

## Präventive Veterinärmedizin

### Nachweis und Charakterisierung von Hepatitis E im österreichischen Schweinekot

<b>Hauptstandort</b>	AGES IVET Mödling
<b>weitere Standorte</b>	
<b>Thematische Schwerpunkte</b>	Entwicklung innovativer Methoden und Technologien zur Verbesserung der Tiergesundheit, sowie Monitoring- und Testverfahren

#### Success Story Kurzversion

##### Nachweis und Charakterisierung von Hepatitis E Virus im österreichischen Schweinekot

Eine Übertragung des Hepatitis E Virus (HEV) ist per Kontaktinfektion fäkal-oral und über das Wasser möglich und tritt hauptsächlich bei Schwangeren, älteren und immunsupprimierten Menschen auf. Vorangehende Untersuchungen (2) lassen den Schluss zu, dass das zoonotische Potential von HEV in österreichischen Hausschweinen durchaus relevant für die öffentliche Gesundheit sein könnte. Diese Studie dient der Entwicklung eines nationalen Monitoring- und Überwachungssystems, um diese Zoonose künftig besser abschätzen zu können.

#### Success Story Langversion

##### Einleitung

Hepatitis E (HEV) ist ein kleines, nicht umhülltes einzelsträngiges positives RNA Virus der Familie *Hepeviridae*. Eine Übertragung von Hepatitis E Virus ist per Kontaktinfektion fäkal-oral und über das Wasser möglich, wohingegen eine Tröpfcheninfektion von Person zu Person noch nicht nachgewiesen werden konnte. Die Erkrankung ist klinisch nicht von Hepatitis A zu unterscheiden und tritt seltener, hauptsächlich bei Schwangeren, älteren und immunsupprimierten Menschen auf.

Die Präsenz von HEV RNA in Kot, Serum und Organproben (hauptsächlich Leber), sowie die hohe Seroprävalenz von anti-HEV Antikörpern in Schweinen sind bereits in vielen entwickelten asiatischen Ländern, Nord-Amerika (1), sowie auch europäischen Ländern (1) beschrieben, was auf eine weite Verbreitung von HEV innerhalb der Schweineherden hindeutet, manche von ihnen weisen sogar eine Prävalenz von 100% auf.

In einer vorangegangenen Studie (2) wurde bereits eine neue one-step real-time RT PCR Methode (RT-qPCR) zur Untersuchung von Hepatitis E Virus aus Leber und Galle entwickelt. Nun gilt es zuerst die bereits entwickelte RT-qPCR Methode auf die Untersuchung von Kotproben zu erweitern, und weiters eine vollständig automatisierte Extraktionsmethode für beide Matrixes, Leber und Kot zu etablieren, um damit auch Untersuchungen an lebenden Schweinen durchführen zu können.

Die Studie dient der Entwicklung eines nationalen HEV Monitoring- und Überwachungssystems in der Hausschweinepopulation, um diese Zoonose künftig besser abschätzen zu können.

##### Material & Methoden

Es wurde eine auf dem ORF3 Gen basierende HEV RT-qPCR, mit einem QuantiTect® Virus Kit (Qiagen) durchgeführt. Dabei wurden der dynamische Bereich, sowie die Sensitivität der neuen HEV RT-qPCR in Positivproben und mit einer in vitro Transkript RNA bestimmt. Weiters wurde die Spezifität anhand bekannter Schweineviren und bakteriologischer Pathogene getestet (2).

Zusätzlich wurde eine RNA Extraktion aus Leber und Kot mittels einem „high-throughput“ vollautomatisierten Extraktionsroboter anhand zweier unterschiedlicher Kits von Macherey & Nagel etabliert um die Laborkapazitäten zu erhöhen. Schlussendlich wurden dann Kot und Leber von insgesamt 316 Schweinen auf HEV untersucht. Die Schweine wurden in einem Alter von 1-3 Monaten willkürlich selektiert und stammten aus 3 verschiedenen Tierkörperverwertungsanstalten, sowie aus der Pathologie Abteilung der AGES IVET Mödling.

Anschließend wurde das bereits getestete HEV RT-qPCR Protokoll von Single-plex auf Duplex erweitert, und verschiedene endogene Gene (Ubiquitin,  $\beta$ -Aktin) und exogene Kontrollen (künstliche RNA, EGFP), sowie diverse Mastermix Systeme getestet, um falsch negative Ergebnisse zu verhindern.

Für die Validierung eines geeigneten HEV RT-qPCR Duplex Protokolls wurden ebenfalls 2 verschiedene Kits getestet. Um den dynamischen Bereich der RT-qPCR bestimmen zu können wurde eine Verdünnungsreihe eines HEV in vitro Transkriptes durchgeführt, auf deren Regressionsgeraden dann die positiven Feldproben eingezeichnet und quantifiziert wurden. Ebenfalls wurden auch Verdünnungsreihen der positiven Kot- und Leberproben durchgeführt um einen Detektionsbereich in Feldproben ermitteln zu können.

Schlussendlich wurde ein Multi-Spezies HEV-indirekter ELISA der Firma IDvet (veterinary diagnostic kits, Frankreich) anhand 84 deutscher Wildschweinproben und 4 in der PCR bereits positiver österreichischer Wildschweinproben

getestet. Parallel wurden auch 49 Lymphknoten der deutschen Wildschweine und 67 österreichische Wildschweine mittels RT-qPCR getestet. Von den deutschen Wildschweinen waren keine in der RT-qPCR positiv, von den österreichischen konnten 17 als positiv detektiert werden. Diese Wildschweine stammten allerdings aus insgesamt 2 verschiedenen Gattungen. Es ist angedacht, bei der bevorstehenden Prävalenzstudie auch die Feldproben mittels ELISA parallel mit zu untersuchen.

### Ergebnisse

Von den insgesamt 316 untersuchten Schweinen wurden 50 (16%) Tiere in der RT-qPCR positiv getestet. Die real-time PCR Cq Werte variierten zwischen 19,65 – 37,12 in der Leber und zwischen 21,0 – 36,66 im Kot. Unter diesen positiv getesteten Tieren konnte bei 24 Fällen (8%) der Hepatitis E Virus in Kot und Leber parallel nachgewiesen werden, darunter stammen 4 aus Niederösterreich, 6 weitere aus dem Burgenland und 14 aus der Steiermark. In den übrigen 26 positiven Schweinen (8%) konnte HEV nur in Leber oder Kot gefunden werden, wobei 4,2x öfter in Leber als im Kot. Die Verteilung der Positivfälle, basierend ihrer Herkunft ist in Tabelle 1 näher dargestellt.

TKV	HEV Detektion				
	Leber und Kot	nur Leber	nur Kot	pos. Tiere	Gesamt
<b>Niederösterreich</b>	4 (7%)	1 (2%)	0 (7%)	5 (9%)	55
<b>Burgenland</b>	6 (12%)	0 (0%)	3 (6%)	9 (18%)	51
<b>Steiermark</b>	14 (7%)	19 (10%)	2 (1%)	35 (18%)	200
<b>Abt. Pathologie</b>	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	1 (1%)	10
<b>Gesamt</b>	<b>24 (8%)</b>	<b>21 (7%)</b>	<b>5 (2%)</b>	<b>50 (16%)</b>	<b>316</b>

Tab 1: HEV Untersuchung in Leber und Kot österreichischer Hausschweine

Es hat sich herausgestellt, dass die exogene Kontrolle EGFP Mix 4 System, mit einer Länge von 277 bp, die geeignetste Kontrolle zur Untersuchung von Kotproben ist, da für eine endogene Kontroll mRNA zu wenige Zellen im Kot vorhanden sind.

Die Ergebnisse des ELISAs deckten sich sehr gut mit den Ergebnissen aus der PCR Untersuchung. 3 der deutschen Wildschweine und alle 4 österreichischen Wildschweine waren positiv.

### Diskussion

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Untersuchung von HEV von Schweinekotproben mittels einer Roboterextraktion, gefolgt von einer spezifischen one-step RT-qPCR erfolgreich funktioniert und dadurch das Ausscheidungsmuster von HEV in diesen Ferkeln bestimmt werden konnte.

Weiters deuten diese Resultate auf die Hypothese, dass bereits mindestens 16% der österreichischen getesteten Schweine schon vor der Schlachtung mit HEV infiziert sein könnten.

Allerdings zeigten unsere Ergebnisse auch, dass das Virus nicht immer ausgeschieden wird bzw. nicht immer in ausreichender Menge, da das Virus vermehrt in Leberproben gefunden wurde. In 21 Schweinen konnte HEV zwar in Leber, jedoch nicht im Kot detektiert werden, diese würden in einer Pre-mortem Untersuchung nicht gefunden werden.

Die Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass das zoonotische Potenzial von Hepatitis E in österreichischen Hausschweinen durchaus relevant für die öffentliche Gesundheit sein könnte. Es ist daher unbedingt erforderlich, die Häufigkeit des Hepatitis E Virus in der österreichischen Schweineproduktionskette sowie potentielle Übertragungswege zu untersuchen, um eine mögliche zoonotische Gefährdung von beruflichen Risikogruppen, wie Jäger, Fleischhauer oder auch Tierärzte, oder KonsumentInnen bewerten zu können.

Um falsch negative Untersuchungsergebnisse auszuschließen wurde weiterführend eine duplex real-time RT-PCR mittels endogener und exogener Kontrollen durchgeführt. Es hat sich herausgestellt, dass die exogene Kontrolle EGFP Mix 4 System für die Untersuchung von Kotproben am geeignetsten ist, da in den Kotproben nicht genügend Zellen für einen endogenen Kotrollen-Nachweis vorhanden sind.

### Referenzen

(1) Pavio et al. (2010). Vet. Res. 41:46, DOI: 10.1051/vetres/2010018

(2) Zwettler et al., *Hepatitis E virus in Austrian pigs detected by a new RT-qPCR*; Publikation in Arbeit

### Kontakt:

AGES – Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling  
 Prof. Dr. Friedrich Schmoll  
 Robert Koch-Gasse 17  
 A-2340 Mödling  
 05 0555/38200  
 friedrich.schmoll@ages.at

