übertragung von HEV vom schlachtreifen Tier über das Lebensmittel Fleisch auf den Menschen. Inwiefern tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem IgM-Titer und einer Virämie – und damit einer potenziellen Ansteckung des Endverbrauchers – besteht, muss in weiteren Studien erörtert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass HEV bei Hausschweinen in Bayern endemisch ist. Hierbei handelt es sich um die erste zuverlässige Seroprävalenzstudie im deutschsprachigen Raum. Damit liegt Deutschland mit einer in dieser Arbeit ermittelten Seroprävalenz von 68,6 % für das Bundesland Bayern auf demselben Niveau wie Spanien (Peralta et al., 2009b). Das einzige europäische Land, in dem höhere anti-HEV-Prävalenzen gefunden wurde, ist Griechenland (Asimoula et al., 2009).

Es scheint nichtsdestotrotz Betriebe zu geben, die vollkommen frei von HEV sind. Hier wäre eine weiterführende Ursachenforschung interessant, um zu klären, ob solche Betriebe durch weniger intensive oder besonders hygienische Haltungsbedingungen dem Virus geringere Verbreitungsmöglichkeiten bieten, oder ob die Ursache eventuell in der Aufzucht zu finden ist. Wenn ein Betrieb autark züchtet und mästet, minimiert er den Eintrag von Fremderregern in den Bestand durch Zukauf von extern. Auch dies wäre eine denkbare Hypothese. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass ein Mäster unwissentlich ausschließlich Ferkel aus HEV-negativen Aufzuchtbetrieben bezieht. Ist das Virus erst einmal in einen Bestand eingeschleppt worden, so findet eine fast vollständige Durchseuchung statt, was sich durch den Übertragungsweg und die intensiven Haltungsbedingungen der Tiere erklären lässt. Dies wird durch die statistische Betrachtung der Mastbetriebe im Rahmen der logistischen Regression bestätigt. Hier zeigten insgesamt neun Mastbetriebe signifikante Abweichungen zur Referenzkategorie. In weiteren Studien wäre nun zu klären, worin genau die Ursache für diese Abweichungen liegt.

Im Rahmen der Berechnung der logistischen Regression zeigte sich außerdem ein signifikanter Effekt für die Schlachthöfe B und C hinsichtlich der

Seroprävalenzen. Es ist wahrscheinlich, dass die Ursache für diese Unterschiede im je nach Schlachthof variierenden Klientel von Mastbetrieben zu finden ist. Eine erhöhte Seroprävalenz durch Probenkontamination erscheint zum einen aufgrund der Vorgehensweise bei der Probennahme unwahrscheinlich, zum anderen würde die Korrelation zum Fleischsaft schwächer ausfallen. Dass beide Probenmaterialien in gleichem Maße kontaminiert wurden kann weitgehend ausgeschlossen werden. Der starke Unterschied der Schlachthofprävalenz von Schlachthof C (34,34 %) zu den anderen Schlachthöfen ist in erster Linie darin begründet, dass beim Schlachthof C nur zwei Mastbetriebe beprobt wurden, von denen einer durch eine Seroprävalenz von 3,8 % auffiel.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse geht man von einer zoonotischen Übertragung von Hepatitis E Genotyp 3 vom Hausschwein auf den Menschen aus. Bislang gibt es allerdings kaum zuverlässige Informationen zur HEV-Seroprävalenz beim Hausschwein in Deutschland. Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Hepatitis E aus Serum und Fleischsaft, sowie die Ermittlung der anti-HEV-Seroprävalenz beim Schlachtschwein in Bayern.

516 Serumproben und 198 korrespondierende Fleischsaftproben von Schweinen aus 41 Mastbetrieben wurden an vier bayerischen Schlachthöfen zwischen August 2009 und Februar 2010 gesammelt. Diese wurden mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *recomWell* HEV pig (Firma Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland), der rekombinante Antigene des Genotyp 1 und 3 verwendet, gegen einen Konkurrenztest, den *Axiom* HEV Ab (Firma Axiom, Bürstadt, Deutschland), auf HEV-Antikörper untersucht. Die Ergebnisse wurden durch einen Line Assay (*recomLine* HEV, Mikrogen), der ebenfalls mit Antigenen des Genotyps 1 und 3 arbeitet, bestätigt. Verglichen mit dem Line Assay zeigte der Mikrogen / Axiom ELISA eine Sensitivität von 90,9 % / 95,6 % und eine Spezifität von 94,0 % / 80,8 %. Die Korrelation der Extinktionen von Serum und Fleischsaft betrug 0,939.

Aufgrund der Resultate aus den drei Testvarianten wurde eine anti-HEV-Seroprävalenz von 68,60 % berechnet. Beim Nachweis von anti-HEV IgM zeigten sich 7 % der porzinen Seren reaktiv. Zwei Schlachthöfe zeigten signifikante Abweichungen hinsichtlich der Seroprävalenzen. Für neun Mastbetriebe konnte ein signifikanter Einfluss auf die anti-HEV-Seroprävalenz festgestellt werden. Ein Mastbetrieb wies eine Seroprävalenz von 0 % auf.

Dies ist die erste Studie, die eine sehr hohe Seroprävalenzrate bei domestizierten Schweinen im Fleischsaft nachweist. Die Ergebnisse korrelieren hoch mit den Resultaten aus drei verschiedenen Immunoassays. Eine Seropositivität von anti-HEV IgM von 7,0 % ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Der entwickelte ELISA eignet sich zum Nachweis von HEV-Antikörpern aus Blut- und Fleischsaftproben von Hausschweinen.

## VII. SUMMARY

### **Development of an ELISA for the detection of antibodies against Hepatitis E in serum and meat-juice of domestic pigs**

Reports on autochthonous Hepatitis E virus (HEV) infection in humans with genotype 3 assume a zoonotic transmission from domestic pigs. But for domestic pigs only limited information on the seroprevalence of HEV in Germany is available. The aim of this study was to develop an ELISA for the detection of anti-HEV IgG and IgM in porcine serum and meat juice, and furthermore assess the seroprevalence in domestic pigs from Bavaria, Germany.

516 serum samples from pigs and 198 corresponding meat-juice samples from 41 different fattening units were collected in four Bavarian slaughterhouses from August 2009 to February 2010. These samples were tested for anti-HEV antibodies using the newly developed *recomWell* HEV pig (Mikrogen GmbH, Neuried, Germany) with recombinantly produced antigens of genotype 1 and genotype 3 of HEV. The results were compared to a competitor ELISA (Axiom HEV Ab, Axiom GmbH, Bürstadt, Germany). The data were verified by a HEV line-immunoassay (*recomLine* HEV, Mikrogen), which also uses antigens of genotype 1 and genotype 3 of HEV. Compared to the line-immunoassay the Mikrogen / Axiom ELISA showed a sensitivity of 90.9% / 95.6% and a specificity of 94.0% / 80.8% respectively. The correlation of optical densities (ODs) between serum and meat-juice was 0.939.

Taking all three antibody tests into account, we found an overall anti-HEV IgG seroprevalence of 68.60%. 7.0% of the pigs showed IgM antibodies against HEV. We found a significant difference for two slaughterhouses concerning the seroprevalence rates. One fattening unit was free of antibodies against HEV, nine fattening units showed significant influence on the overall seroprevalence rate.

This is the first study showing a (very high) anti-HEV reactivity rate in meat-juice of domestic pigs, which corresponds to the seroprevalences measured consistently by three different assays. A positivity rate of 7.0% for IgM has also never been shown before. The used test-systems seem to be suitable for antibody-testing in blood and meat-juice samples from domestic pigs.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adlhoch, C., Kaiser, M., Pauli, G., Koch, J., Meisel, H., 2009a, Indigenous hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sang* 97, 303-308.
- Adlhoch, C., Kaiser, M., Pauli, G., Koch, J., Meisel, H., 2009b, Indigenous hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sanguinis* 97, 303-308.
- Aggarwal, R., 2007, Hepatitis E and pregnancy. *Indian J Gastroenterol* 26, 3-5.
- Anderson, D.A., Li, F., Riddell, M., Howard, T., Seow, H.F., Torresi, J., Perry, G., Sumarsidi, D., Shrestha, S.M., Shrestha, I.L., 1999, ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* 81, 131-142.
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S., Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Risbud, A.R., Banerjee, K., Purcell, R.H., 1994, SEROEPIDEMIOLOGY OF WATER-BORNE HEPATITIS IN INDIA AND EVIDENCE FOR A 3RD ENTERICALLY-TRANSMITTED HEPATITIS AGENT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3428-3432.
- Arankalle, V.A., Joshi, M.V., Kulkarni, A.M., Gandhe, S.S., Chobe, L.P., Rautmare, S.S., Mishra, A.C., Padbidri, V.S., 2001, Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 8, 223-227.
- Asante, M., 2003. Hepatitis E Virus (HEV): Comparative evaluation of IgG antibody assays in a low-endemicity setting. Inaugural-Dissertation. Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Asimoula, S., Elena, T., Alexopolilos, C., Kyriakis, S.C., Froesner, G., 2009, FIRST REPORT OF SEROLOGICAL EVIDENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN SWINE IN NORTHERN GREECE. *Acta Veterinaria-Beograd* 59, 205-211.
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., Poleschuk, V.F., 1983, EVIDENCE FOR A VIRUS IN NON-A, NON-B HEPATITIS TRANSMITTED VIA THE FECAL-ORAL ROUTE. *Intervirology* 20, 23-31.
- Balayan, M.S., Usmanov, R.K., Zamyatina, N.A., Djumalieva, D.I., Karas, F.R., 1990, Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 32, 58-59.
- Banait, V.S., Sandur, V., Parikh, F., Muruges, M., Ranka, P., Ramesh, V.S., Sasidharan, M., Sattar, A., Kamat, S., Dalal, A., Bhatia, S.J., 2007, Outcome of acute liver failure due to acute hepatitis E in pregnant women. *Indian J Gastroenterol* 26, 6-10.
- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., Dalton, H., 2004, Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 10, 953-955.
- Billam, P., LeRoith, T., Pudupakam, R.S., Pierson, F.W., Duncan, R.B., Meng, X.J., 2009, Comparative pathogenesis in specific-pathogen-free chickens of two strains of avian hepatitis E virus recovered from a chicken with Hepatitis-Splenomegaly syndrome and from a clinically healthy chicken. *Veterinary Microbiology* 139, 253-261.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A.,



- Husman, A., Koopmans, M., 2008, Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; A case series 2004-2006. *Bmc Infectious Diseases* 8.
- Boutrouille, A., Bakkali-Kassimi, L., Cruciere, C., Pavio, N., 2007, Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol* 45, 2009-2010.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S.A., Wellenberg, G.J., Husman, A., van der Poel, W.H.M., de Jong, M.C.M., 2008, Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Veterinary Research* 39.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C.M., Husman, A., van der Poel, W.H.M., 2009, The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *Bmc Veterinary Research* 5.
- Bradley, D., Andjaparidze, A., Cook, E.H., McCaustland, K., Balayan, M., Stetler, H., Velazquez, O., Robertson, B., Humphrey, C., Kane, M., Weisfuse, I., 1988, ETIOLOGICAL AGENT OF ENTERICALLY TRANSMITTED NON-A-HEPATITIS, NON-B-HEPATITIS. *Journal of General Virology* 69, 731-738.
- Buti, M., Dominguez, A., Plans, P., Jardi, R., Schaper, M., Espunes, J., Cardenosa, N., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Plasencia, A., Salleras, L., 2006, Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 1328-1332.
- Chang, Y.B., Wang, L., Geng, J.B., Zhu, Y.H., Fu, H.W., Ren, F.R., Li, L.J., Wang, X.J., Zhuang, H., 2009, Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatology Res.* 39, 1153-1158.
- Choi, C., Chae, C., 2003, Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* 38, 827-832.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003, Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerging Infectious Diseases* 9, 448-454.
- Cowie, B.C., Adamopoulos, J., Carter, K., Kelly, H., 2005, Hepatitis E infections, Victoria, Australia. *Emerging Infectious Diseases* 11, 482-484.
- Crowter, J.R. 2009. *The ELISA Guidebook*. In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press).
- de Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarias, M., Pina, S., Martin, M., Segales, J., 2008, Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Veterinary Microbiology* 132, 19-28.
- de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martin, M., Segales, J., 2007, Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Veterinary Microbiology* 119, 105-114.
- Di Bartolo, I., Martelli, F., Inglese, N., Pourshaban, M., Caprioli, A., Ostanello, F., Ruggeri, F.M., 2008, Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Veterinary Microbiology* 132, 47-55.
- dos Santos, D.R.L., Vitral, C.L., de Paula, V.S., Marchevsky, R.S., Lopes, J.F., Gaspar, A.M.C., Saddi, T.M., Junior, N.C.d.M., Guimaraes, F.d.R., Junior, J.G.C., Ximenes, L.L.L., Souto, F.J.D., Pinto, M.A., 2009, Serological and

- molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J* 182, 474-480.
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H., Margolis, H.S., 2001, Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184, 1594-1597.
- Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P., 1971, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY .2. QUANTITATIVE ASSAY OF PROTEIN ANTIGEN, IMMUNOGLOBULIN G, BY MEANS OF ENZYME-LABELLED ANTIGEN AND ANTIBODY-COATED TUBES. *Biochimica Et Biophysica Acta* 251, 427-+.
- Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E., Margolis, H.S., 2000, Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181, 449-455.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007, Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *Journal of General Virology* 88, 912-917.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008a, Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *International Journal of Food Microbiology* 123, 32-37.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Huang, Y.W., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008b, Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology* 80, 1379-1386.
- Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., Perez-Gracia, M.T., 2008, Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 78, 1012-1015.
- Ghabrah, T.M., Tsarev, S., Yarbough, P.O., Emerson, S.U., Strickland, G.T., Purcell, R.H., 1998, Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 55, 134-137.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.a., Kuby, J., 2003, Enzyme-linked Immunsorbent Assay, In: Freeman, W.H. (Ed.) *Immunology*. New York.
- Grabow, W.O.K., Taylor, M.B., Webber, L.M., 1996, Hepatitis E virus in South Africa. *S. Afr. J. Sci.* 92, 178-180.
- Halbur, P.G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M.B., Purcell, R.H., Emerson, S.U., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001, Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 39, 918-923.
- Haqshenas, G., Meng, X.J., 2001, Determination of the nucleotide sequences at the extreme 5' and 3' ends of swine hepatitis E virus genome. *Archives of Virology* 146, 2461-2467.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J., 2001, Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *Journal of General Virology* 82, 2449-2462.
- Harrison, T.J., 1999, Hepatitis E virus - an update. *Liver* 19, 171-176.
- He, J.K., Hoffman, S.L., Hayes, C.G., 1997, DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. *Vaccine* 15, 357-362.

- He, J.K., Innis, B.L., Shrestha, M.P., Clayson, E.T., Scott, R.M., Linthicum, K.J., Musser, G.G., Gigliotti, S.C., Binn, L.N., Kuschner, R.A., Vaughn, D.W., 2002, Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4493-4498.
- Herremans, M., Vennema, H., Bakker, J., van der Veer, B., Duizer, E., Benne, C.A., Waar, K., Hendrixs, B., Schneeberger, P., Blaauw, G., Kooiman, M., Koopmans, M.P.G., 2007, Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *Journal of Viral Hepatitis* 14, 140-146.
- Huang, F., Hua, X., Yang, S., Yuan, C., Zhang, W., 2009, Effective inhibition of hepatitis E virus replication in A549 cells and piglets by RNA interference (RNAi) targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Research* 83, 274-281.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Guenette, D.K., Woolcock, P.R., Larsen, C.T., Pierson, F.W., Elvinger, F., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002, Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4197-4202.
- Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., Calvo, M., 2007, Presence of anti hepatitis E virus antibodies in swine. *Revista Medica De Chile* 135, 997-1001.
- Im, S.W.K., Zhang, J.Z., Zhuang, H., Che, X.Y., Zhu, W.F., Xu, G.M., Li, K., Xia, N.S., Ng, M.H., 2001, A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* 19, 3726-3732.
- Inoue, J., Takahashi, M., Mizuo, H., Suzuki, K., Aikawa, T., Shimosegawa, T., Okamoto, H., 2009, Nucleotide Substitutions of Hepatitis E Virus Genomes Associated with Fulminant Hepatitis and Disease Severity. *Tohoku J. Exp. Med.* 218, 279-284.
- Kaba, M., Davoust, B., Marie, J.L., Barthet, M., Henry, M., Tamalet, C., Raoult, D., Colson, P., 2009, Frequent Transmission of Hepatitis E Virus Among Piglets in Farms in Southern France. *Journal of Medical Virology* 81, 1750-1759.
- Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J.B., Elm, J., Glass, G.E., Higa, H., Diwan, A., Gibbs, C.J., Meng, X.J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 1999, Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 331-335.
- Kaden, V., Lange, E., Nagel-Kohl, U., Bruer, W., 2009, Meat juice as diagnostic sample for virological and serological diagnosis of classical swine fever. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 116, 173-179.
- Kantala, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Peltomaa, J., Lappalainen, M., 2009, Hepatitis E virus in patients with unexplained hepatitis in Finland. *Journal of Clinical Virology* 45, 109-113.
- Karetnyi, I.V., Dzhumaliev, D.I., Usmanov, R.K., Titova, I.P., Litvak, I.I., Balaian, M.S., 1993, The possible involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 52-56.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D.K., Huang, F.F., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004, Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 42, 5047-5052.
- Kasorndorkbua, C., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Guenette, D.K., Buitenwerf, R.M., Royer, R.L., Meng, X.J., 2003, Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* 67, 303-306.

- Khuroo, M.S., Kamili, S., 2009, Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *Journal of Viral Hepatitis* 16, 519-523.
- Kischel, N., 2002. Vergleich von ELISA, Immunfluoreszenz, Durchflußzytometrie, Westernblot und Agglutinationstest zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Francisella tularensis*. Technische Universität München, München.
- Kumar, R.M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J.K., Usmani, A., Thomas, L., 2001, 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* 100, 9-15.
- Leblanc, D., Ward, P., Gagne, M.J., Poitras, E., Muller, P., Trottier, Y.L., Simard, C., Houde, A., 2007, Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *International Journal of Food Microbiology* 117, 160-166.
- Lemon, S.M., 1995, Hepatitis E Virus, In: Mandell, G., Bennet, J., Dolin, R. (Eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, pp. 1663-1666.
- Li, T.C., Miyamura, T., Takeda, N., 2007, Short report: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 170-172.
- Li, Z., Yu, S.S., Dong, S.J., Zhu, Y.M., Si, F.S., Shen, S.Y., Jiang, Z.Q., Yu, R.S., Zou, S.X., 2009, Reduced prevalence of genotype 3 HEV in Shanghai pig farms and hypothetical homeostasis of porcine HEV reservoir. *Veterinary Microbiology* 137, 184-189.
- Lu, L., Li, C.H., Hagedorn, C.H., 2006, Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5-36.
- Masuda, J., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., Kohno, S., 2005, Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatology* 41, 178-183.
- McCreary, C., Martelli, F., Grierson, S., Ostanello, F., Nevel, A., Banks, M., 2008, Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Veterinary Record* 163, 261-265.
- Meng, J.H., Dai, X., Chang, J.C., Lopareva, E., Pillot, J., Fields, H.A., Khudyakov, Y.E., 2001, Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288, 203-211.
- Meng, X.J., Dea, S., Engle, R.E., Friendship, R., Lyoo, Y.S., Sirinarumit, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1999, Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 59, 297-302.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1998, Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *Journal of Virology* 72, 9714-9721.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997, A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9860-9865.
- Mikrogen. Gebrauchsinformation recomLine HEV IgG/IgM (Neuried), pp. 1-11.

- Molina, R.M., Chittick, W., Nelson, E.A., Christopher-Hermings, J., Rowland, R.R.R., Zimmerman, J.J., 2008, Diagnostic performance of assays for the detection of anti-Porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice") based on samples collected under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 735-743.
- Mushahwar, I.K., 2008, Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of Medical Virology* 80, 646-658.
- N.N. 1998. Hepatitis E Virus, Gesundheit, B.f., ed. (Arbeitskreis Blut des BfG).
- Nielsen, B., Ekeröth, L., Bager, F., Lind, P., 1998, Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 158-163.
- Okamoto, H., 2007, Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Research* 127, 216-228.
- Panda, S.K., Thakral, D., Rehman, S., 2007, Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17, 151-180.
- Pelosi, E., Clarke, I., 2008, Hepatitis E: a complex and global disease. *Emerging Health Threats Journal*, 1-17.
- Peralta, B., Biarnes, M., Ordonez, G., Porta, R., Martin, M., Mateu, E., Pina, S., Meng, X.J., 2009a, Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Veterinary Microbiology* 137, 31-36.
- Peralta, B., Casas, M., de Deus, N., Martin, M., Ortuno, A., Perez-Martin, E., Pina, S., Mateu, E., 2009b, Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Veterinary Microbiology* 137, 66-73.
- Previsani, N., Lavanchi, D. 2001. Hepatitis E (World Health Organization (WHO)).
- Purcell, R., 1996, Hepatitis viruses: changing patterns of human disease, In: Roizman, B. (Ed.) *Infectious diseases in an age of change*. National Academy Press, Washington DC, pp. 59-75.
- Renou, C., Cadranet, J.F., Bourliere, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carencó, P., Harafa, A., Bertrand, J.J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, J.P., Decoppet, A., Eloit, M., Pavio, N., 2007, Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1094-1096.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., Bradley, D.W., 1990, ISOLATION OF A CDNA FROM THE VIRUS RESPONSIBLE FOR ENTERICALLY TRANSMITTED NON-A, NON-B HEPATITIS. *Science* 247, 1335-1339.
- Robert-Koch-Institut 2008. *Epidemiologisches Bulletin* (Robert-Koch-Institut), pp. 435-446.
- Schielke, A., Sachs, K., Lierz, M., Appel, B., Jansen, A., Johne, R., 2009, Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virology Journal* 6.
- Schlauder, G.G., Mushahwar, I.K., 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. In, Oct, pp. 282-292.
- Schofield, D.J., Glamann, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2000, Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *Journal of*

- Virology 74, 5548-5555.
- Schofield, D.J., Purcell, R.H., Nguyen, H.T., Emerson, S.U., 2003, Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site at the carboxyterminus of an ORF2 protein vaccine. *Vaccine* 22, 257-267.
- Shrestha, M.P., Scott, R.M., Joshi, D.M., Mammen, M.P., Thapa, G.B., Thapa, N., Myint, K.S.A., Fourneau, M., Kuschner, R.A., Shrestha, S.K., David, M.P., Seriwatana, J., Vaughn, D.W., Safary, A., Endy, T.P., Innis, B.L., 2007, Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* 356, 895-903.
- Steinbach, G., Methner, U., Meyer, H., 2003, Distribution of immunoglobuline isotypes and Salmonella antibodies in blood serum and meat juice of pigs. *Berliner Munchener Tierarztl. Wochenschr.* 116, 274-280.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Tanaka, T., Tsatsalt-Od, B., Inoue, J., Okamoto, H., 2005, Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *Journal of General Virology* 86, 1807-1813.
- Teo, C.G., 2009, Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 24-32.
- Usmanov, R.K., Balayan, M.S., Dzhumalieva, D.I., Alymbaeva, D.B., Korolev, M.B., Karas, F.R., Zamyatina, N.A., Berdikozhoeva, S.K., Karymshakova, C.T., Kozhomkulov, E.T., Konovalov, V.A., 1991, EXPERIMENTAL HEPATITIS-E INFECTION IN PIGLETS. *Voprosy Virusologii* 36, 212-216.
- Wang, Y.C., Zhang, H.Y., Xia, N.S., Peng, G., Lan, H.Y., Zhuang, H., Zhu, Y.H., Li, S.W., Tian, K.G., Gu, W.J., Lin, J.X., Wu, X., Li, H.M., Harrison, T.J., 2002, Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *Journal of Medical Virology* 67, 516-521.
- Weiß, J. 2009. Schweineproduktion in Bayern im Spannungsfeld von Regionalität und globalem Wettbewerb (München, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft).
- Williams, T.P., Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001, Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39, 3040-3046.
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., Pavri, K.M., 1980, EPIDEMIC AND ENDEMIC HEPATITIS IN INDIA - EVIDENCE FOR A NON-A, NON-B HEPATITIS-VIRUS ETIOLOGY. *Lancet* 2, 876-879.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H., 2003, 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* 84, 2351-2357.
- Yoo, D., Giulivi, A., 2000, Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can. J. Vet. Res.-Rev. Can. Rech. Vet.* 64, 193-203.
- Zhang, J., Gu, Y., Ge, S.X., Li, S.W., He, Z.Q., Huang, G.Y., Zhuang, H., Ng, M.H., Xia, N.S., 2005, Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. *Vaccine* 23, 2881-2892.
- Zhang, J., Liu, C.B., Li, R.C., Li, Y.M., Zheng, Y.J., Li, Y.P., Luo, D., Pan, B.B., Nong, Y., Ge, S.X., Xiong, J.H., Shih, J.W.K., Ng, M.H., Xia, N.S., 2009, Randomized-controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed

- recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 27, 1869-1874.
- Zhao, C.Y., Ma, Z.R., Harrison, T.J., Feng, R.F., Zhang, C.T., Qiao, Z.L., Fan, J.P., Ma, H.X., Li, M.S., Song, A.J., Wang, Y.C., 2009, A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China. *Journal of Medical Virology* 81, 1371-1379.
- Zhou, Y.H., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2005, A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine* 23, 3157-3165.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1 HEV-Partikel im Elektronenmikroskop. Quelle: Center of Disease Control and Prevention
- Abbildung 2 Aufbau des HEV-Genoms und Funktion der ORF-Proteine
- Abbildung 3 Nukleotid-Homologie und phylogenetischer Stammbaum komplett sequenzierter HEV-Isolate (Schielke et al., 2009). Deutsche Isolate sind farbig hervorgehoben
- Abbildung 4 Modell der Replikation des HEV
- Abbildung 5 Anzahl autochthoner und importierter HEV-Fälle in Deutschland, Stand 11/2008. Quelle: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 2008
- Abbildung 6 Gebiete mit epidemischem und sporadischem Auftreten von HEV beim Menschen. Quelle: Center for Disease Control and Prevention
- Abbildung 7 Merkmale der porzinen HEV-Infektion
- Abbildung 8 Grundprinzip eines indirekten ELISA vgl. *recomWell HEV*® (Mikrogen)
- Abbildung 9 Direkter Sandwich-ELISA am Beispiel des Axiom HEV Ab
- Abbildung 10 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung von Line-Assay-Teststreifen
- Abbildung 11 Lokalisation der rekombinanten Antigene auf dem *recomLine HEV* (Mikrogen) Teststreifen
- Abbildung 12 Darstellung der logistischen Regressionskurve
- Abbildung 13 Grafische Darstellung der Schwankung der zwei Fleischsaftansätze in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 auf insgesamt je 48 Kavitäten einer MTP
- Abbildung 14 Zusammenhang zwischen den Extinktionen im Serum und im zugehörigen Fleischsaft im *recomWell HEV pig*
- Abbildung 15 Linearität für den *recomWell HEV pig IgG*



- Abbildung 16 Linearität für den recomWell HEV pig IgM
- Abbildung 17 Linearität für den recomWell HEV pig IgG FS
- Abbildung 18 Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des recomWell HEV pig IgG
- Abbildung 19 Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des recomWell HEV pig IgM
- Abbildung 20 Grafische Darstellung der Variation eines Serums in 48 Wells einer Mikrotiterplatte des recomWell HEV pig IgG mit Fleischsaft als Probenmaterial
- Abbildung 21 Anti-HEV-IgG Seroprävalenzen an den vier beprobten Schlachthöfen
- Abbildung 22 Darstellung der Seroprävalenzen anhand der einzelnen Mastbetriebe
- Abbildung 23 Darstellung der Seroprävalenzen anhand der Mastbetriebe für alle Teilstichproben mit mehr als 10 Schweinen
- Abbildung 24 Darstellung des Einflusses des Schlachthofs auf die Seropositivität der Mastschweine in Bezug auf den Referenschlachthof D
- Abbildung 25 Darstellung des Einflusses des Mastbetriebs auf die Seropositivität der Mastschweine in Bezug auf den Referenzmastbetrieb Nr. 41

## X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Darstellung der HEV Genotypen und ihre weltweite Verbreitung bei Mensch und Schwein
Tabelle 2	Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenzen von anti-HEV-IgG beim Schwein in verschiedenen Ländern
Tabelle 3	Darstellung der beprobten Schlachthöfe unter Angabe der Mäster und der Anzahl der beprobten Tiere pro Mäster
Tabelle 4	Rekombinante Antigene der verschiedenen Beschichtungsvarianten im Vergleich zum <i>recomLine</i> HEV
Tabelle 5	Verwendete rekombinante Antigene im <i>recomLine</i> HEV
Tabelle 6	Gegenüberstellung der Abarbeitungsprotokolle des <i>recomWell</i> HEV (Mikrogen) und des Axiom Ab ELISA
Tabelle 7	Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande
Tabelle 8	Punktebewertung der HEV-Antigene und Beurteilung der Testergebnisse
Tabelle 9	Darstellung der Vierfeldertafel zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität
Tabelle 10	Vergleich der drei Beschichtungstypen
Tabelle 11	Vergleich der drei Beschichtungstypen mit dem Referenztest <i>recomLine</i> HEV
Tabelle 12	Vergleich der drei Beschichtungsvarianten mit der Konkurrenzmethode (Axiom HEV Ab)
Tabelle 13	Vergleich der zwei Fleischsaftverdünnungen (1:5 und 1:10) mit den korrespondierenden Seren
Tabelle 14	Darstellung der Summen der Reaktivitäten für die einzelnen Antigene, fragliche Banden wurden mit 0,5 bewertet, positive je nach Stärke mit 1, 2 oder 3 Punkten
Tabelle 15	Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HEV pig im Vergleich zum <i>recomLine</i> HEV als Referenzmethode

- Tabelle 16 Sensitivität und Spezifität des Axiom HEV Ab im Vergleich zum *recomLine* HEV als Referenzmethode
- Tabelle 17 Vergleich des *recomWell* HEV pig für Fleischsaft (FS) Hyg mit dem *recomLine* HEV als Referenzmethode
- Tabelle 18 Vergleich des *recomWell* HEV pig für Fleischsaft und Serum
- Tabelle 19 Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Serum IgG
- Tabelle 20 Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Serum IgM
- Tabelle 21 Interassayvarianz für den *recomWell* HEV pig für Fleischsaft IgG
- Tabelle 22 Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig IgG
- Tabelle 23 Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig IgM
- Tabelle 24 Intrachargenvarianz für den *recomWell* HEV pig IgG FS
- Tabelle 25 Darstellung der Schlachthofeffekte im Vergleich zum Referenzschlachthof A
- Tabelle 26 Darstellung der Mastbetriebeffekte im Vergleich zum Referenzmastbetrieb Nr. 41

## **XI. DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme am Institut und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. Silke Wacheck und Dr. Maria Fredriksson-Ahoma möchte ich für die stets freundliche und engagierte Betreuung meiner Arbeit sehr herzlich danken. Ohne ihre kompetente Unterstützung wäre die zügige Realisierung dieses Projekts nicht möglich gewesen. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Der Firma Mikrogen GmbH, Neuried danke ich für die zur Verfügung gestellten Materialien und Gerätschaften. Sehr herzlich danken möchte ich Dr. Uli Mohn für seine stets freundliche Hilfestellung in allen Fragen rund um die Laborarbeit, sowie allen Mitarbeitern des ELISA-Labors der Abteilung Forschung und Entwicklung. Ich wurde dort sehr freundlich aufgenommen und in jeder Hinsicht unterstützt. Besonders erwähnen möchte ich dabei Jutta, Christina, Elke, Martina und Carola, die mich unermüdlich im Kampf gegen Washer, Magnetprüher und Zentrifuge unterstützt haben.

Durch die Aufgeschlossenheit der amtlichen Tierärzte in Bayern und die Freundlichkeit der Mitarbeiter der von mir beprobten Schlachthöfe gestaltete sich meine Probennahme sehr unkompliziert. Dafür ein herzliches Dankeschön.

Weiterhin danke ich Bernhard Ulm für seine Hilfestellung bei allen Fragen rund um die Statistik, was diese Arbeit in meinen Augen deutlich aufwertete.

Die Tierklinik Igling und ihre Mitarbeiter ermöglichte es mir durch einen toleranten Dienstplan, neben der Dissertation praktische Erfahrungen als Tierärztin zu sammeln, und mir so meinen Lebensunterhalt zu verdienen. Auch dafür schulde ich insbesondere meinem Chef Bolko Zencominierski Dank, der sich auf das Projekt „Dissertation und Teilzeitstelle“ eingelassen hat.

Meiner Familie und meinem Freund Cornelius danke ich für ihre Unterstützung in diesem sehr arbeitsintensiven und stressigen Abschnitt meines Lebens. Allen meinen Freunden möchte ich sagen, dass sie für mich immer ein Stückchen Urlaub bedeuten, und mir so dabei halfen, wieder Energie für meine Arbeit zu tanken.