

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

## **Das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus beim Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung**

Eine Analyse der Vorhersagekraft der Fleischsaftserologie  
auf das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus in Leber und  
Muskulatur beim Schwein und des Auftretens einer  
möglichen Kreuzkontamination im Schlachthof

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Janine Dzierzon**  
Tierärztin aus Velbert

Berlin 2022  
Journal-Nr.: 4349







Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus beim Mastschwein zum Zeitpunkt der  
Schlachtung**

Eine Analyse der Vorhersagekraft der Fleischsaftserologie auf das Vorkommen von  
Hepatitis-E-Virus in Leber und Muskulatur beim Schwein und des Auftretens einer möglichen  
Kreuzkontamination im Schlachthof

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Janine Dzierzon**  
Tierärztin aus Velbert

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4349

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: *Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler*

Erster Gutachter: *Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken*

Zweiter Gutachter: *Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz*

Dritter Gutachter: *PD Dr. Roswitha Merle*

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, pig finishing, hepatitis e virus, liver, muscle, pathogens, foodborne diseases, zoonoses, slaughter, carcasses, seroprevalence, abattoirs, boxes, meat, contaminations, food safety, meat hygiene, public health

Tag der Promotion: 23.05.2022

Meiner Mutter  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Das Hepatitis-E-Virus .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Historie.....	3
2.1.2. Morphologie und Genom .....	4
2.1.3. Taxonomie .....	4
2.1.4. Epidemiologie .....	6
2.1.4.1. Geographische Verteilung und Übertragungswege.....	6
2.1.4.2. Reservoir.....	9
2.1.4.3. Vorkommen in Lebensmitteln .....	10
<b>2.2. Die Hepatitis E.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Pathogenese.....	13
2.2.2. Klinik und Pathologie .....	15
2.2.3. Prävention und Therapie .....	17
<b>2.3. Labordiagnostik.....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Direkter Nachweis von HEV .....	19
2.3.1.1. Elektronenmikroskopie.....	19
2.3.1.2. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	20
2.3.1.3. Zellkultur .....	21
2.3.2. Indirekter Nachweis von HEV .....	22
2.3.2.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	22
<b>3. PUBLIKATION I .....</b>	<b>25</b>
<b>4. PUBLIKATION II .....</b>	<b>32</b>
<b>5. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Diskussion des Studiendesigns.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.2.1. HEV-Prävalenzen .....	42
5.2.2. HEV-Serologie als diagnostisches Instrument.....	45

5.2.3. HEV-Kreuzkontamination .....	46
<b>5.3. Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>49</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>50</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>52</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>Publikationen mit Peer-Review-Verfahren .....</b>	<b>IX</b>
<b>Vorträge.....</b>	<b>X</b>
<b>Poster .....</b>	<b>XI</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>XII</b>
<b>FINANZIERUNGSQUELLEN.....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTERESSENKONFLIKTE.....</b>	<b>XIV</b>
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>XV</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C Grad Celsius

### A

ALT Alanin-Aminotransferase

AST Aspartat-Aminotransferase

### B

BZgA Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung

### C

CDC *englisch* Centers for Disease Control and Prevention

cDNA komplementäre DNA (*englisch* complementary DNA)

CI Konfidenzintervall (*englisch* confidence interval)

### D

DNA Desoxyribonukleinsäure (*englisch* deoxyribonucleic acid)

DOI *englisch* Digital Object Identifier

### E

ECDC Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten  
(*englisch* European Centre for Disease Prevention and Control)

EFSA *englisch* European Food Safety Authority

ELISA *englisch* Enzyme-linked Immunosorbent Assay

### G

$\gamma$ -GT Gamma-Glutamyl-Transferase

### H

HAV Hepatitis-A-Virus

HBV Hepatitis-B-Virus

HEV Hepatitis-E-Virus

HEV-1 Hepatitis-E-Virus Genotyp 1

HEV-2 Hepatitis-E-Virus Genotyp 2

HEV-3 Hepatitis-E-Virus Genotyp 3

HEV-4	Hepatitis-E-Virus Genotyp 4
HEV-5	Hepatitis-E-Virus Genotyp 5
HEV-6	Hepatitis-E-Virus Genotyp 6
HEV-7	Hepatitis-E-Virus Genotyp 7
HEV-8	Hepatitis-E-Virus Genotyp 8

## I

ICTV	<i>englisch</i> International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	<i>englisch</i> Impact Factor
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

## N

n	Größe der Stichprobe
nm	Nanometer

## O

OD%	optische Dichte ( <i>englisch</i> optical density)
OR	<i>englisch</i> Odds Ratio
ORF	offenes Leseraster ( <i>englisch</i> open reading frame)

## P

PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>englisch</i> polymerase chain reaction)
PRRSV	Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus

## Q

QS	QS Qualität und Sicherheit GmbH
----	---------------------------------

## R

RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>englisch</i> ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

**S**

scil. scilicet (*lateinisch* das heißt)

**U**

UKE Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**W**

WHO Weltgesundheitsorganisation (*englisch* World Health Organization)

**V**

VLP virusähnliche Partikel (*englisch* virus like particle)

**X**

$\chi^2$  Chi-Quadrat

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

## 2. LITERATURÜBERSICHT

<b>Abbildung 1:</b> Geographische Verteilung der HEV-Genotypen 1 bis 4.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Anzahl gemeldeter Hepatitis-E-Fälle beim Menschen in Deutschland.....	13
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung von HEV mittels Elektronenmikroskopie. ....	20
<b>Abbildung 4:</b> Funktionsprinzip des ELISA-Testsystems .....	23

## 4. PUBLIKATION II

*Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir*

<b>Fig. 1</b> After tagging every slaughter pig individually with a number (1-10) (1), corresponding livers were labeled using a sterile ear tag (2) and were stored in Euro meat containers (3) .....	34
<b>Fig. 2</b> Distribution of HEV RNA negative and positive porcine livers and the corresponding OD values, measured by HEV ELISA, of the sampled pigs .....	36

## TABELLENVERZEICHNIS

### 3. PUBLIKATION I

*High predictive power of meat juice serology on the presence of Hepatitis E virus in slaughter pigs*

<b>Table 1</b> Primer and probe sequences used for the detection of hepatitis E virus and bacteriophage MS2 RNA by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction according to Jothikumar et al. (2006) and Dreier et al. (2005) as combined previously by Althof et al.(2019).....	27
<b>Table 2</b> Detection of Hepatitis E virus antibodies in meat juice samples at herd level. ....	28
<b>Table 3</b> Hepatitis E virus seroprevalence and Hepatitis E virus RNA prevalence in liver and muscle. ....	28

### 4. PUBLIKATION II

*Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir*

<b>Table 1</b> Distribution of HEV ELISA <sup>a</sup> and real-time RT-PCR results .....	35
<b>Table 2</b> Distribution of porcine livers among Euro meat containers related to HEV status	36





## 1. EINLEITUNG

Das Hepatitis E Virus (HEV) stellt weltweit die häufigste Ursache für eine akute Virushepatitis beim Menschen dar. Dabei handelt es sich um die sogenannte Hepatitis E, die in Deutschland dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) nach zu den meldepflichtigen Krankheiten des Menschen zählt.

Das Robert Koch-Institut (RKI) verzeichnete für Deutschland in den vergangenen zehn Jahren einen Anstieg der übermittelten humanen Hepatitis-E-Krankheitsfälle von 166 auf 3.246 Fälle.

Die durch HEV verursachte Hepatitis E galt über viele Jahre hinweg als Reisekrankheit. Heute ist bekannt, dass die reiseassoziierte HEV-Infektion durch die HEV-Genotypen 1 und 2 (HEV-1 und HEV-2), insbesondere aufgrund von kontaminiertem Trinkwasser und Hygienemängeln in Ländern aus dem asiatischen und afrikanischen Raum verursacht wird. Hingegen ist die hohe Anzahl humaner Hepatitis-E-Fälle in Deutschland sowie in weiteren Industrieländern auf eine autochthone Infektion mit HEV der Genotypen 3 und 4 (HEV-3 und HEV-4) zurückzuführen. Dabei erfolgt die Infektion mit HEV-3 beziehungsweise HEV-4 überwiegend zoonotisch, unter anderem durch den Verzehr von Schweineleber sowie daraus hergestellten Wurstwaren, die infektiöse Viren enthalten und bei der Zubereitung nicht ausreichend gegart werden beziehungsweise zum Rohverzehr bestimmt sind.

Neben Wildschweinen und anderen Tierarten konnten insbesondere in Hausschweinen weltweit HEV-Antikörper mit einer Seroprävalenz von bis zu 98 % auf Einzeltierebene nachgewiesen werden. Zudem lassen die zahlreichen Nachweise von HEV-RNA im Lebergewebe bei Schweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung den Rückschluss zu, dass die Gefahr des Eintrags von HEV in die Lebensmittelkette über das Schwein gegeben ist und somit ein Risiko für den Verbraucher besteht.

Da die HEV-Infektion beim Schwein in der Regel einen subklinischen Verlauf zeigt und ohne makroskopische Veränderungen an Organen oder dem Schlachtkörper einhergeht, ist die Identifizierung HEV-infizierter Schweine am Schlachthof weder während der amtlichen Schlachtieruntersuchung noch während der amtlichen Fleischuntersuchung möglich.

Darüber hinaus existiert für HEV, im Gegensatz zu *Salmonella*, kein nationales Monitoringprogramm zur Verminderung des Eintrags von HEV in die Lebensmittelkette Schwein. In dem Zusammenhang fehlen auch Daten sowohl zur Überlebensfähigkeit von HEV im Lebensmittel und in der Umgebung als auch zu dem potenziellen Risiko

einer Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Schlachtorganen des Schweins. Vor diesem Hintergrund sind folgende zu bearbeitende Forschungsfragen Gegenstand dieses Promotionsvorhabens:

(1) Ist eine Vorhersage für das Vorkommen von HEV-Ribonukleinsäure (RNA) in der Leber und in der Schinkenmuskulatur von Mastschweinen anhand der serologischen Analyse von Fleischsaft möglich?

(2) Besteht das Risiko einer Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Schweinelebern auf HEV-negative Schweinelebern während der üblichen gemeinsamen Lagerung in Eurofleischkisten im Schlachthof?

Dabei werden für die unterschiedlichen Untersuchungen je Schlachtschwein zwei Gewebeproben der Leber, eine Probe aus der Schinkenmuskulatur sowie eine Probe aus dem Zwerchfell zur Gewinnung von Fleischsaft entnommen.

Die Muskelprobe wird aus der Schinkenmuskulatur gewonnen, da diese zur Weiterverarbeitung unter anderem zu Mett oder geräuchertem Schinken genutzt wird und damit als roh verzehrtes Lebensmittel eine Gefahr für den Verbraucher darstellen könnte.

Die Fleischsaftprobe wird wie im Rahmen des nationalen Salmonellenmonitorings aus der Zwerchfellpfeilmuskulatur durch Einfrieren und Auftauen gewonnen und auf HEV-Antikörper mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht.

Sowohl die Leber- als auch die Muskelproben werden mit Hilfe der real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf das Vorhandensein von HEV-RNA untersucht. Schließlich sollen die serologischen Ergebnisse mit der Nachweishäufigkeit von HEV-RNA in der Leber beziehungsweise in der Muskulatur verglichen werden. Mit der zweiten Leberprobe, welche an der Organoberfläche entnommen wird, wird das Vorhandensein einer Kreuzkontamination untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen eine wissenschaftliche Grundlage für die Entwicklung von Interventionskonzepten sowohl auf Bestandesebene als auch im Bereich der Schlachthygiene schaffen.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Das Hepatitis-E-Virus

#### 2.1.1. Historie

Die Geschichte des Hepatitis-E-Virus (HEV) begann mit dem Ausbruch einer schwerwiegenden infektiösen Hepatitis in Delhi, Indien, im Winter 1955/1956, an der etwa 29.300 Menschen erkrankten (Viswanathan 1957).

Die Epidemie ereignete sich zu einer Zeit, in der lediglich virale Hepatitiden verursacht durch das Hepatitis-A-Virus (HAV) und Hepatitis-B-Virus (HBV) bekannt waren. Die Untersuchung von tiefgefrorenen Serumproben aus dem Ausbruch in Delhi ungefähr 20 Jahre später konnte jedoch HAV und HBV als Ursache für die Hepatitis-Epidemie ausschließen und ließ epidemiologisch die Vermutung zu, dass es sich um einen bislang unbekanntem non-A-non-B-Hepatitis-erreger<sup>1</sup> handeln musste (Wong et al. 1980). Die Annahme, es könne sich bei dem unbekanntem Erreger ebenfalls um ein Virus handeln, erhärtete sich zunehmend, nachdem der direkte Nachweis in einer Stuhlprobe eines non-A-non-B-Hepatitis-Patienten gelang und sich in diesem Zusammenhang virusähnliche Partikel im Elektronenmikroskop darstellen ließen (Balayan et al. 1983). Im Rahmen dieser Studie gelang es auch, Affen mit dem non-A-non-B-Hepatitis-erreger zu infizieren, die daraufhin eine Hepatitis entwickelten und virusähnliche Partikel (VLP) ausschieden (Balayan et al. 1983).

Im Jahr 1990 konnten Teile des Genoms schließlich zum ersten Mal kloniert und sequenziert werden (Reyes et al. 1990). Reyes et al. bestätigten damit, dass es sich bei dem Erreger um ein RNA-Virus handelte und betitelten dieses, nach dem Vorschlag von Purcell und Ticehurst (1988), als ‚Hepatitis-E-Virus‘ (Reyes et al. 1990).

In den darauffolgenden Jahren wurden immer mehr neue Erkenntnisse über HEV bekannt. Dass Hausschweine, lateinisch *Sus scrofa domestica*, ebenfalls empfänglich für HEV sind, konnte erstmals 1990 gezeigt werden, als die experimentelle Infektion von Schweinen mit einem humanen HEV-Isolat gelang (Balayan et al. 1990). Mit der Identifizierung des im Englischen bezeichneten swine HEV als erster HEV-Tierstamm in den USA 1997 kam die Vermutung auf, dass es sich bei HEV um einen Zoonoseerreger handeln könnte, da das

---

<sup>1</sup> Non-A-non-B-Hepatitis: Übersetzung des englischen Begriffs *non-A, non-B hepatitis*, welcher in der Vergangenheit für die Bezeichnung einer Virushepatitis diente, die weder durch eine Infektion mit dem Hepatitis-A-Virus noch durch eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verursacht wurde.

Genom des swine HEV-Stammes eine enge phylogenetische Verwandtschaft mit dem Genom des humanen HEV-Stammes aufwies (Meng et al. 1997). Der Nachweis eines weiteren swine HEV-Stammes in Taiwan, dessen Genom ebenfalls Ähnlichkeit mit einem humanen HEV-Stamm zeigte, bekräftigte die Vermutung über das zoonotische Potenzial von HEV (Wu et al. 2000; Hsieh et al. 1999).

### **2.1.2. Morphologie und Genom**

Bei dem Hepatitis-E-Virus handelt es sich um ein Virus aus der Gruppe der unbehüllten RNA-Viren mit einem Durchmesser von 27 - 34 nm (Tam et al. 1991). Die Morphologie der HEV-Viren ähnelt im elektronischen Bild denen der Caliciviren (Balayan et al. 1983).

Das HEV-Kapsid ist ikosaedrischer Symmetrie und setzt sich aus 180 Kapsomeren zusammen, wobei jedes Kapsomer aus drei Hauptdomänen besteht: der S-Domäne (*englisch* shell domain), der M-Domäne (*englisch* middle domain) und der P-Domäne (*englisch* protruding domain) (Yamashita et al. 2009; Xing et al. 1999).

Das HEV-Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, dessen Gesamtgröße 7.500 Basenpaare umfasst. Das Genom setzt sich aus drei offenen Leserastern (ORFs) sowie kurzen 5' und 3' nichtkodierenden Regionen zusammen (Tam et al. 1991). Außerdem enthält das Genom einen 3'poly(A)-Schwanz (Reyes et al. 1990) und eine Cap-Struktur (7-Methylguanosin) am 5'-Ende (Kabrane-Lazizi et al. 1999). Die nichtkodierenden Regionen, der 3'poly(A)-Schwanz sowie die Cap-Struktur der RNA tragen vermutlich eine entscheidende Rolle beim Ablauf der viralen Replikation (Purdy et al. 1993b; Tam et al. 1991).

### **2.1.3. Taxonomie**

Dem hinten angestellten Buchstaben „E“ im Namen der durch HEV verursachten Hepatitis E können dem Autor Jameel (1999) nach verschiedene Bedeutungen beigemessen werden. Unter Berücksichtigung der Merkmale, die HEV unter epidemiologischen Gesichtspunkten beschreiben, könnte der Buchstabe „E“ so viel bedeuten wie „enterisch“, „endemisch“ oder „epidemisch“. Allerdings erweist sich der Buchstabe „E“ alphabethisch betrachtet als ebenso sinnvoll, da HEV an Position 5 der beim Menschen vorkommenden Hepatitiserreger nach dem Hepatitis-A-, Hepatitis-B-, Hepatitis-C- und Hepatitis-D-Virus eingeordnet wird (Jameel 1999). Verwandtschaftliche Beziehungen unter den Hepatitisviren existieren jedoch nicht. Jedes Virus ist für sich betrachtet einer eigenen Virusfamilie zuzuordnen (Rasche et al. 2019).

Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten und vergleichbaren physikalisch-chemischen Eigenschaften fand zunächst eine Einordnung in die Familie der *Caliciviridae* statt (Miller 1995; Bradley 1990). Intensive Genomanalysen rechtfertigten jedoch den Ausschluss von HEV aus der Familie der *Caliciviridae* (Berke und Matson 2000) und die Entstehung einer eigenständigen Gruppe, welche das Genus *Hepevirus* mit der Spezies *Hepatitis-E-Virus* umfasste (Emerson et al. 2005a).

Im 9. Bericht des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) aus 2009 wurde das Genus *Hepevirus* mit der Spezies *Hepatitis-E-Virus* sowie die Spezies *Avianes Hepatitis-E-Virus*, ohne Zugehörigkeit zu einem Genus, in die Familie der *Hepeviridae* eingeordnet (ICTV 2009).

Um zukünftig die Einordnung neuer Mitglieder in die Familie der *Hepeviridae* zu erleichtern, empfahlen Smith et al. (2014) eine Änderung beziehungsweise Anpassung der taxonomischen Klassifizierung, welche 2014 in der Master Species List des ICTV Umsetzung fand (ICTV 2014). Demnach existieren in der Familie der *Hepeviridae* bis heute die zwei Genera *Orthohepevirus* und *Piscihepevirus*. Dem Genus *Orthohepevirus* sind die Spezies *Orthohepevirus A*, *Orthohepevirus B*, *Orthohepevirus C* sowie *Orthohepevirus D* zugehörig (ICTV 2020; Smith et al. 2014). Innerhalb des Genus *Piscihepevirus* existiert lediglich die Spezies *Piscihepevirus A* (ICTV 2020; Smith et al. 2014), welche bei Forellen vorkommt (Smith et al. 2014).

Der Spezies *Orthohepevirus A* gehören alle bislang identifizierten HEV-Isolate von Menschen, Schweinen, Wildschweinen, Kaninchen, Rotwild, Mangusten und Kamelen an. Aviane HEV-Isolate von Hühnern fallen unter die Spezies *Orthohepevirus B*. Die Spezies *Orthohepevirus C* umfasst die Isolate von Ratte und Frettchen. Die Isolate von Fledermäusen sind der Spezies *Orthohepevirus D* zugeteilt (Smith et al. 2014).

Aufgrund der genomischen Heterogenität der verschiedenen HEV-Isolate entwickelte sich die Einteilung in Genotypen, die sich wiederum in eine Vielzahl von Subtypen unterteilen lassen (Smith et al. 2016; Lu et al. 2006).

Den *Orthohepevirinen A* gehören die Genotypen 1 bis 7 (HEV-1 bis HEV-7) (Smith et al. 2014) sowie der zuletzt in Kamelen entdeckte Genotyp 8 (HEV-8) an (Woo et al. 2016). Beim Menschen vorkommend sind die Genotypen 1 bis 4 sowie der Genotyp 7, wobei die Genotypen 3 und 4 zoonotisches Potential aufweisen und bei verschiedenen Tierarten, unter anderem beim Hausschwein, vorkommen (Kenney 2019; Smith et al. 2014). HEV-7 hingegen, als eine neuartige zoonotische HEV-Variante, ist in Kamelen verbreitet (Corman et al. 2020; Lee et al. 2016).

In Anlehnung an die Subtypen-Einteilung von Lu et al. (2006) und auf Grundlage der bis 2016 in der Sequenzdatenbank GenBank® verfügbaren HEV-Sequenzen gaben Smith et al. (2016) in ihrer Publikation im Jahr 2016 eine aktualisierte Übersicht über die HEV-Subtypen. Seither wird die Übersicht in der Datenbank des ICTV regelmäßig überarbeitet, sofern neue Informationen zu HEV-Subtypen verfügbar sind (Smith et al. 2016). Demnach sind für die humanrelevanten HEV-Genotypen 1 bis 4 mit Stand aus März 2021 folgende Subtypen beschrieben: für HEV-1 die sieben Subtypen 1a bis 1g, für HEV-2 die Subtypen 2a und 2b, für HEV-3 die Subtypen 3a bis 3n sowie insgesamt neun Subtypen, 4a bis 4i, für HEV-4 (ICTV 2021).

### **2.1.4. Epidemiologie**

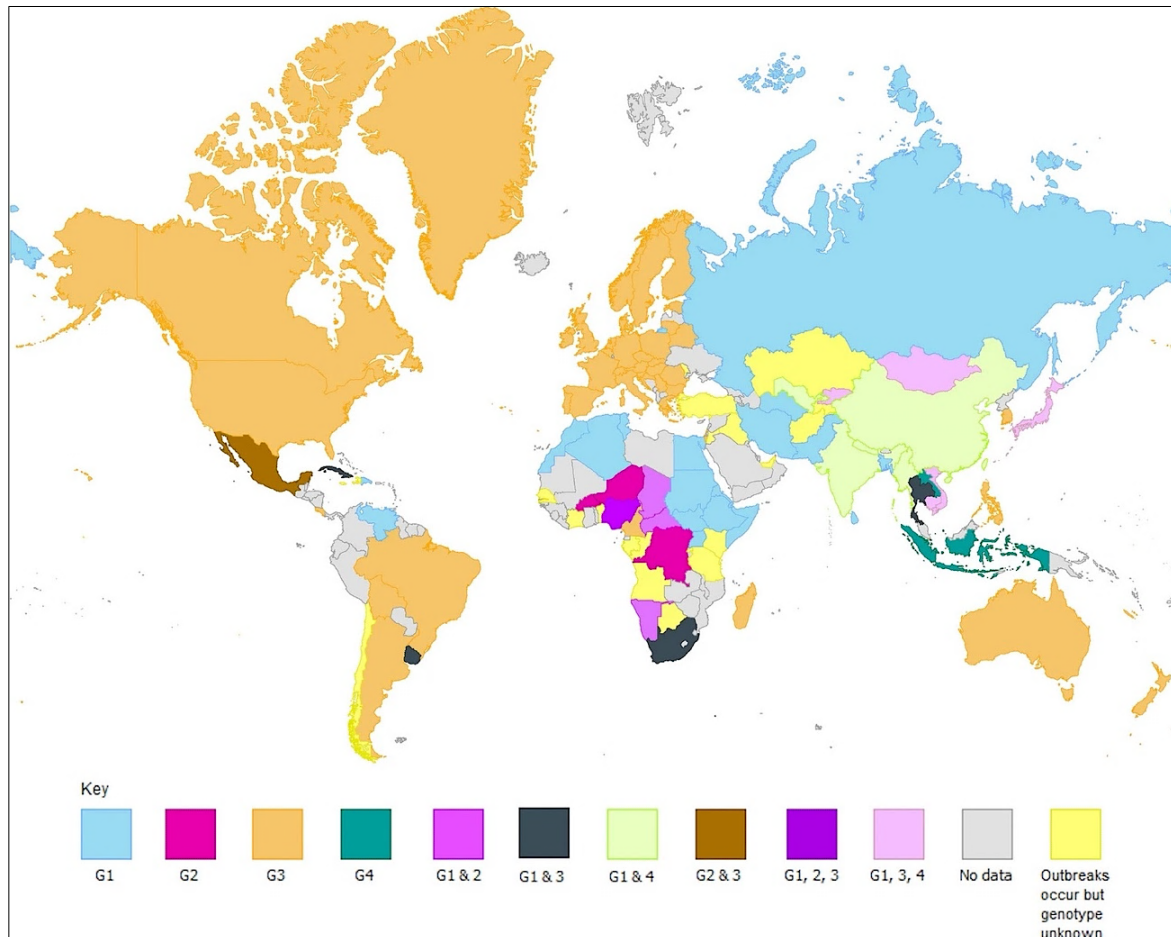
Der Fokus dieser Arbeit soll primär auf den humanpathogenen HEV-Genotypen 1 bis 4, insbesondere auf den zoonotischen Genotypen 3 und 4, welche auch beim Hausschwein nachweisbar sind, liegen. Aus diesem Grund werden weitere HEV-Genotypen in diesem sowie in den darauffolgenden Kapiteln nicht näher beschrieben.

#### **2.1.4.1. Geographische Verteilung und Übertragungswege**

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Studien aus verschiedenen Ländern, welche Erkenntnisse zur geographischen Verteilung der einzelnen HEV-Genotypen über die vergangenen Jahre bis heute zusammengetragen haben.

Unter anderem beschreiben Chandra et al. (2008) das Vorkommen der einzelnen HEV-Genotypen in bestimmten geographischen Regionen. Die Autoren weisen in dem Zusammenhang jedoch darauf hin, dass der einzelne HEV-Genotyp nicht unbedingt auf lediglich ein Gebiet beschränkt sein muss (Chandra et al. 2008). Dies deckt sich mit den Darstellungen von Treagus et al. (2021), Khuroo et al. (2016) und Pérez-Gracia et al. (2015), nach denen sich HEV-3 als scheinbar der Genotyp erweist, welcher bisher geografisch am weitesten verbreitet ist.

Eine der jüngsten Darstellungen der geographischen Verteilung der HEV-Genotypen ist in Abbildung 1 gezeigt, wobei sich auf die Verteilung der humanrelevanten Genotypen HEV-1 bis HEV-4 fokussiert wurde (Treagus et al. 2021).



**Abbildung 1:** Geographische Verteilung der HEV-Genotypen 1 bis 4.

Quelle: Treagus et al. (2021)

Wie von Treagus et al. (2021) in Abbildung 1 dargestellt und von Khuroo und Khuroo (2016) beschrieben, beschränkt sich das Vorkommen des HEV-Genotyps 1 überwiegend auf Lateinamerika sowie Länder der Kontinente Afrika und Asien, wo ein hyperendemisches Vorkommen der durch HEV-1 verursachten Hepatitis E beim Menschen vorherrscht (Khuroo et al. 2016; WHO 2010; Arankalle et al. 1999).

HEV-2 hingegen konnte in Mexiko (Lu et al. 2006; Arankalle et al. 1999) sowie in Westafrika isoliert werden (Khuroo und Khuroo 2016). Ferner ist HEV-2 gleichermaßen wie HEV-1 verantwortlich für endemische Ausbrüche in Afrika (Khuroo et al. 2016).

Hepatitis-E-Ausbrüche in Zusammenhang mit HEV-1 und HEV-2 sind in der Regel auf eine fäkoorale Übertragung durch HEV-kontaminiertes Trinkwasser und folglich auf schlechte Hygienebedingungen, insbesondere bei der Abwasserentsorgung, in den betreffenden Ländern zurückzuführen (Tripathy et al. 2019; EFSA 2017).

Darüber hinaus ist die vertikale Übertragung von HEV-1 durch infizierte Mütter auf ihre Feten beziehungsweise Ungeborenen beschrieben (Bigna et al. 2020; Khuroo et al. 2009; Kumar et al. 2004).

Die direkte Kontaktübertragung von Mensch zu Mensch für HEV-1 und HEV-2 scheint insbesondere bei Personen eines Haushalts grundsätzlich möglich, wurde in der Vergangenheit von diversen Autoren jedoch als ein Übertragungsweg von geringer Bedeutung genannt (Lewis et al. 2010; Somani et al. 2003; Aggarwal und Naik 1994).

HEV-Genotyp 3 verursacht autochthone sporadische Hepatitis-E-Fälle in Industrieländern (EFSA 2017; Dalton et al. 2007) und wurde weltweit aus Menschen und Tieren, unter anderem aus dem Hausschwein, isoliert (Ferri und Vergara 2021; Pavio et al. 2010). Die Übertragung auf den Menschen kann zoonotisch, zum Beispiel durch den Verzehr nicht ausreichend erhitzter Lebensmittel HEV-infizierter Schweine (Pallerla et al. 2020; Guillois et al. 2016; Colson et al. 2010; Feagins et al. 2007) erfolgen. Darüber hinaus sind auch Fälle bekannt, in denen eine Infektion von HEV-3 mit der Aufnahme von roh beziehungsweise unzureichend gegartem Wildschwein- (Rivero-Juarez et al. 2017) sowie Hirschfleisch (Takahashi et al. 2004; Tei et al. 2003) in Verbindung gebracht werden konnte.

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass in Personenkreisen mit direktem und regelmäßigem Kontakt zu potenziell HEV-infizierten Schweinen auffällig häufig HEV-Antikörper detektiert wurden (Teixeira et al. 2017). Zu diesen Personenkreisen zählen unter anderem Schlachthofmitarbeiter (Hoan et al. 2019), Schweinehalter und Veterinärmediziner (Huang et al. 2019; Teixeira et al. 2017) sowie auch Jäger (Schielke et al. 2015), die demnach einem erhöhten HEV-Infektionsrisiko durch den Umgang mit infizierten Schweinen ausgesetzt zu sein scheinen.

Die Übertragung von HEV-3 kann auch von Mensch zu Mensch über eine HEV-positive Bluttransfusion erfolgen (Hewitt et al. 2014; Boxall et al. 2006).

Schlosser et al. (2012) beschrieben in ihrer Studie zudem den Fall, dass einem deutschen Patienten durch die Transplantation der Leber eines HEV-positiven Spenders HEV-3 übertragen wurde.



Der HEV-Genotyp 4 zeigt sich überwiegend auf dem asiatischen Kontinent verbreitet (Khuroo und Khuroo 2016; Okamoto 2007). Innerhalb der letzten zehn Jahre konnten jedoch in Europa immer häufiger Fälle einer autochthonen Infektion beim Menschen mit HEV-4 in Verbindung gebracht werden (Bouamra et al. 2014; Garbuglia et al. 2013; Colson et al. 2012). Der HEV-Genotyp 4 wurde auch in Schweinen (Go et al. 2019; Monne et al. 2015; Hakze-van der Honing et al. 2011) und Wildschweinen (Sato et al. 2011) nachgewiesen. Die Identifizierung identischer HEV-4-Stämme bei Mensch und Schwein erbrachte schließlich den Nachweis über das zoonotische Übertragungspotential von HEV-4 (Colson et al. 2012).

### **2.1.4.2. Reservoir**

Das Hausschwein gilt weltweit als ein Hauptreservoir für HEV vom Genotyp 3 und 4 (Pavio et al. 2015; Meng 2010; Pavio et al. 2010). Die Wissenschaftler Meng et al. (1997) machten erstmals 1997 mit ihrer Studie auf das zoonotische Potential von swine HEV aufmerksam. Nachweise von HEV-Antikörpern sowie von HEV-RNA in verschiedenen Organen beziehungsweise Untersuchungsmedien von Schweinen aus unterschiedlichen Ländern, beispielsweise von Garcia et al. (2019), Li et al. (2019) und Feurer et al. (2018), verdeutlichen die vermeintlich weite Verbreitung von HEV bei dieser Spezies.

Neben Hausschweinen sind in der Literatur Wildschweine als weiteres Hauptreservoir für HEV-3 und HEV-4 beschrieben (Pavio et al. 2015; Pavio et al. 2010).

Zudem scheint HEV auch zwischen Haus- und Wildschweinen übertragbar zu sein (Pavio et al. 2016; Prpic et al. 2015; Schlosser et al. 2015).

Im Jahr 2003 konnten in Japan HEV-Infektionen bei Menschen auf den Verzehr von rohem Hirschfleisch zurückgeführt werden (Tei et al. 2003). Die Annahme über das Vorkommen von HEV-3 in Hirschen beziehungsweise in Reh- und Rotwild wurde in den darauffolgenden Jahren durch Untersuchungen in Deutschland, HEV-Nachweis in Reh- und Rotwild (Anheyer-Behmenburg et al. 2017), in Ungarn, HEV-Nachweis in Rehwild (Reuter et al. 2009) sowie in Japan, HEV-Nachweis in Hirschen (Sonoda et al. 2004) bestätigt und damit ebenfalls als Reservoir für HEV-3 identifiziert.

Neben den zuvor genannten Spezies existieren weitere, unter anderem landwirtschaftliche Nutztiere wie Ziegen (Long et al. 2017), Schafe (El-Tras et al. 2013) und Kaninchen (Izopet et al. 2012), als Reservoir für HEV. Dahnert et al. (2018) gelang darüber hinaus der

Nachweis von HEV-Antikörpern in Hunden, Katzen, Waschbären und Marderhunden in Deutschland.

Weiteren Untersuchungen nach repräsentieren Mangusten (Nidaira et al. 2012; Nakamura et al. 2006) sowie Delfine (Montalvo Villalba et al. 2017) Reservoirs für HEV-3.

Die HEV-Genotypen 1 und 2 sind als primär humanpathogen klassifiziert (Smith et al. 2014). In der Literatur existiert jedoch ein einziger Bericht aus Ägypten über den Nachweis von HEV-1-Antikörpern bei Pferden (Saad et al. 2007).

### **2.1.4.3. Vorkommen in Lebensmitteln**

Wissenschaftler wie Pallerla et al. (2020), Guillois et al. (2016), PAVIO et al. (2014) und Said et al. (2014) konnten mit Nachweisen von HEV-RNA in Schweineprodukten aufzeigen, dass HEV in der Lebensmittelkette Schwein zirkuliert und ursächlich für eine lebensmittelbedingte HEV-Infektion beim Menschen sein kann.

In Europa variieren die HEV-Prävalenzen in Schweinelebern, welche entlang der Schlachtlinie beprobt wurden, von 1 % bis 34 % (Garcia et al. 2019; Milojević et al. 2019; Feurer et al. 2018; Raspor Lainscek et al. 2017; Jori et al. 2016; Baechlein et al. 2013).

Außerhalb Europas konnte in Kolumbien eine hohe Prävalenz für HEV-3 in Schweinelebern am Schlachthof mit 41 % bestimmt werden (Gutierrez-Vergara et al. 2015). In derselben Studie erfolgte darüber hinaus eine Untersuchung auf HEV-RNA von Schweinelebern aus dem Einzelhandel, wobei 25 % der untersuchten Lebern HEV-positiv waren (Gutierrez-Vergara et al. 2015). Auch in Schweinelebern aus Supermärkten in den USA (Feagins et al. 2007), in Kanada (B. J. Wilhelm et al. 2016), in Indien (Kulkarni und Arankalle 2008), in Thailand (Intharasongkroh et al. 2017) und in China (Geng et al. 2019) sowie in Schweinelebern aus dem deutschen (Pallerla et al. 2020; Wenzel et al. 2011) beziehungsweise aus dem europäischen Einzelhandel (Boxman et al. 2019; Banks et al. 2010) konnte HEV-RNA nachgewiesen werden.

Neben der Leber vom Schwein gelang zudem der Nachweis von HEV in Schweinefleisch unterschiedlicher Teilstücke (Intharasongkroh et al. 2017; Di Bartolo et al. 2012).

Zum direkten Verzehr bestimmte Rohwürste vom Schwein konnten ebenfalls als Quelle für eine lebensmittelassoziierte HEV-Infektion beim Menschen in zahlreichen Studien eruiert werden (Boxman et al. 2019; Giannini et al. 2018; Szabo et al. 2015; PAVIO et al. 2014; Berto et al. 2012; Colson et al. 2010).

Die Bestimmung von HEV-RNA gelang darüber hinaus in der Muskulatur (Anheyer-Behmenburg et al. 2017; Schielke et al. 2015) sowie in der Leber von Wildschweinen (Anheyer-Behmenburg et al. 2017; Thiry et al. 2017; Montagnaro et al. 2015; Schielke et al. 2015; Adlhoch et al. 2009), wobei in der Studie aus Deutschland von Adlhoch et al. (2009) die höchste Prävalenz mit 38 % (n = 126) bestimmt wurde.

In der Studie von Montone et al. (2019) war auch Rohwurst vom Wildschwein HEV-positiv.

Weitere positive HEV-RNA-Nachweise gab es in Hirschfleisch (Tei et al. 2003), in der Leber von Rot- (Anheyer-Behmenburg et al. 2017; Thiry et al. 2017) und Rehwild (Anheyer-Behmenburg et al. 2017; Reuter et al. 2009) sowie in der Muskulatur von Rot- und Rehwild (Anheyer-Behmenburg et al. 2017).

Des Weiteren finden sich in der Literatur Studien zur Untersuchung von Meeresfrüchten auf das Vorkommen von HEV: so konnten Purpari et al. (2019), Rivadulla et al. (2019), Mesquita et al. (2016) und Gao et al. (2015) in zum Verzehr geeigneten Muscheln HEV-RNA nachweisen. Dies ist vermutlich auf eine HEV-Bioakkumulation im Zuge der Nahrungsaufnahme der Muscheln aus HEV-kontaminierten Gewässern zurückzuführen (Grodzki et al. 2014).

Auch HEV-kontaminiertes Wasser aus Bewässerungsanlagen von Obst- und Gemüseplantagen kann als Medium für die Übertragung von HEV auf Lebensmittel nicht tierischen Ursprungs fungieren (Kokkinos et al. 2017). Bisläng wurde in Erdbeeren (Brassard et al. 2012) sowie in gefrorenen Himbeeren (Maunula et al. 2013) HEV-RNA nachgewiesen. Auch in verschiedenen Gemüsesorten wurde HEV identifiziert (Purpari et al. 2019). In 3 % untersuchter Proben Blattsalat konnte in der Studie von Kokkinos et al. (2012) HEV-RNA isoliert werden. Zudem musste im Jahr 2018 unter anderem in Deutschland japanischer Wakame-Algensalat aufgrund des Nachweises von HEV-RNA aus dem Handel zurückgerufen werden (Anonymous 2018).

Bisläng ist ungeklärt, ob es sich bei den HEV-Nachweisen in den untersuchten Lebensmitteln um infektiöse, lebende Viren handelt, da für diese Aussage die Untersuchung von HEV in einem stabilen Zellkultursystem Voraussetzung ist. Solch ein Zellkultursystem ist bisläng für HEV jedoch nicht existent (Cook et al. 2017).

## 2.2. Die Hepatitis E

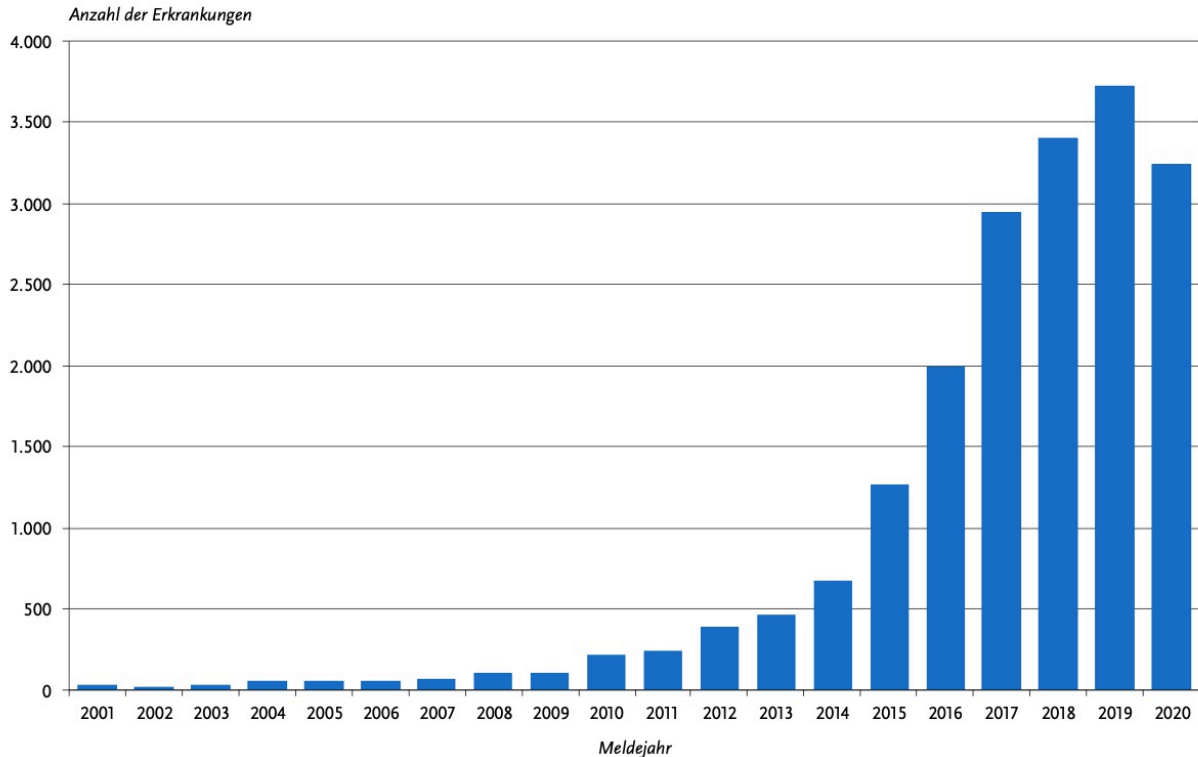
Bei der Hepatitis E handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung der Leber, welche durch eine Infektion mit HEV verursacht wird (Khuroo 2011).

In Europa betreffen die meisten humanen autochthonen HEV-Infektionen scheinbar überwiegend Menschen mittleren bis höheren Alters (Spada et al. 2018; Mansuy et al. 2016; Faber et al. 2012). Einen direkten Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Vorkommen von HEV-Antikörpern beim Menschen scheint es der Studie von Faber et al. (2012) nach nicht zu geben. Hingegen bringen die Wissenschaftler Spada et al. (2018) und Mansuy et al. (2004) eine höhere HEV-Seroprävalenz mit dem männlichen Geschlecht in Verbindung.

Insgesamt wurden im Zeitraum von 2005 bis 2015 in Europa und dem Europäischen Wirtschaftsraum 21.000 klinische Hepatitis-E-Fälle bei Humanpatienten gemeldet, wobei mehr als 60 % der Fälle Erkrankte in einem Alter von 50 Jahren oder älter umfassten (ECDC 2017).

In Deutschland gehört die Hepatitis E beim Menschen nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes zu den meldepflichtigen Krankheiten (§ 7 IfSG). Für die letzten zehn Jahre verzeichnete das RKI einen Anstieg der gemeldeten klinischen Fallzahlen beim Menschen von 221 auf 3.246 Fälle (RKI 2021, 2011).

Abbildung 2 zeigt die Entwicklung der gemeldeten Hepatitis-E-Krankheitsfälle für den Zeitraum von 2001 bis 2020 (RKI 2021).



**Abbildung 2:** Anzahl gemeldeter Hepatitis-E-Fälle beim Menschen in Deutschland.

Quelle: RKI (2021)

### 2.2.1. Pathogenese

Die Inkubationszeit beim Menschen wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit durchschnittlich zwei bis maximal zehn Wochen angegeben (WHO 2021), was sich mit den Daten aus den Studien von Azman et al. (2018) und Colson et al. (2010) deckt.

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, konnte sich bislang kein effizientes HEV-Zellkultursystem etablieren (Cook et al. 2017). Dies trägt nach Lhomme et al. (2016) unter anderem dazu bei, dass lediglich limitierte Informationen über die HEV-Pathogenese beim Menschen existieren. Bisher ist insbesondere wenig darüber bekannt, auf welchem Weg das Virus die Leber erreicht (Lhomme et al. 2016).

Bei der Aufnahme über das Trinkwasser oder über Lebensmittel erreicht HEV auf dem enterischen Weg zunächst den Darm (Lhomme et al. 2020). Nach der Studie von Williams et al. (2001) und der aktuellen Studie von Marion et al. (2020) scheint sich das Virus in den Darmzellen, scilicet (scil.) extrahepatisch, zu replizieren (*englisch* extrahepatic replication). Lhomme et al. (2020) vermuten, dass HEV anschließend hämatogen in die Leber gelangt. Eine jüngere Studie konnte aufzeigen, dass die HEV-Partikel schließlich aus den

Hepatozyten der Leber in die Galle freigesetzt und mit dem Stuhl ausgeschieden werden (Capelli et al. 2019).

Die durch die Infektion verursachte Leberschädigung entsteht vermutlich immunvermittelt durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (Lhomme et al. 2020).

Eine Virämie zeigt sich bei HEV-Infizierten in der Regel einige Tage vor dem Auftreten der Symptome und bleibt über einige Wochen bestehen (Chandra et al. 2010; Zhao et al. 2007; Aggarwal et al. 2000).

Ähnlich wie beim Menschen sind auch beim Hausschwein nur einige wenige Erkenntnisse zum Verlauf der HEV-Infektion bekannt. Es lässt sich jedoch durch das Zusammentragen einzelner Daten aus der Literatur folgender natürlicher Infektionsverlauf darstellen:

Auf Basis einer der ersten Studien zu HEV beim Schwein von Meng et al. (1997) sowie einer weiteren Studie aus 2011 von Casas et al. (2011a) besteht die Annahme, dass sich Schweine in einem Alter von zwei bis drei Lebensmonaten mit HEV infizieren. Dies ergänzt eine jüngere Studie von Krog et al. (2019), in der HEV-RNA im Kot von Ferkeln ab der 13. Lebenswoche detektiert werden konnte.

Die HEV-Infektion beim Schwein erfolgt primär fäkooral (Bouwknegt et al. 2008; Kasorndorkbua et al. 2004; Halbur et al. 2001).

Laut den Wissenschaftlern Bouwknegt et al. (2009) kommt es bei HEV-infizierten Schweinen nach einer Zeit von durchschnittlich sieben Tagen *post infectionem* zur Virusausscheidung über den Kot, welche sich anschließend über 23 Tage erstreckt. Eine Virämie wurde in der obengenannten Studie etwa zwei Wochen nach Beginn der fäkalen Virusausscheidung für durchschnittlich elf Tage beobachtet (Bouwknegt et al. 2009). Es scheint sich dabei um eine transiente Virämie zu handeln, die bis zu zwei Wochen anhält und die ohne klinische Symptome einhergeht (Bouwknegt et al. 2009; Halbur et al. 2001). Die beiden zuvor genannten Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass der Nachweis von HEV-RNA bis vier Wochen *post infectionem* in der Leber von infizierten Schweinen möglich war. Dabei scheinen die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie der Bilirubinwert im Blut nicht beziehungsweise nur schwach erhöht zu sein (Bouwknegt et al. 2009; Halbur et al. 2001).

Es besteht die Annahme, dass maternale HEV-Antikörper der Sau die Ferkel postnatal schützen und somit eine Virämie zeitlich verzögern können (Krog et al. 2019; Kanai et al. 2010).

### 2.2.2. Klinik und Pathologie

Die Forschungsgruppe der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zu Hepatitis-E-Virus-Infektionen beschreiben den klinischen Verlauf einer HEV-Infektion beim Menschen mit einem intakten Immunsystem als in der Regel asymptomatisch (Pischke et al. 2014).

Entwickelt sich jedoch eine akute symptomatische Hepatitis E, geht diese initial mit unspezifischen Symptomen wie Schwäche, Erbrechen sowie Gelenk- und Muskelschmerzen einher. Darauf können Symptome folgen wie Ikterus, entfärbter Stuhl und dunkel gefärbter Urin, die überwiegend spezifisch für eine Hepatitis sind und den Beginn der ikterischen Phase anzeigen (Pischke et al. 2014; Wedemeyer et al. 2012).

Pischke et al. (2014) erläutern weiter, dass sich in der Blutanalyse eine Zunahme der Leberenzyme ALT und AST sowie erhöhtes Bilirubin, eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) zeigen können.

Die Untersuchung von Blutproben von Patienten mit einer akuten Hepatitis E auf HEV-spezifische Antikörper durch die Wissenschaftler Huang et al. (2010) zeigte, dass Antikörper der Klasse Immunglobulin M (IgM) erstmals am Ende der Inkubationszeit nachweisbar waren. Diese Antikörper verblieben in der zuvor genannten Studie durchschnittlich acht Wochen auf hohem Antikörperlevel. Etwa vier Wochen nach der Inkubationszeit fand auch die Bildung von Immunglobulin G (IgG) auf hohem Level statt, welche sich über ein Jahr im menschlichen Körper nachweisen ließen (Huang et al. 2010).

In der Studie von Guillois et al. (2016) aus Frankreich entwickelten sich bei bis zu einem Drittel der Patienten, welche unter einer HEV-3- beziehungsweise HEV-4-Infektion litten, klinische Symptome. In dem Zusammenhang scheint den Ergebnissen der jüngeren Studie von Lhomme et al. (2019) zufolge das Auftreten von Symptomen während einer HEV-Infektion abhängig von der Viruslast zu sein, da bei symptomatischen Patienten eine höhere HEV-Konzentration im Blut im Vergleich zu asymptomatischen HEV-Infizierten nachweisbar war.

Im Allgemeinen ist die Hepatitis E in immunkompetenten Patienten selbstlimitierend. Bei der akuten Hepatitis E klingen die Symptome nach einigen Wochen ab (Lhomme et al. 2020). Die Entwicklung eines akuten Leberversagens, bedingt durch eine Infektion mit HEV-3 oder HEV-4, ist beschrieben, tritt jedoch häufiger bei Patienten mit Alkoholsucht und chronischer Lebererkrankung (Péron et al. 2007) als bei Patienten mit intaktem Immunsystem (Fontana et al. 2016; Manka et al. 2015) auf.

Ferner ist bekannt, dass insbesondere Patienten mit einem geschwächten Immunsystem, wie zum Beispiel Transplantatempfänger (Koning et al. 2013; Pischke et al. 2010; Kamar et al. 2008a; Kamar et al. 2008b) oder HIV-Patienten (Merchante et al. 2015; Kenfak-Foguena et al. 2011), eine chronische Hepatitis E bis hin zur Leberzirrhose entwickeln können.

In den zuvor genannten Studien war der chronische Verlauf einer Hepatitis E auf eine Infektion mit dem HEV-Genotyp 3 zurückzuführen, wobei eine Chronifizierung auch mit einer HEV-4-Infektion (Geng et al. 2014) in Verbindung gebracht werden konnte. Beobachtungen aus Japan zufolge scheint ein schwerer Verlauf der Hepatitis E sogar häufiger mit einer Infektion vom HEV-Genotyp 4 als vom HEV-Genotyp 3 assoziiert zu sein (Takahashi und Okamoto 2014; Mizuo et al. 2005).

Neben einer Hepatitis ist in HEV-infizierten Patienten zudem die Entwicklung verschiedener extrahepatischer Manifestationen beschrieben, unter anderem Neuropathien in Form des Guillain–Barré-Syndroms (Stevens et al. 2017; van den Berg et al. 2014).

Bei Schwangeren, die mit HEV vom Genotyp 1 infiziert sind, kann in endemischen Regionen auch eine akute Hepatitis E einen schweren Verlauf nehmen und unter Umständen mit dem Tod einhergehen (Bonney et al. 2012; Khuroo et al. 2009; Patra et al. 2007). In der Studie aus Indien von Kumar et al. (2004) betrug die Mortalitätsrate unter HEV-positiven Schwangeren 27 %. Aufgrund der bereits 1995 von Khuroo et al. (1995) beschriebenen möglichen vertikalen Übertragung in Endemiegebieten, kann auch der Fetus beziehungsweise das Ungeborene von einem schweren Verlauf betroffen sein (Sharma et al. 2017; Bonney et al. 2012). Dabei können Frühgeburten und Aborte (Khuroo et al. 2009; Patra et al. 2007) sowie Hepatitiden und Letalität (Khuroo et al. 2009) beim Fetus im perinatalen beziehungsweise beim Neugeborenen im postnatalen Zeitraum auftreten.

Beim Schwein zeigt die HEV-Infektion einen subklinischen Verlauf und geht aus diesem Grund ohne Symptome einher (Bouwknegt et al. 2009; Halbur et al. 2001; van der Poel et al. 2001; Meng et al. 1998).

In der Histopathologie der Leber kann sich jedoch eine mäßige lymphohistiozytäre Hepatitis zeigen (Bouwknegt et al. 2009). Darüber hinaus konnten Bouwknegt et al. (2009) in der histopathologischen Untersuchung eine leichte bis mäßige Hyperplasie der Peyer'schen Platten im Ileum sowie eine leichte bis mäßige Hyperplasie der Lymphknoten nachweisen. Auch Halbur et al. (2001) beschreiben die Leber- sowie Mesenteriallymphknoten HEV-infizierter Schweine als mäßig vergrößert.



Die IgG-Serokonversion wird mit vier bis acht Wochen für experimentell infizierte (Meng et al. 1998) beziehungsweise mit elf bis dreizehn Wochen für natürlich infizierte Schweine (Krog et al. 2019; Casas et al. 2011a) *post infectionem* angegeben.

IgM scheinen im Schwein für ein bis zwei Wochen nachweisbar, während IgG-spezifische HEV-Antikörper mindestens über zehn Wochen (Meng et al. 1998) beziehungsweise bis zum Schlachtagalter verfügbar sind (Krog et al. 2019; Casas et al. 2011a).

### **2.2.3. Prävention und Therapie**

Empfehlungen zur Prävention einer HEV-Infektion beim Menschen in endemischen Regionen Afrikas und Asiens berufen sich in erster Linie auf allgemeine Hygieneregeln, auf den Zugang zu sauberem Trinkwasser sowie auf die ordnungsgemäße Entsorgung von Abwässern (Khuroo et al. 2016; Pavio et al. 2010).

In Industrieländern mit hohen Hygienestandards, in denen überwiegend eine zoonotische HEV-Übertragung vorherrscht, scheint die Aufklärung des Verbrauchers hinsichtlich der Risiken bei der Zubereitung und dem Verzehr von rohen oder nicht ausreichend gegarten Produkten vom Schwein zielführend zu sein (Doceul et al. 2016; Pavio et al. 2010).

Zur allgemeinen Aufklärung des Verbrauchers im Umgang mit Lebensmitteln existieren von der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) dem allgemeinen Infektionsschutz dienenden Maßnahmen zur Küchen- und Lebensmittelhygiene (BZgA 2020). Auch die WHO informiert mit einer weltweiten Kampagne der sogenannten „Five keys to safer food“ über die Verhütung lebensmittelbedingter Krankheiten (WHO 2019).

Einige Studien zeigten, dass eine ausreichende Hitzeeinwirkung eine Reduktion beziehungsweise eine Inaktivierung von infektiösem HEV bewirken kann (Johne et al. 2016; Barnaud et al. 2012; Schielke et al. 2011; Feagins et al. 2008; Emerson et al. 2005b).

Personenkreisen, wie Schweinehaltern und Veterinärmedizinern, die häufigen Kontakt mit potenziell HEV-infizierten Tieren haben, empfehlen Pavio et al. (2010) entsprechende Hygienemaßnahmen zu achten. Insbesondere wird das Tragen von Handschuhen zum eigenen Infektionsschutz im Umgang mit erlegtem Wild (Schielke et al. 2015) sowie während der tierärztlichen Tätigkeit im Rahmen der Schweinebestandsbetreuung (Taus et al. 2019) empfohlen.

Über obengenannte Maßnahmen hinaus beschäftigten sich diverse Studien wie die von Nan et al. (2018), Li et al. (2005b) und Purdy et al. (1993a) seit der Entdeckung von HEV mit der Entwicklung einer geeigneten Immunprophylaxe.

Die Ergebnisse aus den Studien von Li et al. (2005a) und Li et al. (2005b) ermöglichten schließlich zu Beginn 2012 die Zulassung des HEV-Impfstoffs Hecolin® (Xiamen Innovax Biotech Co., Xiamen, China) (Nan et al. 2018). Die Zulassung beschränkt sich nach aktueller Literaturrecherche auf China, weshalb der Impfstoff noch nicht in anderen Ländern kommerziell erhältlich ist (Nan et al. 2018).

Die Basis des Impfstoffes bildet ein rekombinantes HEV-Peptid aus dem ORF2 eines chinesischen HEV-1-Stammes (Li et al. 2005a; Li et al. 2005b).

In Phase III der klinischen Studie in China hat sich der Impfstoff bei Männern und Frauen in einem Alter zwischen 16 und 65 Jahren als sicher und wirksam gegen Hepatitis E erwiesen (Zhang et al. 2015; Zhu et al. 2010).

Fraglich ist bislang, inwieweit sich dieser Impfstoff gegen alle humanpathogenen HEV-Genotypen richtet (Nan et al. 2018) und ob auch immunsupprimierte Patienten wie Transplantatempfänger präventiv vor einer HEV-Infektion geschützt werden können (Pischke et al. 2014).

Laut der WHO (2015a) gibt es für den Impfstoff aufgrund offener Fragen und mangelnder Erfahrung keine Empfehlung zum Routineeinsatz.

Zur Behandlung einer chronischen Hepatitis E sind verschiedene Therapieansätze, unter anderem mit Ribavirin (Rivero-Juarez et al. 2020; Kamar et al. 2014; Kamar et al. 2011) und pegyliertem Interferon (Haagsma et al. 2010; Kamar et al. 2010), untersucht worden. Insbesondere die Anwendung von Ribavirin wird empfohlen, sofern eine Viruselimination durch die Reduzierung der immunsuppressiven Medikation nicht gelingt (Rivero-Juarez et al. 2020; Kamar et al. 2011).

Für Hausschweine ist bis heute weltweit kein Impfstoff gegen HEV verfügbar, wobei aktuelle Studien in diesem Bereich bereits publiziert wurden (Behloul et al. 2020; Liu et al. 2019). Ferner fehlen HEV-Monitoring-Programme entlang der Produktionskette vom Schwein (Salines et al. 2017).

Die Wissenschaft verfolgt vermehrt das Ziel, die bis dato eher wenig bekannten Risikofaktoren für eine HEV-Infektion beim Schwein und die daraus resultierenden Präventionsmaßnahmen zu erfassen. Bislang wurden unter anderem die Herdengröße (Lopez-Lopez et al. 2018), die Biosicherheit im Betrieb (B. Wilhelm et al. 2016; Walachowski

et al. 2014), die Betriebsform (Rutjes et al. 2014), die Genetik der Sauen (Walachowski et al. 2014) sowie die Fütterung (Hinjoy et al. 2013) als mögliche Risikofaktoren in Betracht gezogen.

### **2.3. Labordiagnostik**

Aus der Tatsache heraus, dass beim Schwein die HEV-Infektion subklinisch und ohne makroskopische Veränderungen an den Organen verläuft (Bouwknegt et al. 2009; Halbur et al. 2001; van der Poel et al. 2001; Meng et al. 1998), resultiert, dass die Identifizierung einer HEV-Infektion bei dieser Spezies weder bei der amtlichen Schlachtier- noch bei der amtlichen Fleischuntersuchung möglich ist. Zum Nachweis einer HEV-Infektion bedarf es daher der molekularbiologischen beziehungsweise serologischen Labordiagnostik (Chandra et al. 2008), welche in den folgenden Unterkapiteln 4.1. sowie 4.2. ausgeführt werden.

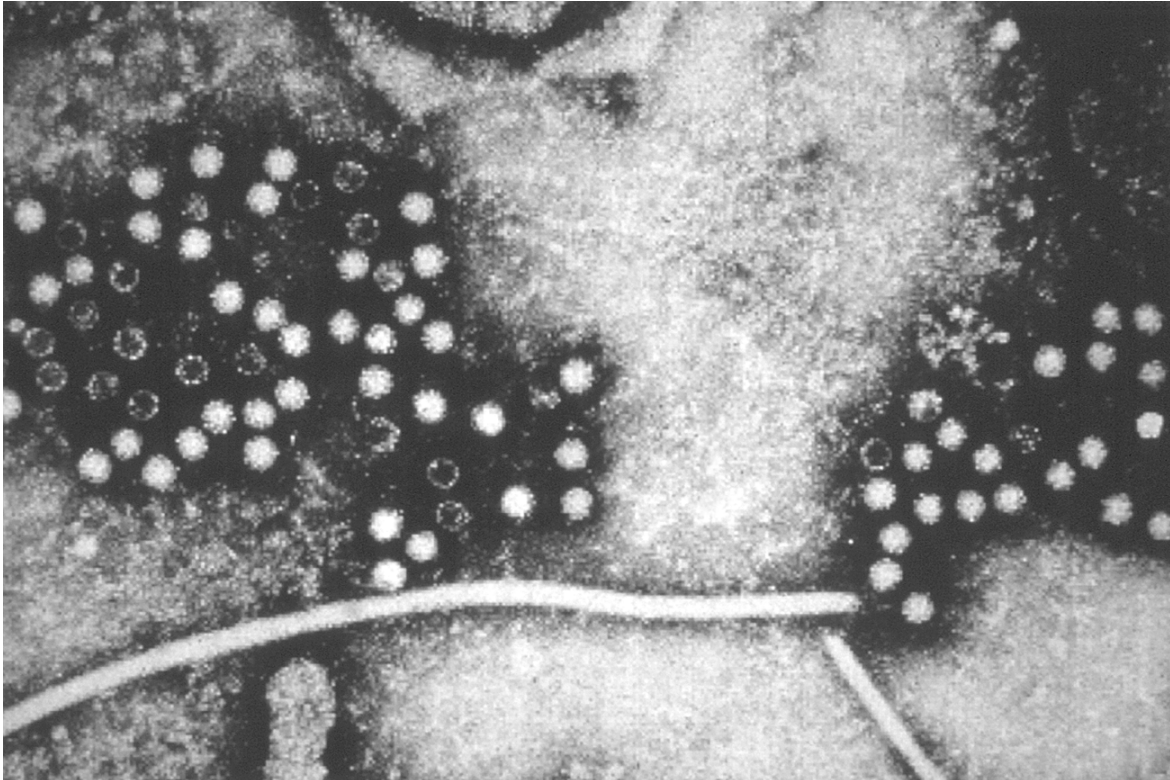
#### **2.3.1. Direkter Nachweis von HEV**

Der direkte Nachweis von HEV-RNA hat neben der Diagnostik bei Mensch und Schwein eine entscheidende Bedeutung für Lebensmittel tierischen und nicht-tierischen Ursprungs, die als potenzielle Quelle für eine HEV-Infektion beim Menschen gelten (van der Poel et al. 2018).

##### **2.3.1.1. Elektronenmikroskopie**

Wie die Abbildung 3 aus der Public Health Image Library der Centers for Disease Control und Prevention (CDC) (CDC 2021) zeigt, ist es möglich, HEV-Virionen mithilfe der Elektronenmikroskopie darzustellen.

Lange Zeit vor der Etablierung molekularer Nachweismethoden wurde die elektronenmikroskopische Darstellung der Virionen aus Stuhlproben zur HEV-Diagnostik beim Menschen genutzt (Balayan et al. 1983). Die Ähnlichkeit mit *Caliciviren* kann jedoch, wie in der Vergangenheit bereits beschrieben (Bradley und Balayan 1988; Balayan et al. 1983), die eindeutige Identifizierung von HEV erschweren. Zudem ist die Elektronenmikroskopie mit einem sehr hohen apparativen und zeitlichen Aufwand verbunden (Panda et al. 2007).



**Abbildung 3:** Darstellung von HEV mittels Elektronenmikroskopie.

Quelle: CDC (2021)

### 2.3.1.2. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Den molekularbiologischen Nachweis von HEV-RNA ermöglicht die RT-PCR (van der Poel et al. 2018; Mushahwar 2008), wobei die zunächst aus dem Probenmaterial extrahierte RNA in einem ersten Schritt durch das Enzym reverse Transkriptase (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss (Freeman et al. 1999). In dem sich anschließenden Prozess, der eigentlichen PCR, erfolgt die Amplifikation eines spezifischen Teils des Genoms (Saiki et al. 1988; Mullis et al. 1986). Dabei fokussieren sich die unterschiedlichen RT-PCR-Protokolle speziell für HEV auf Genfragmente aus dem ORF1 (Zhao et al. 2007; Schlauder et al. 1999), dem ORF2 (Enouf et al. 2006; Schlauder et al. 1999) oder aus der sich überlappenden Region von ORF2 und ORF3 (Gerber et al. 2014; Jothikumar et al. 2006). Vergleichsstudien, wie der von Mokhtari et al. (2013) und Inoue et al. (2006) zufolge, hat sich die überlappende Region von ORF2 und ORF3 für die Amplifikation der HEV-RNA unterschiedlicher Stämme als am sichersten erwiesen.

Bei den RT-PCR-Verfahren wird zwischen der konventionellen und der real-time RT-PCR unterschieden (Jothikumar et al. 2006). Im Vergleich zur konventionellen RT-PCR soll die

real-time RT-PCR eine geringere Anfälligkeit für Kontaminationen während der Durchführung und eine höhere Sensitivität bieten (Son et al. 2014; Jothikumar et al. 2006). Somit haben sich über die Zeit eine Vielzahl an real-time RT-PCR-Protokollen für den Nachweis von HEV etabliert, wobei das Protokoll von Jothikumar et al. (2006) zum Nachweis der humanrelevanten Genotypen HEV-1 bis HEV-4 weit verbreitet Anwendung findet (Baylis et al. 2013; Mokhtari et al. 2013).

Der direkte Nachweis von HEV-RNA mithilfe der RT-PCR beim Hausschwein gelang bisher unter anderem aus Probenmatrices wie Leber (Garcia et al. 2019; Feurer et al. 2018), Herzmuskel (Garcia et al. 2019), Niere (Garcia et al. 2019; Bouwknecht et al. 2009), Blutserum (Garcia et al. 2019; Bouwknecht et al. 2009), Galle (Li et al. 2019; Bouwknecht et al. 2009), Sperma (Li et al. 2019), Kot (Garcia et al. 2019; Li et al. 2019; Bouwknecht et al. 2009) sowie Skelettmuskulatur, Lymphknoten, Milz und Urin (Bouwknecht et al. 2009). Zudem existieren Studien wie die von Pallerla et al. (2020), Althof et al. (2019), Berto et al. (2013a) und Di Bartolo et al. (2012) zu HEV-RNA-Nachweisen mittels RT-PCR in Lebensmittelprodukten vom Schwein.

Eine Aussage hinsichtlich der Infektiosität von HEV ist mithilfe der RT-PCR im Gegensatz zu bestimmten Bakterienarten wie *Campylobacter* (Josefsen et al. 2010) nicht möglich.

### **2.3.1.3. Zellkultur**

Die Isolierung von HEV in einem geeigneten Zellkultursystem wird bereits seit einigen Jahren intensiv untersucht (Okamoto 2011). Insbesondere für die Bewertung der HEV-Infektiosität ist solch ein funktionierendes System Voraussetzung (Cook et al. 2017). Ein effizientes Zellkulturmodell für HEV existiert bis heute jedoch nicht (Fu et al. 2019; Cook et al. 2017).

Nachdem Chandra et al. (2008) in ihrer Literaturübersicht von nur vereinzelten Erfolgen in der Entwicklung einer Zellkultur für die Vermehrung von HEV berichteten, gelang in den vergangenen Jahren unter anderem in den Studien von Capelli et al. (2019), Schemmerer et al. (2019), Wu et al. (2018), Johnne et al. (2014), Berto et al. (2013b) und von Shukla et al. (2011), die Isolierung von HEV der Genotypen HEV-1 bis HEV-4. Dabei wurden neben weiteren die humanen Karzinomzelllinien PLC/PRF/5 (Schemmerer et al. 2019; Berto et al. 2013b; Shukla et al. 2011), A549 (Schemmerer et al. 2019; Johnne et al. 2014; Shukla et al. 2011) sowie HepG2/C3A (Capelli et al. 2019; Schemmerer et al. 2019; Wu et al. 2018; Shukla et al. 2011) eingesetzt. In den zuvor genannten Studien erfolgte die HEV-Isolierung überwiegend aus Probenmaterial wie Serum (Johnne et al. 2014) und Faeces (Capelli et al.

2019; Schemmerer et al. 2019; Shukla et al. 2011) von HEV-Patienten. In weiteren Studien gelang die erfolgreiche Isolierung von HEV aus Leberwurst (Berto et al. 2013a) und Schweineleber (Takahashi et al. 2012).

Es fehlen jedoch Daten zur Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze, ebenso wie eine standardisierte und validierte Untersuchungsmethode insbesondere für Lebensmittelproben (Cook et al. 2017; EFSA 2017).

### **2.3.2. Indirekter Nachweis von HEV**

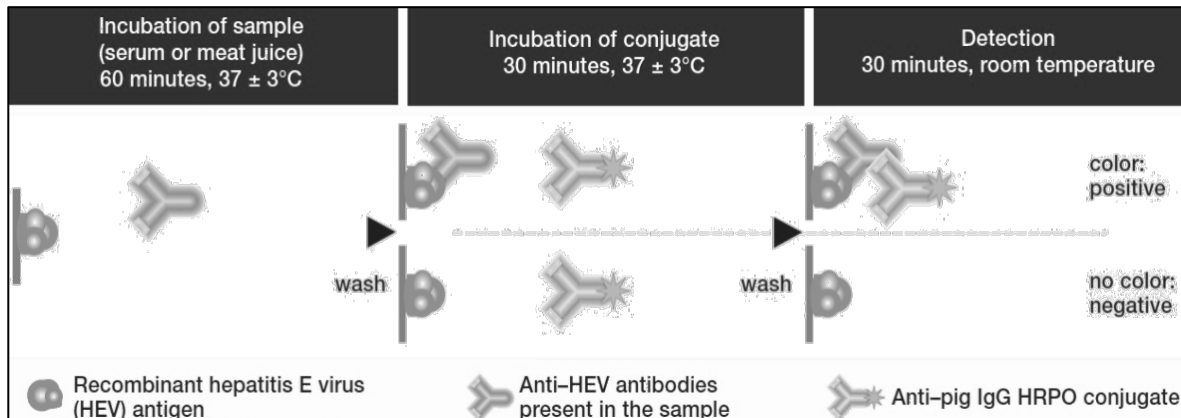
Für den indirekten Nachweis einer HEV-Infektion finden neben weiteren Immunassays überwiegend Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) Anwendung (van der Poel et al. 2018), die den serologischen Nachweis von HEV-Antikörpern der Klasse IgM und IgG ermöglichen (van der Poel et al. 2018; Mushahwar, 2008).

#### **2.3.2.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der 1971 von den Wissenschaftlern Engvall und Perlmann in Schweden entwickelte ELISA beruht auf der Eigenschaft spezifische Antikörper an Antigene zu binden (Engvall und Perlmann 1971).

Bei den für die Entwicklung von HEV-ELISA-Testsystemen zur Nutzung bei Schweinen eingesetzten Antigenen handelt es sich um rekombinant hergestellte ORF-2-beziehungsweise ORF-3-Polypeptide, welche überwiegend auf HEV-Genotyp-1- (Baechlein et al. 2010) und HEV-Genotyp-3-Stämmen (Takova et al. 2021; Ponterio et al. 2014; Dremsek et al. 2013; Rose et al. 2010) beruhen. Mit heutigem Stand der Wissenschaft ist für HEV nur ein Serotyp beschrieben (Guo et al. 2006; Anderson et al. 1999). Aus diesem Grund scheint nach Ma et al. (2009) der für die rekombinanten Antigene verwendete HEV-Genotyp eher irrelevant für den Nachweis von Antikörpern zu sein. In anderen Studien hingegen wird auf Unterschiede in der Sensitivität der Testsysteme, abhängig von den jeweilig verwendeten HEV-Genotypen, hingewiesen (Park et al. 2012; Bendall et al. 2010). Ein sogenannter „Goldstandard“ unter den ELISA-Testsystemen zum Nachweis von HEV-Antikörpern beim Schwein existiert nicht, da die Verfügbarkeit kommerziell erhältlicher ELISA-Kits für die serologische Untersuchung beim Schwein insgesamt gering ist (Rose et al. 2010). Aus diesem Grund sind HEV-ELISA, die für den Nachweis von humanen HEV-Antikörpern entwickelt wurden, für die Verwendung bei Schweinen angepasst worden (Chen et al. 2016; Pezzoni et al. 2014; Hu et al. 2008).

Das Funktionsprinzip des in dieser Arbeit angewandten ELISA-Testsystems *Applied Biosystems™ PrioCHECK™ Porcine HEV Ab* (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ist in Abbildung 4 dargestellt. Dieser ELISA ist für die Untersuchung von HEV-Antikörpern aus Blutserum und Fleischsaft von Schweinen zugelassen (ThermoFisher Scientific Inc., 2018).



**Abbildung 4:** Funktionsprinzip des ELISA-Testsystems

*Applied Biosystems™ PrioCHECK™ Porcine HEV Ab.*

Quelle: ThermoFisher Scientific Inc. (2018)

Die Verwendung von Fleischsaft zum serologischen Nachweis von Antikörpern beim Schwein konnte bereits für Erreger wie zum Beispiel *Salmonella* (Nowak et al. 2007; Nielsen et al. 1998), *Trichinella* (Beck et al. 2005) und *Toxoplasma* (Fehlhaber et al. 2003) validiert werden. Dass Fleischsaft alternativ zu Blutserum auch für die Untersuchung auf HEV-Antikörper beim Schwein genutzt werden kann, bestätigten Vergleichsstudien von Wacheck et al. (2012) und Casas et al. (2011b) bereits vor zehn Jahren.

Fleischsaft besteht aus intrazellulärer Flüssigkeit, Serum und Lymphe und wird durch den einmaligen Prozess des Tiefgefrierens und des anschließenden Auftauens von Muskulatur gewonnen (Nielsen et al. 1998). Zur Gewinnung von Fleischsaft hat sich nach Nobmann et al. (2011) im Vergleich zu Nacken- und Bauchmuskulatur die Nutzung von Zwerchfellpeilermuskulatur aufgrund einer höheren Antikörperkonzentration im Vergleich zu den anderen genannten Muskelpartien als geeignet erwiesen. Allerdings beschreiben Nielsen et al. (1998) Fleischsaft als Verdünnung des Blutserums, was auch in weiteren Studien durch eine deutlich niedrigere Antikörperkonzentration in Fleischsaft verglichen mit Serum beobachtet werden konnte (Meemken und Blaha 2011; Molina et al. 2008). Aus diesem Grund ist bei der Nutzung von Fleischsaft als Untersuchungsmedium eine höhere

Konzentration, sprich eine geringere Verdünnung, zu verwenden als bei der Nutzung von Blutserum (Meemken und Blaha 2011; Molina et al. 2008; Nielsen et al. 1998).

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte ELISA-Testsystem *Applied Biosystems*<sup>™</sup> *PrioCHECK*<sup>™</sup> *Porcine HEV Ab* (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) sieht daher für Serumproben eine Verdünnung von 1:100 und für Fleischsaftproben eine Verdünnung von 1:10 vor (ThermoFisher Scientific Inc. 2018).



### 3. PUBLIKATION I

#### **High Predictive Power of Meat Juice Serology on the Presence of Hepatitis E Virus in Slaughter Pigs**

Authors: Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und Diana Meemken

Journal: Journal of Foodborne Pathogens and Disease 17 (11): 687-692

IF: 3.171

published: 06 November 2020

DOI: 10.1089/fpd.2020.2797

**Diese Veröffentlichung müssen Sie online erwerben.**

<https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2797>

#### **Persönlicher Beitrag zur Umsetzung der Studie:**

- Studienplanung
  - Beitrag zum Entwurf des Studiendesigns
- Probenahme
  - Organisation der Probenahmetermine
  - Vorbereitung der Probenahme
  - Entnahme der Proben am Schlachthof
- Labor
  - Durchführung der serologischen Untersuchungen
  - Durchführung der RNA-Extraktionen
  - Durchführung und Anleitung zu den molekularbiologischen Untersuchungen
  - Dokumentation aller Daten
- Auswertung
  - Ausführung der statistischen Berechnungen nach Vorgabe des Modells
- Anfertigen des Manuskripts
  - Verfassung der Erstversion
  - Umsetzung der Autorenbeiträge für die finale Version

#### 4. PUBLIKATION II

**Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir**

Authors: Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und Diana Meemken

Journal: Journal of Consumer Protection and Food Safety 17: 33-39

IF: 1.177

published: 03 December 2021

DOI: 10.1007/s00003-021-01357-7

#### **Persönlicher Beitrag zur Umsetzung der Studie:**

- Studienplanung
  - Beitrag zum Entwurf des Studiendesigns
- Probenahme
  - Organisation der Probenahmetermine
  - Vorbereitung der Probenahme
  - Entnahme der Proben am Schlachthof
- Labor
  - Durchführung der RNA-Extraktionen
  - Durchführung und Anleitung zu den molekularbiologischen Untersuchungen
  - Dokumentation aller Daten
- Auswertung
  - Ausführung der statistischen Berechnungen nach Vorgabe des Modells
- Anfertigen des Manuskripts
  - Verfassung der Erstversion
  - Umsetzung der Autorenbeiträge für die finale Version

## RESEARCH ARTICLE



# Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir

Janine Dzierzon<sup>1</sup> · Verena Oswaldi<sup>1</sup> · Roswitha Merle<sup>2</sup> · Nina Langkabel<sup>1</sup> · Diana Meemken<sup>1</sup>Received: 9 July 2021 / Revised: 8 November 2021 / Accepted: 16 November 2021  
© The Author(s) 2021

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is a foodborne zoonotic pathogen and known as the causative agent of hepatitis E in humans. The specific role of porcine liver as a vehicle for human HEV infections has been highlighted in different studies. Nevertheless, gaps of knowledge still exist regarding possible HEV cross-contamination both at consumer and production level. Furthermore, people working in the food production industry, e.g. veterinarians and abattoir employees, are exposed to an increased risk of HEV infection. The aim of the present study was to investigate HEV cross-contamination on the surface of porcine liver in a German abattoir. The sample set included 250 samples of porcine liver parenchyma and the corresponding 250 superficial layer samples of the same livers, which were analyzed for the presence of HEV ribonucleic acid (RNA). Afterwards, the initial status of the tested liver parenchyma was compared with the occurrence of HEV RNA in the corresponding superficial layer. HEV RNA was detectable in 34% (85/250) of superficial layer samples, with 58% (49/85) of the samples originated from initially HEV negative livers. To our knowledge, this is the first study that provides an insight in the potential of HEV cross-contamination at abattoir level in Germany. Furthermore, it could be identified that the joint storage of livers in Euro meat containers has a significant impact on the presence of HEV RNA on the surface of porcine liver.

**Keywords** Foodborne pathogens · Porcine liver · Cross contamination · Hepatitis E virus · Pig abattoir · Euro meat container

## 1 Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is known as the causative agent of hepatitis E in humans and is mainly responsible for viral hepatitis worldwide transmitted via the orofecal route (Lapa et al. 2015).

In 2015, there were 21,000 human clinical cases of HEV infections reported in the European Union and the European Economic Area (European Centre for Disease Prevention and Control 2017). In Germany, a dramatic increase from 102 reported clinical cases in 2009 to 3728 in 2019

has been observed in human patients (Robert Koch-Institut 2010, 2021).

As a RNA virus, HEV is classified as *Orthohepevirus A* in the family of *Hepeviridae* (Smith et al. 2014). HEV genotypes 1 to 4 (HEV-1 to HEV-4) can infect humans, with HEV-3 and HEV-4 common in both humans and animals, especially in domestic pigs and wild boars, but also in other mammals (Meng et al. 1997; Johne et al. 2014; Smith et al. 2014; Pavio et al. 2015). Focusing on domestic pigs, the consumption of raw or undercooked pork liver, respectively liver products has been recognized as a main route of zoonotic transmission (Feagins et al. 2007; Colson et al. 2010; Boxman et al. 2019).

In Europe, the HEV seroprevalence in pigs amounts up to 96% at single animal basis and up to 97% at herd level, highlighting that HEV circulates in European pig populations (Wutz et al. 2013; Burri et al. 2014; Caruso et al. 2017; Feurer et al. 2018; Dzierzon et al. 2020). HEV infection in pigs occurs usually without clinical symptoms, so there is no possibility to detect HEV infected pigs macroscopically

✉ Janine Dzierzon  
janine.dzierzon@fu-berlin.de

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine, Institute of Food Safety and Food Hygiene, Working Group Meat Hygiene, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department of Veterinary Medicine, Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany

during routine ante- and post-mortem inspection at the abattoir (Meng et al. 1997; van der Poel et al. 2001).

HEV RNA detection in different organs and matrices of pigs during slaughter as well as in abattoir's effluents and on different surfaces along the slaughter line indicates that HEV circulates in pigs and in the abattoir's environment (Fenau et al. 2018; Feurer et al. 2018; Garcia et al. 2019; Milojević et al. 2019; Dzierzon et al. 2020). It is considered that temperature is the most effective option for inactivation of HEV in food and in the environment (EFSA 2017). However, a time–temperature combination for a safe HEV inactivation could not be determined so far, even though virus inactivity appears to decrease rapidly with temperatures above 65 °C (Schielke et al. 2011; Johne et al. 2016).

Various foods of animal origin have been identified as a source for HEV worldwide (Ferri and Vergara 2021). Focusing on pork, the consumption of products made from raw pork liver is very common in different European countries, where analyses of raw pork products yielded positive results for HEV RNA underlining the specific role of raw pork liver as a vehicle for potential HEV infections in humans (Colson et al. 2010; Pavio et al. 2014; Kubacki et al. 2017; Giannini et al. 2018).

The objective of the present study was to investigate HEV cross-contamination on the surface of porcine liver in a German abattoir. Therefore, the surface of porcine liver was analyzed for HEV RNA after joint storage of livers with different initial HEV status in Euro meat containers.

Additionally, data from our previous publication (Dzierzon et al. 2020) were used to evaluate whether a higher concentration of antibodies in meat juice is associated with the occurrence of HEV RNA in the liver of slaughter pigs.

## 2 Materials and methods

Liver samples were collected from 250 slaughter pigs at an abattoir in North-West Germany between August and December 2018. Pigs originated from 25 German conventional fattening farms, of which ten slaughter pigs were randomly selected at the abattoir. The HEV seroprevalence and the prevalence of HEV-RNA in the liver of those pigs was previously determined and published (Dzierzon et al. 2020). Therefore, the HEV detection rate of 250 livers was available and considered as the initial HEV status of each liver for the present study.

### 2.1 Sample collection and processing

The sampling procedure along the slaughter line has been described previously (Dzierzon et al. 2020). In addition, each carcass and liver was numbered before sampling, in order to assign each sample to the pig of origin. For that,



**Fig. 1** After tagging every slaughter pig individually with a number (1–10) (1), corresponding livers were labeled using a sterile ear tag (2) and were stored in Euro meat containers (3)

each carcass was tagged with a consecutive number by using a meat marking pencil (Faber-Castell, Stein, Germany). The liver of a numbered pig was collected after the official meat inspection and labeled with a sterile ear tag carrying the corresponding number of the pig carcass (Fig. 1). All 250 collected livers were temporarily stored in a total of 50 standard Euro meat containers, according to the abattoir's procedures for storing livers until further processing or marketing (Fig. 1). In every meat container, ten livers were put together from the same herd but only the five livers numbered were finally selected for sampling.

Samples of liver parenchyma had been excised aseptically and contamination-free as described in Dzierzon et al. (2020). The corresponding superficial layer samples were collected from the *margo acutus hepatis* of each liver by using sterile forceps and Cutfix® single-use scalpels (B. Braun, Melsungen, Germany).

Each sample was stored separately in a sterile Whirl-Pak® plastic bag (Nasco Sampling/Whirl-Pak®, Madison, WI, USA). Afterwards, samples were transported at – 2 °C to the laboratory and were stored at – 80 °C until laboratory examination.

Analysis of the superficial layer samples of porcine livers was focused on the serous membrane and the Glisson's capsule in order to investigate HEV cross-contamination.

### 2.2 Molecular investigation

Superficial layer samples were analyzed at the same time using the same laboratory methods and real-time RT-PCR protocol as described previously for the liver parenchyma samples (Dzierzon et al. 2020), ensuring comparability of the results. As previously published, the HEV prevalence

in liver parenchyma has been analyzed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Dzierzon et al. 2020).

Laboratory methods used for both types of liver samples are described again in the following.

To prepare both types of liver samples for RNA extraction, the tissues were thawed before taking 30 mg of each sample aseptically for disruption and homogenization. Sterile steel beads of 5 mm in diameter (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) were used for disruption of the tissue, diluted in 600 µl of lysis buffer with beta-mercaptoethanol (β-ME) in a 2 ml SafeLock tube (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany). The disruption of sample material was performed by the Tissue-Lyser (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) followed by homogenization via centrifugation. Viral RNA was extracted from 600 µl of the supernatant by use of the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) on the QIAcube (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions *RNeasy Mini, Animal tissues and cells, Large samples* (QIAGEN<sup>®</sup> 2010). For quality control of the RNA extraction step, one tube of lysis buffer with β-ME was included in each cycle as a negative extraction control.

Bacteriophage MS2 ( $5 \times 10^7$  PFU/ml) was used as an internal process control virus monitoring the presence of possible inhibitory substances causing false negative results during the RNA extraction and molecular detection step. With exception to the negative extraction control, bacteriophage MS2 was added to each sample after homogenization and before starting the extraction step.

A one-step real-time RT-PCR assay was performed according to Jothikumar et al. (2006) using the QuantiTect<sup>™</sup>Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). A tenfold-dilution of porcine HEV RNA, genotype 3, was used as the positive control and RNase free water was used as the negative control. Both controls were included in each real-time RT-PCR run. A separate real-time RT-PCR, as conducted previously by Althof et al. (2019), was performed to detect bacteriophage MS2 RNA by using different primers and probe according to Dreier et al. (2005).

### 2.3 Statistical analysis

The obtained data were recorded in Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2016 together with previously acquired ELISA test results and PCR results for liver parenchyma from the same pigs (Dzierzon et al. 2020). All statistical calculations were performed using the software IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics, version 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistical analysis was carried out to determine the percentages and associated 95% confidence intervals (95% CI).

HEV cross-contamination was analyzed by comparing the initial infectious status of the tested liver parenchyma (Dzierzon et al. 2020) with the occurrence of HEV RNA on

the surface of the same liver. After combining PCR results of liver parenchyma (Dzierzon et al. 2020) and PCR results of corresponding superficial layer samples in a 2 × 2 contingency table, the Cohen's kappa (κ) value was calculated to assess the reliability.

A mixed effects logistic regression model was used to investigate the potential of joint storage of livers in Euro meat containers for HEV cross-contamination. The infectious status of the liver surface was the dependent variable, the infectious status of the liver parenchyma was the fixed factor and the Euro meat container was used as the random factor. Additionally, the odds ratio (OR) and its 95% CI were estimated with a *p*-value of < 0.05 considered to be statistically significant, quantifying the strength of the association between the occurrence of HEV RNA in porcine liver and the occurrence of HEV RNA on the corresponding surface.

In addition, the previously determined ELISA and PCR results (Dzierzon et al. 2020) were included in a binary logistic regression model to evaluate the association between ELISA OD (optical density) values and the presence of HEV RNA in the liver of slaughter pigs. OR and its 95% CI were calculated with a *p*-value of < 0.05 considered to be statistically significant.

## 3 Results

HEV RNA was detected in 34.0% (85/250; 95% CI 28.1–39.9%) of the 250 examined superficial porcine liver samples. The distribution of those HEV positive samples varied regarding the serological status and the presence of HEV RNA in the corresponding liver parenchyma sample (Table 1). Out of the HEV positive superficial liver samples, 57.6% (49/85; 95% CI 47.1–68.1%) originating from livers

**Table 1** Distribution of HEV ELISA<sup>a</sup> and real-time RT-PCR results

No. of pigs (%)	HEV ELISA <sup>b</sup> Meat juice <sup>a</sup>	HEV RT-PCR <sup>c</sup>	
		Liver parenchyma <sup>a</sup>	Superficial layer
<b>86</b> (34.4%)	–	–	–
<b>72</b> (28.8%)	+	–	–
<b>36</b> (14.4%)	+	+	+
<b>40</b> (16.0%)	+	–	+
<b>9</b> (3.6%)	–	–	+
<b>7</b> (2.8%)	+	+	–
Total no. of positive samples	<b>155</b> (62.0%) <sup>a</sup>	<b>43</b> (17.2%) <sup>a</sup>	<b>85</b> (34.0%)

<sup>a</sup>Dzierzon et al. (2020)

<sup>b</sup>Detection of HEV antibodies

<sup>c</sup>Detection of HEV RNA

initially evaluated as HEV negative, of which 18.4% (9/49; 95% CI 7.5–29.2%) originated from HEV seronegative pigs.

As previously described, 43 of 250 porcine livers were identified as HEV positive, resulting in a prevalence of 17.2% (95% CI 12.5–21.9%) (Dzierzon et al. 2020). The present study shows the molecular analysis of HEV RNA in the corresponding superficial layer samples in 83.7% (36/43; 95% CI 72.7–94.8%). With a  $\kappa$ -value of 0.43 ( $p < 0.05$ ), the results reveal a moderate concordance for HEV positive porcine liver combined with HEV positive liver surface.

The detection rate of HEV RNA on the surface of initially HEV negative porcine livers was 23.8% (49/207; 95% CI 17.9–29.5%). Initially, HEV negative livers derived from each of the 25 pig herds tested. In eleven herds, none of

the involved slaughter pigs had detectable HEV RNA in the liver, representing a prevalence of 0.0% (0/10, 95% CI 0.0–3.8%) (Dzierzon et al. 2020). In 45.5% (5/11; 95% CI 16.0–74.9%) of those HEV negative herds, HEV RNA was detected on the surface of at least one liver. Related to Euro meat containers, 18.0% (9/50; 95% CI 7.4–28.7%) included five initially HEV negative livers but with at least one HEV positive liver surface (Table 2).

Altogether, 79.6% (39/49; 95% CI 68.3–90.9%) of initially HEV negative livers with detectable HEV RNA on the surface originated from ten HEV positive pig herds (40.0%; 10/25; 95% CI 20.8–59.2%) with a HEV prevalence in the livers ranging from 10.0% (1/10, 95% CI 0.0–28.6%) to 70.0% (7/10, 95% CI 41.6–98.4%). All livers had been stored until sampling in 17 Euro meat containers in total (34.0%; 17/50; 95% CI 20.9–47.1%) containing at least one initially HEV positive liver (Table 2).

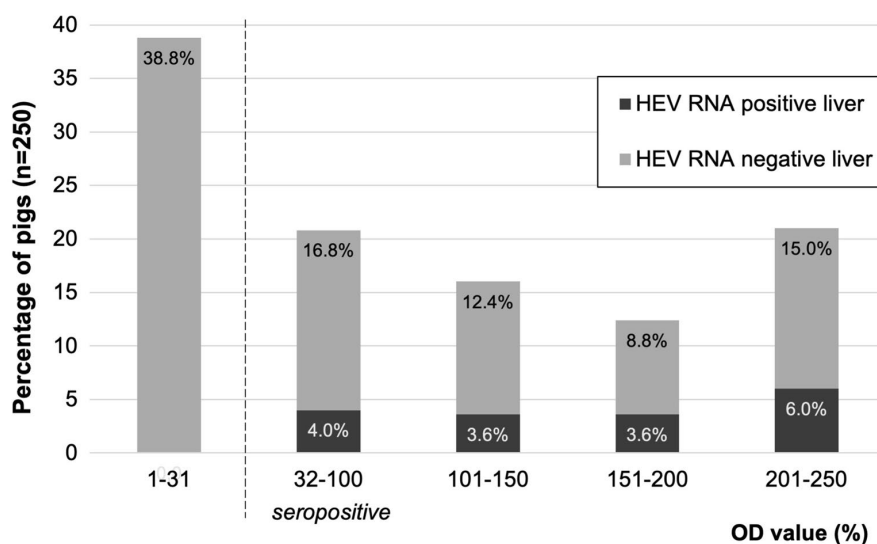
Mixed logistic regression analysis showed a large association between the occurrence of HEV RNA on liver surfaces and in the liver parenchyma (OR of 11.269; 95% CI 4.024–31.562;  $p < 0.001$ ). Additionally, 64% of the variance was due to variance between the Euro meat containers. In addition, Fig. 2 shows the distribution of HEV negative and positive porcine livers and the corresponding OD values of HEV ELISA of the sampled pigs (Dzierzon et al. 2020).

The percentage of HEV positive livers was higher with high ELISA OD values. The estimated OR of 1.016 (95% CI 1.011–1.021) demonstrated that the probability of detecting HEV RNA in porcine liver increased significantly with an increasing OD value by just one unit ( $p < 0.001$ ).

**Table 2** Distribution of porcine livers among Euro meat containers related to HEV status

Euro meat containers (n=50) No. (%)	HEV status of livers (n=5) in Euro meat containers	
	No. of initially HEV RNA positive livers	No. of HEV RNA positive liver surfaces
19 (38.0)	0	0
17 (34.0)	≥ 1	≥ 2
9 (18.0)	0	≥ 1
4 (8.0)	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
1 (2.0)	1	0

<sup>a</sup>Identical liver



**Fig. 2** Distribution of HEV RNA negative and positive porcine livers and the corresponding OD values, measured by HEV ELISA, of the sampled pigs

## 4 Discussion

To our knowledge, this is the first study analyzing the possible occurrence of HEV cross-contamination at the surface of porcine liver in a German abattoir. Remarkably, this study shows that storing several porcine livers in one Euro meat container at the abattoir can result in a HEV positive liver surface, even when the endogenous HEV status of the liver is negative.

The fact that an initially HEV negative liver had detectable HEV RNA on the surface at the time after storing in a Euro meat container implies that HEV had been transferred to the liver surface during the slaughter and joint storing process. In this context, it must be considered that the entire sampling was performed on days of slaughter with up to 5500 slaughtered pigs per day, when HEV negative and HEV positive herds were slaughtered.

Moreover, 79.6% of initially HEV negative livers with detectable HEV RNA on the surface originated from HEV positive pig herds with a prevalence ranging from 10 to 70%. All livers had been stored until sampling in Euro meat containers with at least one initially HEV positive liver. Mixed logistic regression analysis revealed that the percentage of positive liver surfaces differed largely between the containers, even when the HEV status of liver parenchyma was taken into account. This supports our assumption of cross-contamination during joint storage of HEV positive and negative porcine livers in Euro meat containers.

Bouwknegt et al. (2009) suggested blood of viraemic pigs to be the most likely source of HEV cross-contamination. In our opinion, porcine blood (Boxman et al. 2017), respectively porcine livers comprising blood may possibly contribute to the dissemination of HEV in the food chain.

In this study, the detection of HEV RNA on the surface of initially HEV positive porcine livers (42.4%) and the strong association between HEV positive livers and the occurrence of HEV RNA on liver surface is not surprising, if one considers blood of porcine livers as a source of HEV cross-contamination. Therefore, HEV infected slaughter pigs, harboring HEV RNA in the liver, seem to have a major role in the transmission and cross-contamination of HEV in the abattoir and finally to pig carcasses and organs.

Conversely, seronegative pigs could be a neglected risk regarding foodborne infections in humans (Dzierzon et al. 2020) and cross-contamination in the pork production chain. Therefore, in order to reduce HEV cross-contamination during slaughter and consequently human cases, we recommend logistic slaughter as an intervention measure at slaughter level with an early and separate slaughter of serologically HEV negative herds.

As proven in our previous study (Dzierzon et al. 2020), serological tests for the detection of HEV antibodies in pigs shortly before slaughter have a reliable predictive power on the occurrence of HEV RNA in pork liver, and therefore can be used to create herd profiles regarding HEV risk assessment. Through statistical analysis, the present study demonstrates that an increasing ELISA OD value significantly leads to an increased risk of detecting HEV RNA in the corresponding porcine liver and hence to an increased risk of transferring HEV to humans.

The infectivity of HEV could not be evaluated in the present as well as in other studies due to the fact that simple laboratory methods are lacking and that infection trials with cell cultures are highly sophisticated methods (Cook et al. 2017). Therefore, the survival period of HEV in the slaughter environment, in porcine blood as well as in porcine liver tissue, post-evisceration, is currently unknown. A few studies indicate that HEV shows a high stability to environmental conditions and room temperatures (Schielke et al. 2011; Johne et al. 2016; Baez et al. 2017).

The major potential limitation of this study is the examination of HEV cross-contamination on the liver surface by using superficial layer samples. The reason for choosing surface tissue instead of surface swabs was the goal to achieve optimal comparability of the results with the liver parenchyma (Dzierzon et al. 2020), by using comparable samples and laboratory methods. However, the question arises whether material from the liver parenchyma was accidentally included in the examination of the corresponding surface, thus falsifying the results. However, an initially HEV negative liver with detectable HEV RNA on the surface indicates a HEV cross-contamination. Furthermore, porcine livers, initially evaluated as HEV RNA positive but with no detectable HEV RNA on the corresponding surface (16.3%) also reinforce the method of sample collection and the quality of the present data.

The detected HEV isolates have not been further characterized, as they are intended to provide a scientific basis to further investigations of the potential HEV cross-contamination. Further studies are urgently needed to develop and analyze intervention measures in the field of slaughter hygiene to protect e.g. professional groups such as veterinarians and abattoir employees who are exposed to an increased risk of HEV infection (Hoan et al. 2019; Huang et al. 2019). Additionally, consumer education regarding food safety and good kitchen hygiene practices needs to be pursued and highly prioritized. If HEV RNA is present on the liver surface due to (cross-) contamination, HEV can be transferred to raw edible food during preparation.

## 5 Conclusion

The present study demonstrates that HEV cross-contamination in an industrial German abattoir can be associated with joint storage of porcine livers in one Euro meat container. This storing practice is common in German abattoirs until further processing or marketing of livers. Therefore, both workers in the food production industry and consumers should be aware of the potential hazard of an HEV infection by HEV positive livers as well as by HEV negative livers superficially contaminated with HEV. More intervention programs and food safety education focused on the risk of HEV cross-contamination in abattoirs, processing plants and consumers' kitchens are needed to prevent HEV infections in humans. In addition, logistic slaughter as well as raw product steering based on serological HEV herd profiles could represent essential intervention measures to reduce the food-borne infection caused by HEV.

**Acknowledgements** We thank Prof. Dr. R. Johne, Dr. E. Trojnar and Dr. N. Althof (German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany) for kindly providing the HEV positive control and the bacteriophage MS2. Furthermore, we wish to thank Dr. D. Lüscho (Institute of Poultry Diseases, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany) for using the QIAcube and the abattoir for the participation in this study.

**Author contributions** DM conceived the first study conception. All authors contributed to the final study conception and design. JD and VO performed the material preparation and data collection. Laboratory analyses were carried out by JD. Furthermore, JD prepared the first draft of the manuscript. All authors commented on previous versions of the manuscript and approved the final manuscript.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Althof N, Trojnar E, Böhm T, Burkhardt S, Carl A et al (2019) Interlaboratory validation of a method for hepatitis E virus RNA detection in meat and meat products. *Food Environ Virol* 11:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9360-6>
- Baez PA, Lopez MC, Duque-Jaramillo A, Pelaez D, Molina F et al (2017) First evidence of the hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PLoS ONE* 12:e0177525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177525>
- Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K et al (2009) The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5:7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-7>
- Boxman ILA, Jansen CCC, Hägele G, Zwartkruis-Nahuis A, Cremer J et al (2017) Porcine blood used as ingredient in meat productions may serve as a vehicle for hepatitis E virus transmission. *Int J Food Microbiol* 257:225–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.029>
- Boxman ILA, Jansen CCC, Hägele G, Zwartkruis-Nahuis A, Tijmsma ASL et al (2019) Monitoring of pork liver and meat products on the Dutch market for the presence of HEV RNA. *Int J Food Microbiol* 296:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.018>
- Burri C, Vial F, Ryser-Degiorgis MP, Schwermer H, Darling K et al (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic pigs and wild boars in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 61:537–544. <https://doi.org/10.1111/zph.12103>
- Caruso C, Peletto S, Rosamilia A, Modesto P, Chiavacci L et al (2017) Hepatitis E virus: a cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high-density pig farming area. *Transbound Emerg Dis* 64:1443–1453. <https://doi.org/10.1111/tbed.12533>
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V et al (2010) Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202:825–834. <https://doi.org/10.1086/655898>
- Cook N, D'Agostino M, Johne R (2017) Potential approaches to assess the infectivity of hepatitis E virus in pork products: a review. *Food Environ Virol* 9:243–255. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9303-7>
- Dreier J, Stormer M, Kleesiek K (2005) Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol* 43:4551–4557. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4551-4557.2005>
- Dzierzon J, Oswaldi V, Merle R, Langkabel N, Meemken D (2020) High predictive power of meat juice serology on the presence of hepatitis E virus in slaughter pigs. *Foodborne Pathog Dis* 17:687–692. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2797>
- EFSA, European Food Safety Authority (2017) Panel on biological hazards. Scientific opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA J* 15:89. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4886>
- European Centre for Disease Prevention and Control (2017) Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HEV\\_Surveillance-report-2005-2015.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HEV_Surveillance-report-2005-2015.pdf). Accessed 13 May 2020
- Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ (2007) Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88:912–917. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82613-0>
- Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Gentilhomme A et al (2018) Molecular features of hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. *J Clin Virol* 103:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.003>



- Ferri G, Vergara A (2021) Hepatitis E virus in the food of animal origin: a review. *Foodborne Pathog Dis* 18:368–377. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2896>
- Feurer C, Le Roux A, Rossel R, Barnaud E, Dumarest M et al (2018) High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 264:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.013>
- Garcia N, Hernandez M, Gutierrez-Boada M, Valero A, Navarro A et al (2019) Occurrence of hepatitis E virus in pigs and pork cuts and organs at the time of slaughter, Spain, 2017. *Front Microbiol* 10:2990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02990>
- Giannini P, Jermini M, Leggeri L, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R (2018) Detection of hepatitis E virus RNA in raw cured sausages and raw cured sausages containing pig liver at retail stores in Switzerland. *J Food Prot* 81:43–45. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-17-270>
- Hoan NX, Huy PX, Sy BT, Meyer CG, Son TV et al (2019) High hepatitis E virus (HEV) positivity among domestic pigs and risk of HEV infection of individuals occupationally exposed to pigs and pork meat in Hanoi, Vietnam. *Open Forum Infect Dis* 6:306. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz306>
- Huang X, Huang Y, Wagner AL, Chen X, Lu Y (2019) Hepatitis E virus infection in swine workers: a meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 66:155–163. <https://doi.org/10.1111/zph.12548>
- Johne R, Dremsek P, Reetz J, Heckel G, Hess M et al (2014) Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol* 27:212–229. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.06.024>
- Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J (2016) Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method. *Appl Environ Microbiol* 82:4225–4231. <https://doi.org/10.1128/aem.00951-16>
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR (2006) A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>
- Kubacki J, Fraefel C, Jermini M, Giannini P, Martinetti G et al (2017) Complete genome sequences of two Swiss hepatitis E virus isolates from human stool and raw pork sausage. *Genome Announc*. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00888-17>
- Lapa D, Capobianchi MR, Garbuglia AR (2015) Epidemiology of hepatitis E virus in European countries. *Int J Mol Sci* 16:25711–25743. <https://doi.org/10.3390/ijms161025711>
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM et al (1997) A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9860–9865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9860>
- Milojević L, Velebit B, Teodorović V, Kirbiš A, Petrović T et al (2019) Screening and molecular characterization of hepatitis E virus in slaughter pigs in Serbia. *Food Environ Virol* 11:410–419. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09393-1>
- Pavio N, Meng XJ, Doceul V (2015) Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* 10:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.006>
- Pavio N, Merbah T, Thébault A (2014) Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis* 20:1925–1927. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140891>
- QIAGEN® (2010) QIAcube protocol RNeasy@Mini-Animal tissues and cells—large samples. <https://www.qiagen.com/us/qiacube/standard/protocolview.aspx?StandardProtocolID=854>. Accessed 15 Aug 2019
- Robert Koch-Institut (2010) *Epidemiologisches bulletin* 01/2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/01\\_10.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/01_10.pdf?__blob=publicationFile). Accessed 13 May 2020
- Robert Koch-Institut (2021) *Epidemiologisches bulletin* 01/2021. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2021/Ausgaben/01\\_21.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2021/Ausgaben/01_21.pdf?__blob=publicationFile). Accessed 9 July 2021
- Schielke A, Filter M, Appel B, Johne R (2011) Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J* 8:487. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-8-487>
- Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ et al (2014) Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 95:2223–2232. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>
- van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A et al (2001) Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7:970–976. <https://doi.org/10.3201/eid0706.010608>
- Wutz K, Meyer VK, Wacheck S, Krol P, Gareis M et al (2013) New route for fast detection of antibodies against zoonotic pathogens in sera of slaughtered pigs by means of flow-through chemiluminescence immunochips. *Anal Chem* 85:5279–5285. <https://doi.org/10.1021/ac400781t>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 5. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

Neben bakteriellen Erregern können auch Viren die Ursache lebensmittelbedingter Erkrankungen, im Englischen *foodborne diseases*, beim Menschen darstellen (WHO 2015b). In diesem Zusammenhang konnten Lebensmittel tierischen Ursprungs in Verbindung mit sporadischen und chronischen Erkrankungen (Heredia und García 2018) sowie mit zahlreichen lebensmittelbedingten Ausbrüchen gebracht werden (EFSA und ECDC 2016).

Für HEV gilt insbesondere der Verzehr von roher oder unzureichend gegarter Schweineleber (Pallerla et al. 2020; Boxman et al. 2019; Feagins et al. 2007) beziehungsweise Produkten daraus (Boxman et al. 2019; Colson et al. 2010) als Quelle einer lebensmittelbedingten Hepatitis E beim Menschen. Das RKI dokumentierte über die letzten zehn Jahre einen Anstieg der nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (§ 7 IfSG) in Deutschland gemeldeten Hepatitis-E-Fälle beim Menschen von 221 auf 3.246 Fälle (RKI 2021, 2011).

Die aufgeführten Hintergründe waren Anlass im Rahmen dieser Promotion das Vorkommen von HEV in Mastschweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung direkt und indirekt zu untersuchen sowie erste Erkenntnisse über eine potenzielle HEV-Kreuzkontamination ausgehend von Schweinelebern im Schlachthof zu gewinnen. Die gewonnenen Daten sollen als wissenschaftliche Basis für die Entwicklung von Präventions- und Interventionskonzepten sowohl auf Bestandesebene als auch im Bereich der Schlachthygiene dienen.

### 5.1. Diskussion des Studiendesigns

Für die vorliegende Arbeit wurden erstmalig in Deutschland insgesamt vier Probenmatrizes zur Untersuchung auf HEV von ein und demselben Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung entnommen. Das Probenmaterial umfasste Zwerchfellpfeiler, Schinkenmuskulatur, Leberparenchym sowie Gewebe der Leberoberfläche.

Im europaweiten Vergleich existiert in der Literatur bis dato eine weitere Studie aus Frankreich (Feurer et al. 2018), die für die Untersuchung von HEV beim Schwein am Schlachthof ebenfalls ein Proben-triplet vom identischen Tier herangezogen hat, wobei es sich um Serum, Leber und Muskulatur handelte.

Die in der vorliegenden Studie involvierten Mastschweine wurden vor der Eviszeration von einem Schlachthofmitarbeiter zufällig aus insgesamt 25 Herden selektiert, wobei jeweils zehn Schweine aus einer Herde für die Beprobung ausgewählt wurden. Die fortlaufende Nummerierung der Schweinekarkassen unter Verwendung eines Fleischzeichenstifts (Faber-Castell, Stein, Deutschland) vor der Eviszeration mit Ziffern von eins bis zehn ermöglichte die exakte Identifizierung der zu beprobenden Schweine je Herde im Zuge der amtlichen Fleischuntersuchung. Mittels dieser Technik gelang es, die jeweils am Veterinärpodest entnommene Leber mithilfe einer entsprechend nummerierten sterilen Ohrmarke dem jeweiligen Schwein zugehörig zu markieren. Ebenso konnten auch die Zugehörigkeiten der entnommenen Zwerchfellpfeiler- und der Muskelproben sichergestellt werden.

Bei einer Tagesschlachtzahl von bis zu 5.500 Schweinen und einer dementsprechend hohen Bandgeschwindigkeit war jedoch der Arbeitsaufwand während der fünf Probenahmetage im Schlachthof nicht unerheblich.

Für die Beprobung der Mastschweine wurde ein Schlachthof in der Region Nordwestdeutschland gewählt, die durch eine im deutschlandweiten Vergleich insgesamt hohe Dichte an Schweinen und einer intensiven Schweineproduktion geprägt ist (Merle et al. 2012).

Neben Schweineleber wurde im Rahmen dieser Studie Schinkenmuskulatur zur Untersuchung auf HEV-RNA gewählt. Schweineschinken wird europaweit unter anderem als Rohprodukt vermarktet und konsumiert (Deutscher Fleischer-Verband 2021; Bundesamt für Statistik (Schweiz) 2020) und erschien somit zur Einschätzung des Risikos für eine lebensmittelbedingte HEV-Infektion beim Menschen geeigneter als die in anderen Studien untersuchte Lingual- (Di Bartolo et al. 2012) beziehungsweise Abdominalmuskulatur (Berto et al. 2012) vom Schwein.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit Fleischsaft vom Schwein zur Detektion von HEV-Antikörpern genutzt, da dieser Vergleichsstudien entsprechend als Alternative zu Blutserum in der HEV-ELISA-Technologie Verwendung finden kann (Wacheck et al. 2012; Casas et al. 2011b). Ferner wird auf nationaler Ebene beim Schwein zur Gewinnung von Fleischsaft bereits standardmäßig im Zuge der Schlachtung die Entnahme einer Probe der Zwerchfellpfeilmuskulatur durchgeführt, um die Vorschriften hinsichtlich des Salmonellenmonitorings der Firma QS Qualität und Sicherheit GmbH (QS) zu erfüllen (QS 2021). Aus diesem Grund würde eine Untersuchung auf HEV-Antikörper, prospektiv betrachtet, keinen zusätzlichen Arbeitsaufwand im Schlachthof bedeuten. Im Gegensatz zur Blutprobe, die häufig vom Stichblut im Anschluss an das Entbluten vom nicht gebrühten und nur mit oft schlecht lesbarem Tattoo gekennzeichneten Schlachtier entnommen wird, ist die

Zuordnung einer Probe zum Herkunftsbetrieb zum Zeitpunkt der Zwerchfellpfeilerentnahme durch die fortlaufende Tagesschlachtnummer am gebrühten Tierkörper besser möglich (Meemken et al. 2014).

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1. HEV-Prävalenzen**

Bei der Untersuchung von Fleischsaft auf HEV-Antikörper von 250 Mastschweinen in der vorliegenden Studie konnte eine HEV-Seroprävalenz von 62 % (155/250) auf Einzeltierebene bestimmt werden. Vergleichbare HEV-Seroprävalenzen existieren bei Mastschweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung auf Europaebene in Frankreich (Feurer et al. 2018), in Schottland (Crossan et al. 2015) und in der Schweiz (Burri et al. 2014), wobei in diesen Studien Blutserum als Probenmatrix verwendet wurde.

Auf Herdenebene wurde in der vorliegenden Arbeit eine HEV-Seroprävalenz von 72 % (18/25) ermittelt, wobei eine Herde als HEV-positiv eingestuft wurde, sofern bei mindestens einem von zehn Schweinen in einer Herde der Nachweis von HEV-Antikörpern möglich war. Dabei waren in 88 % (12/18) der HEV-seropositiven Herden alle zehn untersuchten Schweine der Herde seropositiv. Eine mögliche Erklärung dafür findet sich in der Studie von Bouwknecht et al. (2008), wonach HEV eine scheinbar hohe Infektiosität innerhalb einer Herde besitzt, da ein HEV-positives Schwein durchschnittlich neun weitere Schweine im selben Stall mit HEV infizieren kann.

Bei der molekularbiologischen Analyse der Schinkenmuskulatur der 250 involvierten Schweine konnten in keiner Probe spezifische Genomfragmente von HEV nachgewiesen werden (0 %). Äquivalente Ergebnisse konnten von Feuerer et al. (2018) in Frankreich erzielt werden, die ebenfalls Schinkenmuskulatur von Mastschweinen ohne Nachweis von HEV-RNA untersuchten. In einer weiteren ebenfalls in Frankreich durchgeführten Studie waren hingegen 60 % (12/20) der untersuchten Proben Schinkenmuskulatur HEV-positiv (Salines et al. 2019). Allerdings waren die Schweine in der genannten Studie von Salines et al. (2019) unter experimentellen Bedingungen mit HEV und gleichzeitig mit dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) infiziert worden, was die Autoren als mögliche Erklärung für das frequente Vorkommen von HEV-RNA in der Muskulatur aufführen.

Insgesamt sind Studien zum Vorkommen von HEV insbesondere in der Schinkenmuskulatur beim Schwein zum Zeitpunkt der Schlachtung selten. Die Wissenschaftler Berto et al. (2012)

untersuchten Abdominalmuskulatur (0 % HEV-RNA-Nachweis) und Di Bartolo et al. (2012) Lingualmuskulatur (6 % HEV-RNA-Nachweis) mittels PCR, wobei für den HEV-Nachweis in der Lingualmuskulatur von den Autoren eine HEV-Kreuzkontamination als Ursache vermutet wurde.

Auf Einzelhandelsebene in Europa gelang in Rohwurstwaren vom Schwein ohne Leberanteil bisher kein Nachweis von HEV-RNA (Pallerla et al. 2020; Montone et al. 2019; Giannini et al. 2018; Moor et al. 2018).

Für die Untersuchung der Lebern auf HEV-RNA wurde für die erste Teilstudie (Dzierzon et al. 2020) bei jedem Schwein eine Probe aus der Tiefe des Leberparenchyms entnommen, um ein repräsentatives Ergebnis für den initialen HEV-Status der Leber und somit für den HEV-Infektionsstatus des einzelnen Tieres zu erhalten.

Die PCR-Analyse ergab eine höhere Prävalenz (17 %; 43/250) verglichen mit Prävalenzen in Schlachtschweinen aus Frankreich (3 %) (Feurer et al. 2018), aus Italien (0 %) (Mughini-Gras et al. 2017) und aus Spanien (6 %) (Casas et al. 2011a).

Die Ursache, für die in der vorliegenden Studie höheren Prävalenz, könnte zum einen in der Nutzung unterschiedlicher PCR-Protokolle zwischen dieser und anderer Studien, wie der von Casas et al. (2011a), liegen, in der eine semi-nested RT-PCR Anwendung fand. Ferner kann in falsch-negativen Ergebnissen die Ursache für eine niedrigere Prävalenz liegen, was jedoch nach Rutjes et al. (2007) durch die Einbindung eines internen Kontrollvirus in die HEV-PCR reduziert werden kann. Demnach wurde in der vorliegenden Arbeit zur Überwachung einer möglichen RNA-Inhibition, wie zuvor von Althof et al. (2019) beschrieben, der Bakteriophage MS2 in den Schritt der RNA-Extraktion integriert.

Zuletzt kann die in dieser Studie vergleichsweise höhere Prävalenz auch damit erklärt werden, dass verglichen mit festgestellten HEV-Prävalenzen in der Leber von Schweinen aus anderen Regionen beziehungsweise Ländern eine tatsächlich höhere Prävalenz in der Leber von Mastschweinen aus Nordwestdeutschland vorhanden ist.

Eine mögliche HEV-Kreuzkontamination im Rahmen der Probenahme für diese Promotion von der Oberfläche in die Tiefe des Organs und damit folglich zu einer höheren Prävalenz ist aufgrund der Durchführung der Probenahme ausgeschlossen beziehungsweise als sehr gering einzuschätzen: Zur Entnahme des Leberparenchyms wurde jeweils auf den Einschnitt von der Oberfläche in die Tiefe der Leber mittels Skalpell verzichtet, welcher eine Verschleppung von potenziell auf der Oberfläche befindlichen Viren in die Tiefe des Parenchyms zur Folge hätte haben können. Stattdessen erfolgte eine Ruptur der Leber zwischen dem lateralen und dem medialen linken beziehungsweise rechten Leberlappen. Dies ermöglichte einen kontaminationsfreien Zugang zum Parenchym und somit eine

kontaminationsfreie Probenentnahme. Zudem war jeder einzelnen Probenentnahme der Wechsel von sterilen Entnahmematerialien wie Skalpellen und Pinzetten vorgeschaltet.

Der Nachweis von HEV-RNA in der Leber von Schweinen, im in Deutschland üblichen Schlachtalter von sieben Monaten, kann auf eine Virusreplikation in der akuten Phase einer HEV-Infektion hindeuten (Bouwknegt et al. 2007). Damit einhergeht, wie bereits von Feurer et al. (2018) und Jori et al. (2016) geschlussfolgert, das mögliche Risiko einer lebensmittelbedingten HEV-Infektion für den Menschen, ausgehend von der Leber solcher akut infizierten Tiere. Das Risiko besteht insbesondere, sofern die Leber nicht ausreichend gegart verzehrt wird beziehungsweise Regeln zur allgemeinen Küchenhygiene nicht eingehalten werden (BZGA 2020).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in der vorliegenden Studie keine Aussage zur HEV-Infektiosität getroffen werden konnte, da generell mithilfe der real-time RT-PCR eine Aussage hinsichtlich der Virusinfektiosität nicht möglich ist. Für diese Bestimmung ist ein stabiles und funktionierendes Zellkultursystem notwendig, welches bislang für HEV nicht existiert (Fu et al. 2019; Cook et al. 2017).

Alle in der vorliegenden Arbeit HEV-positiven Lebern stammten von HEV-seropositiven Schweinen, wohingegen HEV-RNA in der Leber von HEV-seronegativen Schweinen nicht nachgewiesen werden konnte. Unter Berücksichtigung, dass Schweine zum Zeitpunkt einer HEV-Infektion maximal zwei bis drei Monate alt sind (Krog et al. 2019; Casas et al. 2011a; Meng et al. 1997), scheinen zum Zeitpunkt der Schlachtung HEV-seronegative Schweine bislang keine HEV-Infektion durchlaufen zu haben. Spätestens 13 Wochen *post infectionem* (Krog et al. 2019; Casas et al. 2011a) hätte vermutlich eine Serokonversion stattfinden müssen, welche wiederum zu einem seropositiven Ergebnis am Schlachthof geführt hätte. Diese Annahme lässt auf ein geringeres Risiko ausgehend von HEV-seronegativen Schweinen am Schlachthof und insbesondere auch von für den Konsum bestimmter roh verzehrbaren Produkten solcher Schweine schließen.

Hingegen legen die Ergebnisse dieser Arbeit ebenso nahe, dass HEV-seropositive Schweine beziehungsweise die Leber von diesen Tieren, in Abhängigkeit von der Infektiosität des Virus, ein Risiko für eine lebensmittelbedingte HEV-Infektion des Menschen bergen.

Als eine Limitation dieser Studie ergibt sich in diesem Zusammenhang, dass keine Sequenzierung der detektierten porcinen HEV-Isolate stattgefunden hat und somit kein Vergleich mit HEV-Stämmen aus klinischen Humanfällen erfolgen konnte.

Von der Schinkenmuskulatur der in dieser Arbeit eingeschlossenen Schweinen scheint, unabhängig vom serologischen Status der Schweine, primär kein erhöhtes Risiko für den Verbraucher auszugehen, unter der Voraussetzung, dass Hygiene- und Prozesskriterien eingehalten werden.

### 5.2.2. HEV-Serologie als diagnostisches Instrument

Die Fleischsaftserologie auf Schlachthofebene konnte bereits als ein nützliches diagnostisches Mittel für Maßnahmen zur Bekämpfung verschiedener zoonotischer Krankheitserreger beim Schwein wie *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *T. gondii* und *Trichinella spp.* evaluiert werden (Loreck et al. 2020; Felin et al. 2015; Meemken et al. 2014). Erstmals wurde in der ersten Veröffentlichung im Rahmen dieser Promotion (Dzierzon et al. 2020) für eine positive HEV-Fleischsaftserologie eine signifikante Korrelation ( $\chi^2 = 31,83$ ;  $p < 0,001$ ) mit dem Vorkommen von HEV-RNA in der Leber von Mastschweinen nachgewiesen. Dies konnte in der zweiten Veröffentlichung (Dzierzon et al. 2021) mit dem Ergebnis ergänzt werden, dass mit einem steigenden prozentualen Wert der im ELISA gemessenen optischen Dichte (OD%) eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von HEV in der Leber von Mastschweinen einhergeht (OR = 1,016;  $p < 0,001$ ). Für Schweine, bei denen der Nachweis von HEV-Antikörpern, jedoch kein Nachweis von HEV-RNA in der Leber möglich ist, besteht die Annahme, dass die akute Phase der HEV-Infektion durchlebt ist, sofern der Zeitpunkt der Infektion bei maximal zwei bis drei Lebensmonaten (Krog et al. 2019; Casas et al. 2011a; Meng et al. 1997) und nicht im Schlachtagalter liegt. In dieser Studie war die Kombination aus positivem HEV-Antikörpernachweis mit negativem HEV-RNA-Nachweis in der Leber bei 45 % (112/250) der untersuchten Schweine feststellbar.

Die hier vorliegenden Ergebnisse demonstrieren die signifikante Vorhersagekraft einer HEV-positiven Fleischsaftserologie auf das Vorkommen von HEV-RNA in der Leber des identischen Tieres. Ferner zeigt die Studie auf, dass die HEV-Serologie beim Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung sinnvoll ist, um einerseits mittels einer gezielten Rückmeldung Interventionen auf Bestandesebene auszulösen und andererseits um mittels einer Produktlenkung gezielt Produkte von seronegativen Herden für roh verzehrfähige Lebensmittel vom Schwein einzusetzen.

### 5.2.3. HEV-Kreuzkontamination

Für die Untersuchung einer möglichen Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Lebern im Schlachthof wurde in der zweiten Teilstudie (Dzierzon et al. 2021) die HEV-Prävalenz im Leberparenchym aus der ersten Teilstudie (Dzierzon et al. 2020) mit dem Vorkommen von HEV in den Oberflächenproben der identischen Lebern verglichen. Da bislang keine standardisierte Methode zum Nachweis von HEV existiert (EFSA 2017), wurden für einen optimalen Vergleich bei den Oberflächenproben sowohl die Probenahme als auch die Labormethoden identisch zu den Leberparenchymproben gewählt. Dabei umfasste die Entnahme des Probenmaterials lediglich die oberflächliche Schicht der Leber, scil. die seröse Membran sowie die Glisson-Kapsel.

Bis zur Entnahme der Proben wurden die in diese Studie integrierten Schweinelebern nach der amtlichen Fleischuntersuchung in so genannten Eurofleischkisten mit einem Volumen von 35 Litern (600 mm x 400 mm x 200 mm) gelagert. Dabei lagerten in je einer Kiste insgesamt zehn Lebern aus einer Herde, von denen lediglich fünf für die Beprobung vorgesehen und mit einer sterilen Ohrmarke, wie oben beschrieben, entsprechend markiert waren. Die Lagerung der Lebern in Eurofleischkisten entspricht dem gängigen Umgang mit den Schlachtorganen im Schlachthof bis zur weiteren Verarbeitung beziehungsweise Vermarktung und musste daher für die Probenahme nicht angepasst werden (Schlachthof in Nordwestdeutschland, Persönliche Kommunikation 28. Mai 2018).

In der molekularbiologischen Analyse war in insgesamt 34 % (85/250) aller untersuchten Oberflächenproben der Leber HEV-RNA nachweisbar.

Bisher lassen sich in der Literatur keine Daten zur Untersuchung der HEV-Kontamination im Zusammenhang mit der Lagerung von Schweinelebern im Schlachthof finden.

In der Schlachthofumgebung scheint HEV jedoch nach den Studien von Fenaux et al. (2018) und Berto et al. (2012) zu zirkulieren. In einer jüngeren Studie konnten Milojević et al. (2019) HEV an Gerätschaften mit direktem Kontakt zur Karkasse und Organen während des Schlachtprozesses detektieren.

Im Hinblick auf den initialen HEV-Status der Lebern zeigte sich in 83,7 % (36/43) der ursprünglich HEV-positiven Lebern HEV-RNA auch auf der Oberfläche. Hingegen war hinsichtlich des Aspekts der Kreuzkontamination bei 23,8 % (49/207) der initial HEV-negativen Lebern der Nachweis von HEV-RNA auf der zugehörigen Oberfläche möglich. Die Kombination zuletzt beschriebener Leberbefunde konnte Schweinen aus 15 der 25 untersuchten Herden zugeordnet werden, wobei in fünf dieser Herden keines der zehn untersuchten Tiere HEV-Antikörper und dementsprechend keine HEV-RNA initial in der



Leber aufwies. In dem Zusammenhang sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Probenahmen an Schlachttagen vorgenommen wurden, an denen sowohl HEV-seronegative als auch HEV-seropositive Herden geschlachtet wurden. Dementsprechend war eine gemeinsame Lagerung in Kisten von Lebern mit unterschiedlichem HEV-Status potenziell möglich. In insgesamt 18 % (9/50) der verwendeten Eurofleischkisten lagerten, neben nicht in diese Untersuchung einbezogene Lebern, jeweils nur initial HEV-negative Lebern, von denen aber mindestens bei einer Leber HEV-RNA auf der Oberfläche detektiert werden konnte. Darüber hinaus gab es in 34 % (17/50) der Kisten mindestens eine Leber mit HEV-positiven Status, wobei in diesen Kisten bei mindestens zwei untersuchten Lebern HEV-RNA auf der Oberfläche festgestellt wurde. In dem Zusammenhang ergab die Regressionsanalyse, dass es trotz Berücksichtigung des initialen HEV-Status der Lebern große Unterschiede beim Auftreten von HEV-RNA auf der Oberfläche der Lebern zwischen den Eurofleischkisten gab. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Eurofleischkisten auf das Vorkommen von HEV-RNA auf der Oberfläche von Lebern während der gemeinsamen Lagerung (OR = 11,269;  $p < 0,001$ ). Dieses Ergebnis stützt die Annahme einer Kreuzkontamination bei der üblichen gemeinsamen Lagerung von Lebern im Schlachthof.

Dabei lässt sich unter anderem auf den Austritt von Blut aus HEV-positiven Lebern während der Lagerung als Ursache für das Vorkommen von HEV-RNA auf der Oberfläche initial HEV-negativer Lebern schließen. Diese Vermutung bestärken Bouwknecht et al. (2009), die Blut von Schweinen in der Virämiephase als Quelle für eine Kreuzkontamination als sehr wahrscheinlich bezeichnen.

Somit ist davon auszugehen, dass HEV-positive Schweinelebern beziehungsweise Schweineblut (Bouwknecht et al. 2009) zur Verbreitung von HEV in der Lebensmittelkette beitragen. Ferner zeigen die Ergebnisse auf, dass zum Zeitpunkt der Schlachtung HEV-infizierte Schweine mit einem positiven HEV-Status der Leber eine sehr wichtige Rolle für die Übertragung sowie für die Kreuzkontamination von HEV im Schlachthof darstellen.

Neben der Gefahr für das Lebensmittel Schwein besteht aufgrund erhöhter Exposition zu Blut und Schlachtorganen ein erhöhtes Infektionsrisiko für Schlachthofmitarbeiter, was höhere HEV-Seroprävalenzen im Vergleich zu Menschen ohne direkten Schweinekontakt belegen (Hoan et al. 2019; Huang et al. 2019; Teixeira et al. 2017; Krumbholz et al. 2012). Daher ist das Achten von entsprechenden Hygienemaßnahmen (Pavio et al. 2010) sowie das Tragen von Handschuhen (Taus et al. 2019; Schielke et al. 2015) bei Kontakt zu Blut oder Organen potenziell HEV-infizierter Tiere zu empfehlen, was zur Senkung des Infektionsrisikos beitragen kann.

Da bislang, wie zuvor bereits erläutert, effiziente Methoden zur Bestimmung der HEV-Infektiosität fehlen (Fu et al. 2019; Cook et al. 2017), bleibt auch die Frage zur Überlebensdauer von HEV in der Schlachtumgebung, im Blut sowie im Lebergewebe von Schweinen nach der Eviszeration derzeit unbeantwortet. Zur Beurteilung, inwieweit Interventionskonzepte in Form von Hygienemaßnahmen eine Reduktion beziehungsweise Inaktivierung von HEV entlang der Lebensmittelkette bewirken können, sind weitere Studien zur HEV-Überlebensfähigkeit im Lebensmittel und in der Umwelt erforderlich (Cook und van der Poel 2015).

Dies ist mit dem Stand heute die erste Studie in Deutschland, in der eine mögliche HEV-Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Lebern im Schlachthof analysiert wurde. In diesem Zusammenhang bedeutend ist, dass die Lagerung von Schweinelebern in Eurofleischkisten im Schlachthof zu einer HEV-positiven Leberoberfläche führen kann, selbst wenn der initiale HEV-Status der Leber negativ ist.

Als eine Limitation in der Planung dieser zweiten Teilstudie stellte sich jedoch heraus, dass die Analyse der HEV-Kreuzkontamination auf der Untersuchung von Lebergewebe der oberflächlichen Schicht beruhte. Der Grund für die Auswahl von Oberflächengewebe anstelle von Oberflächentupfern für die Untersuchung auf HEV lag in dem Bestreben, eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen des Leberparenchyms zu erreichen. Dies sollte durch die Umsetzung einer vergleichbaren Probenahme sowie identischer Labormethoden sowohl für die Proben des Leberparenchyms als auch für solche der Leberoberfläche realisiert werden. In diesem Zusammenhang stellt sich jedoch die Frage, ob in die Untersuchung der Leberoberfläche auf HEV Material aus dem Leberparenchym einbezogen wurde, was eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge gehabt hätte.

In dieser Studie zeigt jedoch das Vorhandensein von ursprünglich HEV-negativen Schweinelebern mit nachweisbarer HEV-RNA auf der Oberfläche (23,8 %; 49/207) eine HEV-Kreuzkontamination auf. Darüber hinaus stützt das Ergebnis von identifizierten Schweinelebern mit einem initial positiven HEV-Status, aber ohne nachweisbare HEV-RNA auf der entsprechenden Oberfläche (16,3 %; 7/43), sowohl die Methode der Probenahme als auch die Qualität der vorliegenden Daten.

Eine weitere Einschränkung im Studiendesign lag darin, dass weder Oberflächenproben der Eurofleischkisten noch der unmittelbaren Schlachthofumgebung für die Untersuchung auf HEV-RNA berücksichtigt wurden. Das Einbeziehen solcher Daten hätte die Aussagekraft der Ergebnisse zur HEV-Kreuzkontamination in dieser Arbeit stärken können. Darüber

hinaus wäre durch eine Sequenzanalyse der isolierten HEV-RNA aus solchen Umgebungsproben sowie aus den untersuchten Leberoberflächen- und Leberparenchymproben eine Subtyp-Bestimmung und damit eine Aussage hinsichtlich des Ursprungs, insbesondere der oberflächlich detektierten HEV-Isolate, möglich gewesen.

### **5.3. Schlussfolgerungen und Ausblick**

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte aufgezeigt werden, dass HEV in Mastschweinen in Nordwestdeutschland weit verbreitet ist und dass ausgehend von Schweinelebern ein mögliches Risiko für eine HEV-Übertragung auf den Menschen besteht. In dem Zusammenhang verschärft der Anstieg der vom RKI gemeldeten klinischen Hepatitis-E-Fälle beim Menschen in Deutschland über die vergangenen zehn Jahre (RKI 2021, 2011) die Notwendigkeit von Präventions- und Interventionskonzepten entlang der Lebensmittelkette Schwein.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die HEV-Fleischsaftserologie zur Vorhersage des Vorkommens von HEV-RNA in der Leber von Schweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung ein sinnvolles diagnostisches Instrument darstellt. Die signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von HEV-Antikörpern und einem HEV-positivem PCR-Ergebnis bietet eine sehr gute Ausgangsbasis für risikobasierte Entscheidungen. Daher sollte die Erstellung von HEV-Herdenprofilen für Schweinemastbetriebe zur Abschätzung des Risikos einer lebensmittelbedingten HEV-Infektion beim Menschen in Betracht gezogen werden. Mithilfe solcher Profile ließen sich über Rückmeldungen an den Betrieb Interventionsmaßnahmen auf Bestandesebene basierend auf bisher bekannten Risikofaktoren wie der Biosicherheit (B. Wilhelm et al. 2016; Walachowski et al. 2014) und der Fütterung (Hinjoy et al. 2013) initiieren.

Darüber hinaus sollten auf Schlachthofebene die logistische Schlachtung sowie die Rohproduktsteuerung auf Grundlage serologischer HEV-Herdenprofile als wesentliche Interventionsmaßnahmen zur Reduzierung lebensmittelbedingter HEV-Infektionen beim Menschen herangezogen werden. Daneben sind Aufklärungsprogramme zur Lebensmittelsicherheit erforderlich, die sich auf das Risiko von HEV-Kreuzkontaminationen in Schlachthöfen, Verarbeitungsbetrieben sowie auf Verbraucherküchen konzentrieren. Insbesondere Verbraucher und Personen, die in der Lebensmittelproduktionsindustrie tätig sind, sollten sich der potenziellen Gefahr einer HEV-Infektion durch HEV-positive Schweinelebern beziehungsweise durch HEV-negative Schweinelebern, die oberflächlich mit HEV kontaminiert sein können, bewusst sein.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### **Das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus beim Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung**

*Eine Analyse der Vorhersagekraft der Fleischsaftserologie auf das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus in Leber und Muskulatur beim Schwein und des Auftretens einer möglichen Kreuzkontamination im Schlachthof*

Die Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus (HEV) beim Schwein ist in der Regel durch einen subklinischen Verlauf gekennzeichnet und geht ohne makroskopische Veränderungen an Organen oder dem Schlachtkörper einher. Am Schlachthof gelingt die Identifizierung HEV-infizierter Schweine daher weder im Rahmen der amtlichen Schlachtier- noch während der amtlichen Fleischuntersuchung. Da zudem kein Monitoringprogramm zur Bekämpfung von HEV beim Schwein existiert, besteht jederzeit das Risiko, dass HEV-belastete Produkte vom Schwein in die Lebensmittelkette gelangen und bei rohem beziehungsweise unzureichend gegartem Verzehr zu einer lebensmittelbedingten HEV-Infektion beim Menschen führen können.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Dissertation die Vorhersagekraft der serologischen Analyse von Fleischsaft für das Vorkommen von HEV in der Leber und in der Schinkenmuskulatur von Mastschweinen untersucht werden.

Als weiteres Ziel galt die Untersuchung des Risikos einer Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Schweinelebern auf HEV-negative Schweinelebern während der üblichen gemeinsamen Lagerung in Eurofleischkisten im Schlachthof.

Es wurden zu diesem Zweck 250 Mastschweine in die vorliegende Studie einbezogen und zwischen August und Dezember 2018 an einem Schlachthof in Nordwestdeutschland beprobt. Dabei erfolgte die Auswahl der in der Studie involvierten Schweine nach dem Zufallsprinzip. Die Entnahme der vier Probenmatrices Zwerchfellpfeiler, Schinkenmuskulatur, Leberparenchym sowie Gewebe der Leberoberfläche je Schwein fand an fünf Schlachttagen statt, wobei die Tagesschlachtzahl bis zu 5.500 Schweine betrug. Der Nachweis von HEV-Antikörpern im Fleischsaft mittels ELISA-Technologie resultierte in einer HEV-Seroprävalenz von 62 % (155/250) bei den in dieser Studie involvierten Mastschweinen auf Einzeltierebene und in einer Seroprävalenz von 72 % (18/25) auf Herdenebene. Die im Europavergleich hohe HEV-Prävalenz in Schweinelebern

(17 %; 43/250) wurde mithilfe der real-time RT-PCR analysiert, wobei für HEV-seropositive Schweine ein signifikant höheres Risiko für das Vorkommen von HEV-RNA in der Leber ermittelt werden konnte. Die Leberproben von HEV-seronegativen Schweinen erwiesen sich in dieser Studie hingegen alle als HEV-negativ, was statistisch in einem signifikant geringen Risiko für das Vorkommen von HEV-RNA in der Leber von seronegativen Schweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung resultierte. In dem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein steigender prozentualer Wert der im ELISA gemessenen optischen Dichte (OD%) die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von HEV in der Leber von Mastschweinen erhöht (OR = 1,016;  $p < 0,001$ ).

Darüber hinaus wurden in einer weiteren Untersuchung die HEV-PCR-Ergebnisse der Oberfläche mit dem initialen HEV-Status des Parenchyms der jeweils identischen Leber verglichen, was in Deutschland erstmalig zu Erkenntnissen hinsichtlich einer potenziellen HEV-Kreuzkontamination ausgehend von Schweinelebern auf Schlachthofebene führte. Bei 23,8 % (49/207) der initial HEV-negativen Lebern konnte nach gemeinsamer Lagerung in Eurofleischkisten mit anderen Lebern HEV-RNA auf der Oberfläche detektiert werden. Der Anteil an Lebern mit einer HEV-positiven Oberfläche variierte zwischen den Eurofleischkisten stark, obwohl der initiale HEV-Status der Lebern berücksichtigt wurde und zeigt damit eine mögliche Kreuzkontamination ausgehend von HEV-positiven Lebern während der Lagerung in Kisten auf.

Ein Nachweis von HEV-RNA in der Schinkenmuskulatur der hier untersuchten Schweine gelang nicht.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse dieser Studie erstmals eine signifikante Vorhersagekraft der positiven HEV-Fleischsaftserologie auf das Vorkommen von HEV-RNA in Schweineleber. Zudem kann die Lagerung von Schweinelebern in Eurofleischkisten im Schlachthof zu einer HEV-positiven Leberoberfläche führen, auch bei initial HEV-negativen Lebern.

HEV-seropositive Schweine beziehungsweise die Leber HEV-seropositiver Schweine stellen daher scheinbar ein potenzielles Risiko für lebensmittelbedingte HEV-Infektionen beim Menschen beziehungsweise für Kreuzkontaminationen im Schlachthof dar.

## 7. SUMMARY

### **The occurrence of hepatitis E virus in fattening pigs at the time of slaughter**

*An analysis of the predictive power of meat juice serology on the presence of hepatitis E virus in liver and muscle in pigs and the occurrence of possible cross-contamination at the abattoir*

Hepatitis E virus (HEV) infection in pigs is characterized by a subclinical course and is associated with no macroscopic lesions in organs or the carcass. Therefore, the identification of pigs infected by HEV is not possible either during official ante-mortem or post-mortem inspection at the abattoir. As no monitoring programme for HEV control in pigs exists, there is always the risk that HEV contaminated products from pigs enter the food chain and can lead to foodborne HEV infection in humans if consumed raw or undercooked. In this context, the aim of this doctoral thesis was to investigate the predictive power of serological analysis of meat juice for the presence of HEV in the liver and ham muscle of fattening pigs. The additional objective was to investigate the risk of cross-contamination originating from HEV positive pig livers to HEV negative pig livers during the standard joint storage in Euro meat containers at the abattoir.

For this purpose, 250 fattening pigs were included in the present study and were sampled between August and December 2018 at an abattoir in northwestern Germany. Pigs involved in this study were selected randomly. Collecting of the four matrices diaphragm pillar, ham muscle, liver parenchyma and tissue of the liver surface per pig was performed on five slaughter days, with daily slaughter numbers up to 5,500 pigs.

HEV antibody detection in meat juice by ELISA technology resulted in an HEV seroprevalence of 62 % (155/250) in the fattening pigs involved in this study at single animal level and a seroprevalence of 72 % (18/25) at herd level. The high HEV prevalence of porcine livers (17 %; 43/250), compared to other European countries, was analyzed by real-time RT-PCR, which revealed a significantly higher risk for the presence of HEV RNA in the liver of HEV seropositive pigs. In contrast, liver samples obtained from HEV seronegative pigs were all found to be HEV negative in this study, resulting statistically in a significantly low risk for the presence of HEV RNA in the livers of seronegative pigs at the time of slaughter. It could be demonstrated that an increasing percentage value of optical density (OD%) measured by ELISA increased the probability of HEV presence in the liver of fattening pigs (OR 1.016;  $p < 0.001$ ).

Furthermore, in an additional investigation, HEV PCR results of the liver surface were compared with the corresponding initial HEV status of the liver parenchyma, providing for the first time insights into potential HEV cross-contamination of pig livers at abattoir level in Germany. In 23.8 % (49/207) of initially HEV negative livers, HEV RNA was detected on the surface after joint storage in Euro meat containers with other livers. The proportion of pig livers with an HEV positive surface varied largely between the Euro meat containers, although the initial HEV status of the livers was taken into account, indicating possible cross-contamination originating from HEV positive livers during storage in Euro meat containers. HEV RNA could not be detected in ham muscle samples of the pigs analyzed in this study.

In conclusion, the results of this study show for the first time a significant predictive power of positive HEV meat juice serology on the presence of HEV RNA in pig liver. In addition, storage of pig livers in Euro meat containers at the abattoir can result in an HEV positive liver surface, even in initially HEV negative livers.

Therefore, HEV seropositive pigs or the livers of HEV seropositive pigs seem to pose a potential risk for foodborne HEV infections in humans respectively for cross-contamination in the abattoir.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G (2009): High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol*, 139: 270-278. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.032
- Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik S R, Krawczynski K (2000): Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*, 356: 1081-1082. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02737-9
- Aggarwal R, Naik S R (1994): Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol*, 21: 718-723. doi: 10.1016/s0168-8278(94)80229-7
- Althof N, Trojnar E, Bohm T, Burkhardt S, Carl A, Contzen M, Kilwinski J, Mergemeier S, Moor D, Made D, Johne R (2019): Interlaboratory Validation of a Method for Hepatitis E Virus RNA Detection in Meat and Meat Products. *Food Environ Virol*, 11: 1-8. doi: 10.1007/s12560-018-9360-6
- 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. doi: 10.1016/s0166-0934(99)00069-5.
- Anheyer-Behmenburg H E, Szabo K, Schotte U, Binder A, Klein G, Johne R (2017): Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013-2015. *Emerg Infect Dis*, 23: 130-133. doi: 10.3201/eid2301.161169
- Anonymous (2018): Hepatitis-Viren in Wakame-Algensalat. Abgerufen am: 11. Oktober 2021 um 15:45 Uhr über folgende URL: <https://www.fischmagazin.de/newsartikel-seriennummer-5002-Rueckruf+HepatitisViren+in+WakameAlgensalat.htm>
- Arankalle V A, Paranjape S, Emerson S U, Purcell R H, Walimbe A M (1999): Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J Gen Virol*, 80: 1691-1700. doi: 10.1099/0022-1317-80-7-1691



- Azman A S, Ciglenecki I, Oeser C, Said B, Tedder R S, Ijaz S (2018): The incubation period of hepatitis E genotype 1: insights from pooled analyses of travellers. *Epidemiol Infect*, 146: 1533-1536. doi: 10.1017/s0950268818001097
- Baechlein C, Schielke A, Johne R, Ulrich R G, Baumgaertner W, Grummer B (2010): Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol*, 144: 187-191.  
doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.011
- Baechlein C, Seehusen F, Nathues H, grosse Beilage E, Baumgartner W, Grummer B (2013): Molecular detection of hepatitis E virus in German domestic pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 126: 25-31. doi: 10.2376/0005-9366-126-25
- 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. doi: 10.1159/000149370
- 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.  
doi: 10.1002/jmv.1890320110
- Banks M, Martelli F, Grierson S, Fellows H J, Stableforth W, Bendall R, Dalton H R (2010): Hepatitis E virus in retail pig livers. *Vet Rec*, 166: 29. doi: 10.1136/vr.b5602
- Barnaud E, Rogée S, Garry P, Rose N, Pavio N (2012): Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol*, 78: 5153-5159. doi: 10.1128/aem.00436-12
- Baylis S A, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling C M, Hanschmann K M (2013): World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis*, 19: 729-735.  
doi: 10.3201/eid1905.121845
- Beck R, Gaspar A, Mihaljević Z, Marinculić A, Stojcević D, Brstilo M (2005): Evaluation of ELISA for detection of *Trichinella* antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. *Vet Parasitol*, 132: 91-95. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.034

- Behloul N, Baha S, Liu Z, Wei W, Zhu Y, Rao Y, Shi R, Meng J (2020): Design and development of a chimeric vaccine candidate against zoonotic hepatitis E and foot-and-mouth disease. *Microb Cell Fact*, 19: 137. doi: 10.1186/s12934-020-01394-1
- Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H (2010): A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol*, 82: 799-805. doi: 10.1002/jmv.21656
- Berke T, Matson D O (2000): Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol*, 145: 1421-1436. doi: 10.1007/s007050070099
- Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R, Martelli F, Johne R, Reetz J, Ulrich R G, Pavio N, Van der Poel W H, Banks M (2013a): Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis*, 19: 264-266. doi: 10.3201/eid1902.121255
- Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M (2012): Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 18: 1358-1360. doi: 10.3201/eid1808.111647
- Berto A, Van der Poel W H, Hakze-van der Honing R, Martelli F, La Ragione R M, Inglese N, Collins J, Grierson S, Johne R, Reetz J, Dastjerdi A, Banks M (2013b): Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *J Virol Methods*, 187: 327-332. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.017
- Bigna J J, Modiyinji A F, Nansseu J R, Amougou M A, Nola M, Kenmoe S, Temfack E, Njouom R (2020): Burden of hepatitis E virus infection in pregnancy and maternofetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*, 20: 426. doi: 10.1186/s12884-020-03116-2
- Bonney J H, Kwame-Aryee R A, Obed S, Tamatey A A, Barnor J S, Armah N B, Oppong S A, Osei-Kwesi M (2012): Fatal hepatitis E viral infection in pregnant women in Ghana: a case series. *BMC Res Notes*, 5: 478. doi: 10.1186/1756-0500-5-478
- Bouamra Y, Gerolami R, Arzouni J P, Grimaud J C, Lafforgue P, Nelli M, Tivoli N, Ferretti A, Motte A, Colson P (2014): Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. *Intervirology*, 57: 43-48. doi: 10.1159/000354801

- Bouwknegt M, Frankena K, Rutjes S A, Wellenberg G J, de Roda Husman A M, van der Poel W H, de Jong M C (2008): Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*, 39: 40. doi: 10.1051/vetres:2008017
- Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel W H, Rutjes S A, de Roda Husman A M (2007): Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot*, 70: 2889-2895. doi: 10.4315/0362-028x-70.12.2889
- Bouwknegt M, Rutjes S A, Reusken C B, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong M C, de Roda Husman A M, Poel W H (2009): The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res*, 5: 7. doi: 10.1186/1746-6148-5-7
- Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, Teo C G (2006): Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med*, 16: 79-83. doi: 10.1111/j.1365-3148.2006.00652.x
- Boxman I L A, Jansen C C C, Hägele G, Zwartkruis-Nahuis A, Tijmsma A S L, Vennema H (2019): Monitoring of pork liver and meat products on the Dutch market for the presence of HEV RNA. *Int J Food Microbiol*, 296: 58-64. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.018
- Bradley D W (1990): Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull*, 46: 442-461. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072409
- Bradley D W, Balayan M S (1988): Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 1: 819. doi: 10.1016/s0140-6736(88)91674-1
- Brassard J, Gagne M J, Genereux M, Cote C (2012): Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol*, 78: 3763-3766. doi: 10.1128/aem.00251-12
- Bundesamt für Statistik (Schweiz) (2020): Pro-Kopf-Konsum von Schinken, Speck, gesalzenem und geräuchertem Schweinefleisch in der Schweiz von 2006 bis 2018. Abgerufen am: 08. November 2020 um 18:10 Uhr über folgende URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/475189/umfrage/pro-kopf-konsum-von-schinken-speck-gesalzenem-und-geraueuchertem-schweinefleisch-in-der-schweiz/>

- Burri C, Vial F, Ryser-Degiorgis M P, Schwermer H, Darling K, Reist M, Wu N, Beerli O, Schoning J, Cavassini M, Waldvogel A (2014): Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic pigs and wild boars in Switzerland. *Zoonoses Public Health*, 61: 537-544.  
doi: 10.1111/zph.12103
- BZgA (Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung) (2020): Küchen- und Lebensmittelhygiene. Abgerufen am: 02. Mai 2021 um 17:10 Uhr über folgende URL:  
<https://www.infektionsschutz.de/hygienetipps/kuechen-und-lebensmittelhygiene/>
- Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J, Chapuy-Regaud S (2019): Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol*, 93: e01207-01218. doi: 10.1128/jvi.01207-18
- Casas M, Cortes R, Pina S, Peralta B, Allepuz A, Cortey M, Casal J, Martin M (2011a): Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol*, 148: 27-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.010
- Casas M, Pina S, Peralta B, Mateu E, Casal J, Martin M (2011b): Comparison of muscle fluid and serum for detection of antibodies against hepatitis E virus in slaughter pigs. *Vet J*, 190: 179-180. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.030
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2021): Electron micrograph of Hepatitis E viruses. Abgerufen am: 10. November 2021 um 16:30 Uhr über folgende URL:  
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=5605>
- Chandra N S, Sharma A, Malhotra B, Rai R R (2010): Dynamics of HEV viremia, fecal shedding and its relationship with transaminases and antibody response in patients with sporadic acute hepatitis E. *Virol J*, 7: 213. doi: 10.1186/1743-422x-7-213
- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S (2008): Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*, 33: 451-464. doi: 10.1007/s12038-008-0064-1
- Chen Y, Zhao Q, Liu B, Wang L, Sun Y, Li H, Wang X, Syed S F, Zhang G, Zhou E M (2016): A Novel Blocking ELISA for Detection of Antibodies against Hepatitis E Virus in Domestic Pigs. *PLoS One*, 11: e0152639. doi: 10.1371/journal.pone.0152639

- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R (2010): Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*, 202: 825-834. doi: 10.1086/655898
- Colson P, Romanet P, Moal V, Borentain P, Purgus R, Benezech A, Motte A, Gerolami R (2012): Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg Infect Dis*, 18: 1361-1364. doi: 10.3201/eid1808.111827
- Cook N, D'Agostino M, Johne R (2017): Potential Approaches to Assess the Infectivity of Hepatitis E Virus in Pork Products: A Review. *Food and Environmental Virology*, 9: 243-255. doi: 10.1007/s12560-017-9303-7
- Cook N, van der Poel W H (2015): Survival and Elimination of Hepatitis E Virus: A Review. *Food Environ Virol*, 7: 189-194. doi: 10.1007/s12560-015-9196-2
- Corman V M, Nagy P, Ostermann S, Arloth J, Liljander A, Barua R, Das Gupta A, Hakimuddin F, Juhasz J, Wernery U, Drosten C (2020): Hepatitis E Virus Genotype 7 RNA and Antibody Kinetics in Naturally Infected Dromedary Calves, United Arab Emirates. *Emerg Infect Dis*, 26: 2214-2217. doi: 10.3201/eid2609.191758
- Crossan C, Grierson S, Thomson J, Ward A, Nunez-Garcia J, Banks M, Scobie L (2015): Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect*, 143: 2237-2240. doi: 10.1017/s0950268814003100
- Dahnert L, Conraths F J, Reimer N, Groschup M H, Eiden M (2018): Molecular and serological surveillance of Hepatitis E virus in wild and domestic carnivores in Brandenburg, Germany. *Transbound Emerg Dis*, 65: 1377-1380. doi: 10.1111/tbed.12877
- Dalton H R, Thurairajah P H, Fellows H J, Hussaini H S, Mitchell J, Bendall R, Banks M, Ijaz S, Teo C G, Levine D F (2007): Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat*, 14: 304-309. doi: 10.1111/j.1365-2893.2006.00800.x

Deutscher Fleischer-Verband (2021): Pro-Kopf-Konsum von Fleisch- und Wurstwaren in Deutschland nach Art in den Jahren 2019 bis 2020. Abgerufen am: 13. November 2021 um 8:00 Uhr über folgende URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/163791/umfrage/pro-kopf-konsum-von-wurstwaren-und-sonstigen-fleischerzeugnissen-in-deutschland/>

Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknecht M, Rodriguez-Lazaro D, Pavlik I, Ruggeri F M (2012): Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*, 18: 1282-1289. doi: 10.3201/eid1808.111783

Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N (2016): Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*, 8: 270. doi: 10.3390/v8100270

Dremsek P, Joel S, Baechlein C, Pavio N, Schielke A, Ziller M, Durrwald R, Renner C, Groschup M H, Johne R, Krumbholz A, Ulrich R G (2013): Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs. *J Virol Methods*, 190: 11-16. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.03.010

Dzierzon J, Oswaldi V, Merle R, Langkabel N, Meemken D (2020): High Predictive Power of Meat Juice Serology on the Presence of Hepatitis E Virus in Slaughter Pigs. *Foodborne Pathog Dis*, 17: 687-692. doi: 10.1089/fpd.2020.2797

Dzierzon J, Oswaldi V, Merle R, Langkabel N, Meemken D (2021): Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir. *J Consum Prot Food Saf*, online ahead of print. doi: 10.1007/s00003-021-01357-7

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2017): Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015. Abgerufen am: 23. Juni 2019 um 22:30 Uhr über folgende URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-e-eueea-2005-2015>

EFSA (European Food Safety Authority) (2017): Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA J*, 15: 89. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4886

- EFSA und ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2016): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*, 14: 4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
- El-Tras W F, Tayel A A, El-Kady N N (2013): Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses Public Health*, 60: 244-251. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01516.x
- Emerson S U, Anderson D, Arankalle A, Meng X J, Purdy M, Schlauder G G, Tsarev S A (2005a): Hepevirus. In: *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Hrsg.: Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A*, 1st edition, pages 851-857. London: Elsevier Academic Press - ISBN: 978-0-12-249951-7.
- Emerson S U, Arankalle V A, Purcell R H (2005b): Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis*, 192: 930-933. doi: 10.1086/432488
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8: 871-874. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-x
- Enouf V, Dos Reis G, Guthmann J P, Guerin P J, Caron M, Marechal V, Nicand E (2006): Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol*, 78: 1076-1082. doi: 10.1002/jmv.20665
- Faber M S, Wenzel J J, Jilg W, Thamm M, Höhle M, Stark K (2012): Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg Infect Dis*, 18: 1654-1657. doi: 10.3201/eid1810.111756
- 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. *J Gen Virol*, 88: 912-917. doi: 10.1099/vir.0.82613-0

- Feagins A R, Opriessnig T, Guenette D K, Halbur P G, Meng X J (2008): Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol*, 123: 32-37. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.068
- Fehlhaber K, Hintersdorf P, Krüger G (2003): Prävalenz von *Toxoplasma gondii*: Untersuchungen bei Schlachtschweinen aus verschiedenen Haltungsformen und in handelsüblichen Hackfleischproben. *Fleischwirtschaft*, 83: 97-99.
- Felin E, Jukola E, Raulo S, Fredriksson-Ahomaa M (2015): Meat Juice Serology and Improved Food Chain Information as Control Tools for Pork-Related Public Health Hazards. *Zoonoses Public Health*, 62: 456-464. doi: 10.1111/zph.12174
- Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Gentilhomme A, Bensenane M, Bronowicki J P, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E (2018): Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. *J Clin Virol*, 103: 63-70. doi: 10.1016/j.jcv.2018.04.003
- Ferri G, Vergara A (2021): Hepatitis E Virus in the Food of Animal Origin: A Review. *Foodborne Pathog Dis*, 18: 368-377. doi: 10.1089/fpd.2020.2896
- Feurer C, Le Roux A, Rossel R, Barnaud E, Dumarest M, Garry P, Pavio N (2018): High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*, 264: 25-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.013
- Fontana R J, Engle R E, Scaglione S, Araya V, Shaikh O, Tillman H, Attar N, Purcell R H, Lee W M (2016): The role of hepatitis E virus infection in adult Americans with acute liver failure. *Hepatology*, 64: 1870-1880. doi: 10.1002/hep.28649
- Freeman W M, Walker S J, Vrana K E (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26: 112-125. doi: 10.2144/99261rv01
- Fu R M, Decker C C, Dao Thi V L (2019): Cell Culture Models for Hepatitis E Virus. *Viruses*, 11: 608. doi: 10.3390/v11070608



- Gao S, Li D, Zha E, Zhou T, Wang S, Yue X (2015): Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int J Environ Res Public Health*, 12: 2026-2036. doi: 10.3390/ijerph120202026
- Garbuglia A R, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni C M, Sordillo P, Gentile D, La Scala P, Girardi E, Capobianchi M R (2013): Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg Infect Dis*, 19: 110-114. doi: 10.3201/eid1901.120983
- Garcia N, Hernandez M, Gutierrez-Boada M, Valero A, Navarro A, Munoz-Chimeno M, Fernandez-Manzano A, Escobar F M, Martinez I, Barcena C, Gonzalez S, Avellon A, Eiros J M, Fongaro G, Dominguez L, Goyache J, Rodriguez-Lazaro D (2019): Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. *Front Microbiol*, 10: 2990. doi: 10.3389/fmicb.2019.02990
- Geng Y, Zhang H, Huang W, Harrison T J, Geng K, Li Z, Wang Y (2014): Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon*, 14: e15618. doi: 10.5812/hepatmon.15618
- Geng Y, Zhao C, Guo T, Xu Y, Wang X, Huang W, Liu H, Wang Y (2019): Detection of Hepatitis E Virus in Raw Pork and Pig Viscera As Food in Hebei Province of China. *Foodborne Pathog Dis*, 16: 325-330. doi: 10.1089/fpd.2018.2572
- Gerber P F, Xiao C T, Cao D, Meng X J, Opriessnig T (2014): Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. *J Clin Microbiol*, 52: 1045-1051. doi: 10.1128/jcm.03118-13
- Giannini P, Jermini M, Leggeri L, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R (2018): Detection of Hepatitis E Virus RNA in Raw Cured Sausages and Raw Cured Sausages Containing Pig Liver at Retail Stores in Switzerland. *J Food Prot*, 81: 43-45. doi: 10.4315/0362-028x.Jfp-17-270
- Go H J, Park B J, Ahn H S, Lyoo E L, Kim D H, Lee J B, Park S Y, Song C S, Lee S W, Choi I S (2019): Identification of Hepatitis E Virus in Bovine and Porcine Raw Livers. *J Microbiol Biotechnol*, 29: 2022-2025. doi: 10.4014/jmb.1910.10059

- Grodzki M, Schaeffer J, Piquet J C, Le Saux J C, Chev e J, Ollivier J, Le Pendu J, Le Guyader F S (2014): Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl Environ Microbiol*, 80: 4269-4276. doi: 10.1128/aem.00978-14
- Guillois Y, Abravanel F, Miura T, Pavio N, Vaillant V, Lhomme S, Le Guyader F S, Rose N, Le Saux J C, King L A, Izopet J, Couturier E (2016): High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin Infect Dis*, 62: 351-357. doi: 10.1093/cid/civ862
- Guo H, Zhou E M, Sun Z F, Meng X J, Halbur P G (2006): Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol*, 87: 217-223. doi: 10.1099/vir.0.81393-0
- Gutierrez-Vergara C, Quintero J, Duarte J F, Suescun J P, Lopez-Herrera A (2015): Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia. *Genet Mol Res*, 14: 2890-2899. doi: 10.4238/2015.March.31.20
- Haagsma E B, Riezebos-Brilman A, van den Berg A P, Porte R J, Niesters H G (2010): Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl*, 16: 474-477. doi: 10.1002/lt.22014
- Hakze-van der Honing R W, van Coillie E, Antonis A F, van der Poel W H (2011): First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One*, 6: e22673. doi: 10.1371/journal.pone.0022673
- 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. doi: 10.1128/jcm.39.3.918-923.2001
- Heredia N, García S (2018): Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr*, 4: 250-255. doi: 10.1016/j.aninu.2018.04.006

- Hewitt P E, Ijaz S, Brailsford S R, Brett R, Dicks S, Haywood B, Kennedy I T, Kitchen A, Patel P, Poh J, Russell K, Tettmar K I, Tossell J, Ushiro-Lumb I, Tedder R S (2014): Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet*, 384: 1766-1773. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61034-5
- Hinjoy S, Nelson K E, Gibbons R V, Jarman R G, Chinnawirotpisan P, Fernandez S, Tablerk P, Labrique A B, Patchanee P (2013): A cross-sectional study of hepatitis E virus infection in pigs in different-sized farms in northern Thailand. *Foodborne Pathog Dis*, 10: 698-704. doi: 10.1089/fpd.2012.1369
- Hoan N X, Huy P X, Sy B T, Meyer C G, Son T V, Binh M T, Giang D P, Tu Anh D, Bock C T, Wang B, Tong H V, Kreamsner P G, Song L H, Toan N L, Velavan T P (2019): High Hepatitis E virus (HEV) Positivity Among Domestic Pigs and Risk of HEV Infection of Individuals Occupationally Exposed to Pigs and Pork Meat in Hanoi, Vietnam. *Open Forum Infect Dis*, 6: ofz306. doi: 10.1093/ofid/ofz306
- Hsieh S Y, Meng X J, Wu Y H, Liu S T, Tam A W, Lin D Y, Liaw Y F (1999): Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, 37: 3828-3834. doi: 10.1128/JCM.37.12.3828-3834.1999
- Hu W P, Lu Y, Precioso N A, Chen H Y, Howard T, Anderson D, Guan M (2008): Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin Vaccine Immunol*, 15: 1151-1157. doi: 10.1128/cvi.00186-07
- Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih J W, Ng M H, Zhu F, Zhang J, Xia N (2010): Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One*, 5: e13560. doi: 10.1371/journal.pone.0013560
- Huang X, Huang Y, Wagner A L, Chen X, Lu Y (2019): Hepatitis E virus infection in swine workers: A meta-analysis. *Zoonoses Public Health*, 66: 155-163. doi: 10.1111/zph.12548
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2009): 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Abgerufen am: 09. Juli 2021 um 10:00 Uhr über folgende URL: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/1231>

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2014): ICTV Master Species List 2014. Abgerufen am: 09. Juli 2021 um 10:30 Uhr über folgende URL: [https://talk.ictvonline.org/cfs-file/\\_\\_key/telligent-evolution-components-attachments/13-84-00-00-00-52-08/ICTV-Master-Species-List-2014-v4.xls?forcedownload=true](https://talk.ictvonline.org/cfs-file/__key/telligent-evolution-components-attachments/13-84-00-00-00-52-08/ICTV-Master-Species-List-2014-v4.xls?forcedownload=true)

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2020): ICTV Master Species List 2020. Abgerufen am: 30.10.2021 um 13:00 Uhr über folgende URL: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/12314>

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2021): Proposed Orthohepevirus A subtype reference sequences. Abgerufen am: 31. Oktober 2021 um 19:40 Uhr über folgende URL: [https://talk.ictvonline.org/ictv\\_wikis/hepeviridae/w/sg\\_hepe/343/proposed-orthohepevirus-a-subtype-reference-sequences](https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/hepeviridae/w/sg_hepe/343/proposed-orthohepevirus-a-subtype-reference-sequences)

IfSG (Infektionsschutzgesetz) Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (2000): § 7 Meldepflichtige Nachweise von Krankheitserregern. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2021 Teil I, S. 1175-1176

Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H (2006): Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods*, 137: 325-333.  
doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.004

Intharasongkroh D, Sa-Nguanmoo P, Tuanthap S, Thongmee T, Duang-In A, Klinfueng S, Chansaenroj J, Vongpunsawad S, Theamboonlers A, Payungporn S, Chirathaworn C, Poovorawan Y (2017): Hepatitis E Virus in Pork and Variety Meats Sold in Fresh Markets. *Food Environ Virol*, 9: 45-53. doi: 10.1007/s12560-016-9258-0

Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeu S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guérin J L (2012): Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis*, 18: 1274-1281.  
doi: 10.3201/eid1808.120057

Jameel S (1999): Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med*, 1: 1-16. doi: 10.1017/s1462399499001271

- Johne R, Reetz J, Ulrich R G, Machnowska P, Sachsenröder J, Nickel P, Hofmann J (2014): An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J Viral Hepat*, 21: 447-456. doi: 10.1111/jvh.12157
- Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J (2016): Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Appl Environ Microbiol*, 82: 4225-4231. doi: 10.1128/aem.00951-16
- Jori F, Laval M, Maestrini O, Casabianca F, Charrier F, Pavio N (2016): Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. *Viruses*, 8: 236. doi: 10.3390/v8080236
- Josefsen M H, Lofstrom C, Hansen T B, Christensen L S, Olsen J E, Hoorfar J (2010): Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol*, 76: 5097-5104. doi: 10.1128/aem.00411-10
- Jothikumar N, Cromeans T L, Robertson B H, Meng X J, Hill V R (2006): A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*, 131: 65-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.07.004
- Kabrane-Lazizi Y, Meng X J, Purcell R H, Emerson S U (1999): Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol*, 73: 8848-8850. doi: 10.1128/JVI.73.10.8848-8850.1999
- Kamar N, Garrouste C, Haagsma E B, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguier E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton H R, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso A M, Izopet J, Rostaing L (2011): Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*, 140: 1481-1489. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.050

- Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, Radenne S, Coilly A, Garrigue V, D'Alteroche L, Buchler M, Couzi L, Lebray P, Dharancy S, Minello A, Hourmant M, Roque-Afonso A M, Abravanel F, Pol S, Rostaing L, Mallet V (2014): Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med*, 370: 1111-1120. doi: 10.1056/NEJMoa1215246
- Kamar N, Mansuy J M, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, Otal P, Esposito L, Durand D, Izopet J, Rostaing L (2008a): Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant*, 8: 1744-1748. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02286.x
- Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Mansuy J M, Selves J, Peron J M, Otal P, Muscari F, Izopet J (2010): Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*, 50: e30-33. doi: 10.1086/650488
- Kamar N, Selves J, Mansuy J M, Ouezzani L, Peron J M, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel J P, Izopet J, Rostaing L (2008b): Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 358: 811-817. doi: 10.1056/NEJMoa0706992
- Kanai Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K (2010): Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J Med Virol*, 82: 69-76. doi: 10.1002/jmv.21647
- 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. doi: 10.1128/jcm.42.11.5047-5052.2004
- Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling K E, Kovari H, Kaiser L, Evison J M, Elzi L, Gurter-De La Fuente V, Jost J, Moradpour D, Abravanel F, Izopet J, Cavassini M (2011): Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 17: 1074-1078. doi: 10.3201/eid1706.101067
- Kenney S P (2019): The Current Host Range of Hepatitis E Viruses. *Viruses*, 11: 452. doi: 10.3390/v11050452

- Khuroo M S (2011): Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res*, 161: 3-14. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.007
- Khuroo M S, Kamili S, Jameel S (1995): Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*, 345: 1025-1026. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90761-0
- Khuroo M S, Kamili S, Khuroo M S (2009): Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat*, 16: 519-523. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01101.x
- Khuroo M S, Khuroo M S (2016): Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. *J Viral Hepat*, 23: 68-79. doi: 10.1111/jvh.12445
- Khuroo M S, Khuroo M S, Khuroo N S (2016): Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol*, 22: 7030-7045. doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7030
- Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Bouwknecht M, Rutjes S, Willems K, Moloney R, de Roda Husman A M, Kaupke A, Legaki E, D'Agostino M, Cook N, Rzezutka A, Petrovic T, Vantarakis A (2012): Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol*, 4: 179-191. doi: 10.1007/s12560-012-9087-8
- Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Soderberg K, Vasickova P, Bouwknecht M, Rutjes S, Willems K, Moloney R, de Roda Husman A M, Kaupke A, Legaki E, D'Agostino M, Cook N, von Bonsdorff C H, Rzezutka A, Petrovic T, Maunula L, Pavlik I, Vantarakis A (2017): Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food Environ Virol*, 9: 72-78. doi: 10.1007/s12560-016-9264-2
- Koning L, Pas S D, de Man R A, Balk A H, de Knecht R J, ten Kate F J, Osterhaus A D, van der Eijk A A (2013): Clinical implications of chronic hepatitis E virus infection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 32: 78-85. doi: 10.1016/j.healun.2012.10.008
- Krog J S, Larsen L E, Breum S Ø (2019): Tracing Hepatitis E Virus in Pigs From Birth to Slaughter. *Front Vet Sci*, 6: 50. doi: 10.3389/fvets.2019.00050

- Krumbholz A, Mohn U, Lange J, Motz M, Wenzel J J, Jilg W, Walther M, Straube E, Wutzler P, Zell R (2012): Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med Microbiol Immunol*, 201: 239-244.  
doi: 10.1007/s00430-011-0210-5
- Kulkarni M A, Arankalle V A (2008): The detection and characterization of hepatitis E virus in pig livers from retail markets of India. *J Med Virol*, 80: 1387-1390.  
doi: 10.1002/jmv.21220
- Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma J B, Murthy N S (2004): Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, 85: 240-244. doi: 10.1016/j.ijgo.2003.11.018
- Lee G H, Tan B H, Teo E C, Lim S G, Dan Y Y, Wee A, Aw P P, Zhu Y, Hibberd M L, Tan C K, Purdy M A, Teo C G (2016): Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150: 355-357.e353. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048
- Lewis H C, Wichmann O, Duizer E (2010): Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect*, 138: 145-166. doi: 10.1017/s0950268809990847
- Lhomme S, Gallian P, Dimeglio C, Assal A, Abravanel F, Tiberghien P, Izopet J (2019): Viral load and clinical manifestations of hepatitis E virus genotype 3 infections. *J Viral Hepat*, 26: 1139-1142. doi: 10.1111/jvh.13128
- Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J (2016): Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 8: 212. doi: 10.3390/v8080212
- Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N (2020): Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *J Clin Med*, 9: 331.  
doi: 10.3390/jcm9020331
- Li H, Wu J, Sheng Y, Lu Q, Liu B, Chen Y, Sun Y, Zhou E M, Zhao Q (2019): Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in various pig farms from Shaanxi Province, China: First detection of HEV RNA in pig semen. *Transbound Emerg Dis*, 66: 72-82.  
doi: 10.1111/tbed.12966



- Li S W, Zhang J, He Z Q, Gu Y, Liu R S, Lin J, Chen Y X, Ng M H, Xia N S (2005a): Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem*, 280: 3400-3406. doi: 10.1074/jbc.M410361200
- Li S W, Zhang J, Li Y M, Ou S H, Huang G Y, He Z Q, Ge S X, Xian Y L, Pang S Q, Ng M H, Xia N S (2005b): A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*, 23: 2893-2901. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.11.064
- Liu Z, Behloul N, Baha S, Wei W, Shi R, Meng J (2019): Design and immunogenicity analysis of the combined vaccine against zoonotic hepatitis E and foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 37: 6922-6930. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.09.036
- Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, Huang F (2017): High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol*, 89: 1981-1987. doi: 10.1002/jmv.24843
- Lopez-Lopez P, Rivalde M L A, Frias M, Garcia-Bocanegra I, Brieva T, Caballero-Gomez J, Camacho A, Fernandez-Molera V, Machuca I, Gomez-Villamandos J C, Rivero A, Rivero-Juarez A (2018): Risk factors associated with hepatitis E virus in pigs from different production systems. *Vet Microbiol*, 224: 88-92. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.08.020
- Loreck K, Mitrenga S, Heinze R, Ehricht R, Engemann C, Lueken C, Ploetz M, Greiner M, Meemken D (2020): Use of meat juice and blood serum with a miniaturised protein microarray assay to develop a multi-parameter IgG screening test with high sample throughput potential for slaughtering pigs. *BMC Vet Res*, 16: 106. doi: 10.1186/s12917-020-02308-4
- Lu L, Li C, Hagedorn C H (2006): Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*, 16: 5-36. doi: 10.1002/rmv.482
- Ma H, Song X, Li Z, Harrison T J, Zhang H, Huang W, Hao W, Kong W, Wang Y (2009): Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J Med Virol*, 81: 1052-1061. doi: 10.1002/jmv.21484

- Manka P, Bechmann L P, Coombes J D, Thodou V, Schlattjan M, Kahraman A, Syn W K, Saner F, Gerken G, Baba H, Verheyen J, Timm J, Canbay A (2015): Hepatitis E Virus Infection as a Possible Cause of Acute Liver Failure in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13: 1836-1842. doi: 10.1016/j.cgh.2015.04.014
- Mansuy J M, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, Morel P, Legrand D, Tiberghien P, Izopet J (2016): A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*, 63: 1145-1154. doi: 10.1002/hep.28436
- Mansuy J M, Peron J M, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel J P, Izopet J (2004): Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*, 74: 419-424. doi: 10.1002/jmv.20206
- Marion O, Lhomme S, Nayrac M, Dubois M, Pucelle M, Requena M, Miguères M, Abravanel F, Peron J M, Carrere N, Suc B, Delobel P, Kamar N, Izopet J (2020): Hepatitis E virus replication in human intestinal cells. *Gut*, 69: 901-910. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319004
- Maunula L, Kaupke A, Vasickova P, Soderberg K, Kozyra I, Lazic S, van der Poel W H, Bouwknegt M, Rutjes S, Willems K A, Moloney R, D'Agostino M, de Roda Husman A M, von Bonsdorff C H, Rzezutka A, Pavlik I, Petrovic T, Cook N (2013): Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol*, 167: 177-185. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003
- Meemken D, Blaha T (2011): "Meat juice Multi-Serology"- A tool for the continuous improvement of herd health and food safety in framework of risk-based meat inspection of slaughter pigs. *J Food Saf Food Qual*, 62: 192-199. doi: 10.2376/0003-925X-62-192
- Meemken D, Tangemann A H, Meermeier D, Gundlach S, Mischok D, Greiner M, Klein G, Blaha T (2014): Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". *Prev Vet Med*, 113: 589-598. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.12.006
- Meng X J (2010): Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*, 140: 256-265. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.017

- Meng X J, Halbur P G, Haynes J S, Tsareva T S, Bruna J D, Royer R L, Purcell R H, Emerson S U (1998): Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol*, 143: 1405-1415.  
doi: 10.1007/s007050050384
- 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. doi: 10.1073/pnas.94.18.9860.
- Merchante N, Parra-Sánchez M, Rivero-Juárez A, Cifuentes C, Camacho Á, Macías J, Martínez-Dueñas L, Pérez-Navarro E, Rivero A, Pineda J A (2015): High prevalence of antibodies against hepatitis E virus in HIV-infected patients with unexplained liver disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33: 532-535. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.018
- Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U (2012): Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 125: 52–59.  
doi: 10.2376/0005-9366-125-52
- Mesquita J R, Oliveira D, Rivadulla E, Abreu-Silva J, Varela M F, Romalde J L, Nascimento M S (2016): Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol*, 58: 13-15. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.009
- Miller M J (1995): Viral taxonomy. *Clin Infect Dis*, 21: 279-280. doi: 10.1093/clinids/21.2.279
- Milojević L, Velebit B, Teodorović V, Kirbiš A, Petrović T, Karabasil N, Dimitrijević M (2019): Screening and Molecular Characterization of Hepatitis E Virus in Slaughter Pigs in Serbia. *Food Environ Virol*, 11: 410-419. doi: 10.1007/s12560-019-09393-1
- Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H (2005): Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol*, 76: 341-349.  
doi: 10.1002/jmv.20364
- Mokhtari C, Marchadier E, Haim-Boukobza S, Jebblaoui A, Tesse S, Savary J, Roque-Afonso A M (2013): Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol*, 58: 36-40. doi: 10.1016/j.jcv.2013.06.038

- Molina R M, Chittick W, Nelson E A, Christopher-Hennings J, Rowland 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. doi: 10.1177/104063870802000604
- Monne I, Ceglie L, DI Martino G, Natale A, Zamprognà S, Morreale A, Rampazzo E, Cattoli G, Bonfanti L (2015): Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiol Infect*, 143: 529-533. doi: 10.1017/s0950268814001150
- Montagnaro S, De Martinis C, Sasso S, Ciarcia R, Damiano S, Auletta L, Iovane V, Zottola T, Pagnini U (2015): Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. *J Comp Pathol*, 153: 1-8. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.04.006
- Montalvo Villalba M C, Cruz Martínez D, Ahmad I, Rodriguez Lay L A, Bello Corredor M, Guevara March C, Martínez L S, Martínez-Campo L S, Jameel S (2017): Hepatitis E virus in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis Aquat Organ*, 123: 13-18. doi: 10.3354/dao03085
- Montone A M I, De Sabato L, Suffredini E, Alise M, Zaccherini A, Volzone P, Di Maro O, Neola B, Capuano F, Di Bartolo I (2019): Occurrence of HEV-RNA in Italian Regional Pork and Wild Boar Food Products. *Food Environ Virol*, 11: 420-426. doi: 10.1007/s12560-019-09403-2
- Moor D, Liniger M, Baumgartner A, Felleisen R (2018): Screening of Ready-to-Eat Meat Products for Hepatitis E Virus in Switzerland. *Food Environ Virol*, 10: 263-271. doi: 10.1007/s12560-018-9340-x
- Mughini-Gras L, Angeloni G, Salata C, Vonesch N, D'Amico W, Campagna G, Natale A, Zuliani F, Ceglie L, Monne I, Vascellari M, Capello K, DI Martino G, Inglese N, Palu G, Tomao P, Bonfanti L (2017): Hepatitis E virus infection in North Italy: high seroprevalence in swine herds and increased risk for swine workers. *Epidemiol Infect*, 145: 3375-3384. doi: 10.1017/s0950268817002485

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51: 263-273. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032
- Mushahwar I K (2008): Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*, 80: 646-658.  
doi: 10.1002/jmv.21116
- Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S (2006): Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res*, 34: 137-140.  
doi: 10.1016/j.hepres.2005.10.010
- Nan Y, Wu C, Zhao Q, Sun Y, Zhang Y J, Zhou E M (2018): Vaccine Development against Zoonotic Hepatitis E Virus: Open Questions and Remaining Challenges. *Front Microbiol*, 9: 266. doi: 10.3389/fmicb.2018.00266
- Nidaira M, Takahashi K, Ogura G, Taira K, Okano S, Kudaka J, Itokazu K, Mishiro S, Nakamura M (2012): Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J Vet Med Sci*, 74: 1665-1668. doi: 10.1292/jvms.11-0520
- 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. doi: 10.1177/104063879801000207
- Nobmann J, Blaha T, Beyerbach M, Kreienbrock L, Meemken D (2011): Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse des serologischen Nachweises von *Salmonella*-Antikörpern bei Schlachtschweinen in Blutserum und Fleischsaft aus verschiedenen Muskelpartien. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 7: 313-319. doi: 10.2376/0005-9366-124-313
- Nowak B, von Müffling T, Chaunchom S, Hartung J (2007): *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: a field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. *Int J Food Microbiol*, 115: 259-267. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.045
- Okamoto H (2007): Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res*, 127: 216-228. doi: 10.1016/j.virusres.2007.02.002

- Okamoto H (2011): Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res*, 161: 65-77.  
doi: 10.1016/j.virusres.2011.01.015
- Pallerla S R, Schembecker S, Meyer C G, Linh L T K, Johne R, Wedemeyer H, Bock C T, Kremsner P G, Velavan T P (2020): Hepatitis E virus genome detection in commercial pork livers and pork meat products in Germany. *J Viral Hepat*, 28: 196-204.  
doi: 10.1111/jvh.13396
- Panda S K, Thakral D, Rehman S (2007): Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, 17: 151-180.  
doi: 10.1002/rmv.522
- Park H K, Jeong S H, Kim J W, Woo B H, Lee D H, Kim H Y, Ahn S (2012): Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC Infect Dis*, 12: 142. doi: 10.1186/1471-2334-12-142
- Patra S, Kumar A, Trivedi S S, Puri M, Sarin S K (2007): Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med*, 147: 28-33.  
doi: 10.7326/0003-4819-147-1-200707030-00005
- Pavio N, Laval M, Maestrini O, Casabianca F, Charrier F, Jori F (2016): Possible Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus from Domestic Pigs and Wild Boars from Corsica. *Emerg Infect Dis*, 22: 2197-2199. doi: 10.3201/eid2212.160612
- Pavio N, Meng X J, Doceul V (2015): Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol*, 10: 34-41. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.006
- Pavio N, Meng X J, Renou C (2010): Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*, 41: 46. doi: 10.1051/vetres/2010018
- Pavio N, Merbah T, Thébault A (2014): Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis*, 20: 1925-1927.  
doi: 10.3201/eid2011.140891
- Pérez-Gracia M T, García M, Suay B, Mateos-Lindemann M L (2015): Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol*, 3: 117-126. doi: 10.14218/jcth.2015.00009

- Péron J M, Bureau C, Poirson H, Mansuy J M, Alric L, Selves J, Dupuis E, Izopet J, Vinel J P (2007): Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat*, 14: 298-303. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00858.x
- Pezzoni G, Caminiti A, Stercoli L, Grazioli S, Galletti G, Santi A, Tamba M, Brocchi E (2014): Comparison of three in-house ELISAs for the detection of hepatitis E virus infection in pigs under field conditions. *J Virol Methods*, 207: 95-103. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.06.025
- Pischke S, Behrendt P, Bock C T, Jilg W, Manns M P, Wedemeyer H (2014): Hepatitis E in Germany - an under-reported infectious disease. *Dtsch Arztebl Int*, 111: 577-583. doi: 10.3238/arztebl.2014.0577
- Pischke S, Suneetha P V, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, Schlue J, Strassburg C P, Lehner F, Raupach R, Bremer B, Magerstedt P, Cornberg M, Seehusen F, Baumgaertner W, Klempnauer J, Izopet J, Manns M P, Grummer B, Wedemeyer H (2010): Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl*, 16: 74-82. doi: 10.1002/lt.21958
- Ponterio E, Di Bartolo I, Orrù G, Liciardi M, Ostanello F, Ruggeri F M (2014): Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. *BMC Vet Res*, 10: 133. doi: 10.1186/1746-6148-10-133
- Prpic J, Cerni S, Skoric D, Keros T, Brnic D, Cvetnic Z, Jemersic L (2015): Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol*, 7: 195-205. doi: 10.1007/s12560-015-9193-5
- Purcell R H, Ticehurst J R (1988): Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. In: *Viral hepatitis and liver disease / Hrsg.: Zuckerman A J*, 1st edition, S. 131-137. New York: Alan R. Liss, Inc. - ISBN: 978-0845142479.
- Purdy M A, McCaustland K A, Krawczynski K, Spelbring J, Reyes G R, Bradley D W (1993a): Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol*, 41: 90-94. doi: 10.1002/jmv.1890410118

- Purdy M A, Tam A W, Huang C-C, Yarbough P O, Reyes G R (1993b): Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the 'alpha-like' RNA virus supergroup? *Semin Virol*, 4: 319-326. doi: 10.1006/smvv.1993.1029
- Purpari G, Macaluso G, Di Bella S, Gucciardi F, Mira F, Di Marco P, Lastra A, Petersen E, La Rosa G, Guercio A (2019): Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *Int J Infect Dis*, 80: 66-72. doi: 10.1016/j.ijid.2018.12.011
- QS (QS Qualität und Sicherheit GmbH) (2021): Leitfaden Salmonellenmonitoring Schwein (Version 01.01.2021). Abgerufen am: 18. Januar 2021 um 12:15 Uhr über folgende URL: [https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/4\\_leitfaeden/monitoringprogramme/salmonellenmonitoring\\_schwein/2021/Leitfaden\\_Salmonellenmonitoring\\_Schwein\\_01.01.2021.pdf](https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/4_leitfaeden/monitoringprogramme/salmonellenmonitoring_schwein/2021/Leitfaden_Salmonellenmonitoring_Schwein_01.01.2021.pdf)
- Rasche A, Sander A L, Corman V M, Drexler J F (2019): Evolutionary biology of human hepatitis viruses. *J Hepatol*, 70: 501-520. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.010
- Raspor Lainscek P, Toplak I, Kirbis A (2017): A comprehensive study of hepatitis E virus infection in pigs entering a slaughterhouse in Slovenia. *Vet Microbiol*, 212: 52-58. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.002
- Reuter G, Fodor D, Forgach P, Katai A, Szucs G (2009): Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol*, 44: 277-281. doi: 10.1016/j.jcv.2009.01.008
- 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. doi: 10.1126/science.2107574
- Rivadulla E, Varela M F, Mesquita J R, Nascimento M S J, Romalde J L (2019): Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish Harvesting Areas from Galicia (Northwestern Spain). *Viruses*, 11: 618. doi: 10.3390/v11070618



- Rivero-Juarez A, Frias M, Martinez-Peinado A, Rivalde M A, Rodriguez-Cano D, Camacho A, García-Bocanegra I, Cuenca-Lopez F, Gomez-Villamandos J C, Rivero A (2017): Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption. *Zoonoses Public Health*, 64: 561-565. doi: 10.1111/zph.12343
- Rivero-Juarez A, Vallejo N, Lopez-Lopez P, Díaz-Mareque A I, Frias M, Vallejo A, Caballero-Gómez J, Rodríguez-Velasco M, Molina E, Aguilera A (2020): Ribavirin as a First Treatment Approach for Hepatitis E Virus Infection in Transplant Recipient Patients. *Microorganisms*, 8: 51. doi: 10.3390/microorganisms8010051
- RKI (Robert Koch-Institut) (2011): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010. Abgerufen am: 13. Mai 2021 um 9:20 Uhr über folgende URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2010.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2010.pdf?__blob=publicationFile)
- RKI (Robert Koch-Institut) (2021): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. Abgerufen am: 04. November 2021 um 16:30 Uhr über folgende URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2020.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile)
- Rose N, Boutrouille A, Fablet C, Madec F, Eloit M, Pavo N (2010): The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *J Virol Methods*, 163: 329-335. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.10.019
- Rutjes S A, Bouwknegt M, van der Giessen J W, de Roda Husman A M, Reusken C B (2014): Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in The Netherlands. *J Food Prot*, 77: 640-642. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-13-302
- Rutjes S A, Lodder W J, Bouwknegt M, de Roda Husman A M (2007): Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods*, 143: 112-116. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.030
- Saad M D, Hussein H A, Bashandy M M, Kamel H H, Earhart K C, Fryauff D J, Younan M, Mohamed A H (2007): Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol*, 7: 368-373. doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.007

- Said B, Ijaz S, Chand M A, Kafatos G, Tedder R, Morgan D (2014): Hepatitis E virus in England and Wales: indigenous infection is associated with the consumption of processed pork products. *Epidemiol Infect*, 142: 1467-1475. doi: 10.1017/s0950268813002318
- Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
- Salines M, Andraud M, Rose N (2017): From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res*, 48: 31. doi: 10.1186/s13567-017-0436-3
- Salines M, Demange A, Stéphant G, Renson P, Bourry O, Andraud M, Rose N, Pavio N (2019): Persistent viremia and presence of hepatitis E virus RNA in pig muscle meat after experimental co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Int J Food Microbiol*, 292: 144-149. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.023
- Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H (2011): A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol*, 156: 1345-1358. doi: 10.1007/s00705-011-0988-x
- Schemmerer M, Johne R, Erl M, Jilg W, Wenzel J J (2019): Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System. *Viruses*, 11: 483. doi: 10.3390/v11060483
- Schielke A, Filter M, Appel B, Johne R (2011): Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J*, 8: 487. doi: 10.1186/1743-422x-8-487
- Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, Faber M, Schrader C, Dremsek P, Ulrich R G, Johne R (2015): Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*, 15: 440. doi: 10.1186/s12879-015-1199-y

Schlachthof in Nordwestdeutschland (2018). Persönliche Kommunikation. 28. Mai 2018 um 11:00 Uhr

Schlauder G G, Desai S M, Zanetti A R, Tassopoulos N C, Mushahwar I K (1999): Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*, 57: 243-251. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199903)57:3<243::aid-jmv6>3.0.co;2-r

Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger D H, Berg T, Hofmann J (2012): Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol*, 56: 500-502. doi: 10.1016/j.jhep.2011.06.021

Schlosser J, Vina-Rodriguez A, Fast C, Groschup M H, Eiden M (2015): Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. *Vet Microbiol*, 180: 15-21. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.022

Sharma S, Kumar A, Kar P, Agarwal S, Ramji S, Husain S A, Prasad S, Sharma S (2017): Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*, 24: 1067-1075. doi: 10.1111/jvh.12730

Shukla P, Nguyen H T, Torian U, Engle R E, Faulk K, Dalton H R, Bendall R P, Keane F E, Purcell R H, Emerson S U (2011): Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 2438-2443. doi: 10.1073/pnas.1018878108

Smith D B, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho E F, Ulrich R G, Johne R, Koenig M, Jameel S, Harrison T J, Meng X J, Okamoto H, Van der Poel W H M, Purdy M A (2016): Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*, 97: 537-542. doi: 10.1099/jgv.0.000393

Smith D B, Simmonds P, Jameel S, Emerson S U, Harrison T J, Meng X J, Okamoto H, Van der Poel W H, Purdy M A (2014): Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*, 95: 2223-2232. doi: 10.1099/vir.0.068429-0

- Somani S K, Aggarwal R, Naik S R, Srivastava S, Naik S (2003): A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*, 10: 446-449. doi: 10.1046/j.1365-2893.2003.00458.x
- Son N R, Seo D J, Lee M H, Seo S, Wang X, Lee B H, Lee J S, Joo I S, Hwang I G, Choi C (2014): Optimization of the elution buffer and concentration method for detecting hepatitis E virus in swine liver using a nested reverse transcription-polymerase chain reaction and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 206: 99-104. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.05.026
- Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H (2004): Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol*, 42: 5371-5374. doi: 10.1128/jcm.42.11.5371-5374.2004
- Spada E, Pupella S, Pisani G, Bruni R, Chionne P, Madonna E, Villano U, Simeoni M, Fabi S, Marano G, Marcantonio C, Pezzotti P, Ciccaglione A R, Liunbruno G M (2018): A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus*, 16: 413-421. doi: 10.2450/2018.0033-18
- Stevens O, Claeys K G, Poesen K, Saegeman V, Van Damme P (2017): Diagnostic Challenges and Clinical Characteristics of Hepatitis E Virus-Associated Guillain-Barré Syndrome. *JAMA Neurol*, 74: 26-33. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3541
- Szabo K, Trojnar E, Anheyer-Behmenburg H, Binder A, Schotte U, Ellerbroek L, Klein G, Johne R (2015): Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int J Food Microbiol*, 215: 149-156. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013
- Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H (2012): A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol*, 157: 235-246. doi: 10.1007/s00705-011-1153-2

- Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S (2004): Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*, 330: 501-505. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.006
- Takahashi M, Okamoto H (2014): Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res*, 44: 43-58. doi: 10.1111/hepr.12175
- Takova K, Koynarski T, Minkov G, Toneva V, Mardanova E, Ravin N, Lukov G L, Zahmanova G (2021): Development and Optimization of an Enzyme Immunoassay to Detect Serum Antibodies against the Hepatitis E Virus in Pigs, Using Plant-Derived ORF2 Recombinant Protein. *Vaccines*, 9: 991. doi: 10.3390/vaccines9090991
- Tam A W, Smith M M, Guerra M E, Huang C C, Bradley D W, Fry K E, Reyes G R (1991): Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185: 120-131. doi: 10.1016/0042-6822(91)90760-9
- Taus K, Schmoll F, El-Khatib Z, Auer H, Holzmann H, Aberle S, Pekard-Amenitsch S, Monschein S, Sattler T, Steinparzer R, Allerberger F, Schmid D (2019): Occupational swine exposure and Hepatitis E virus, *Leptospira*, *Ascaris suum* seropositivity and MRSA colonization in Austrian veterinarians, 2017-2018-A cross-sectional study. *Zoonoses Public Health*, 66: 842-851. doi: 10.1111/zph.12633
- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003): Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362: 371-373. doi: 10.1016/s0140-6736(03)14025-1
- Teixeira J, Mesquita J R, Pereira S S, Oliveira R M, Abreu-Silva J, Rodrigues A, Myrmel M, Stene-Johansen K, Øverbø J, Gonçalves G, Nascimento M S (2017): Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Med Microbiol Immunol*, 206: 77-81. doi: 10.1007/s00430-016-0484-8
- ThermoFisher Scientific Inc. (2018): Gebrauchsinformation PrioCHECK™ Porcine HEV Ab-Kit. Abgerufen am: 26. Juli 2018 um 10:00 Uhr über folgende URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013799\\_4600010\\_UG\\_de.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013799_4600010_UG_de.pdf)

- Thiry D, Mauroy A, Saegerman C, Licoppe A, Fett T, Thomas I, Brochier B, Thiry E, Linden A (2017): Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transbound Emerg Dis*, 64: 764-773. doi: 10.1111/tbed.12435
- Treagus S, Wright C, Baker-Austin C, Longdon B, Lowther J (2021): The Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus to Humans. *Food Environ Virol*, 13: 127-145. doi: 10.1007/s12560-021-09461-5
- Tripathy A S, Sharma M, Deoshatwar A R, Babar P, Bharadwaj R, Bharti O K (2019): Study of a hepatitis E virus outbreak involving drinking water and sewage contamination in Shimla, India, 2015-2016. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 113: 789-796. doi: 10.1093/trstmh/trz072
- van den Berg B, van der Eijk A A, Pas S D, Hunter J G, Madden R G, Tio-Gillen A P, Dalton H R, Jacobs B C (2014): Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology*, 82: 491-497. doi: 10.1212/wnl.0000000000000111
- van der Poel W H, Verschoor F, van der Heide R, Herrera M I, Vivo A, Kooreman M, de Roda Husman A M (2001): Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 7: 970-976. doi: 10.3201/eid0706.010608
- van der Poel W H M, Dalton H R, Johne R, Pavio N, Bouwknegt M, Wu T, Cook N, Meng X J (2018): Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection. *Transbound Emerg Dis*, 00: 1-8. doi: 10.1111/tbed.12760
- Viswanathan R (1957): Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study-epidemiology. 1957. *Natl Med J India*, 26: 362-377.
- Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, Martlbauer E (2012): Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis*, 9: 655-660. doi: 10.1089/fpd.2012.1141

- Walachowski S, Dorenlor V, Lefevre J, Lunazzi A, Eono F, Merbah T, Eveno E, Pavio N, Rose N (2014): Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect*, 142: 1934-1944. doi: 10.1017/s0950268813003063
- Wedemeyer H, Pischke S, Manns M P (2012): Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*, 142: 1388-1397. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.014
- Wenzel J J, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W (2011): Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*, 52: 50-54. doi: 10.1016/j.jcv.2011.06.006
- WHO (Weltgesundheitsorganisation) (2010): The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review. Abgerufen am: 11. Oktober 2020 um 20:45 Uhr über folgende URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70513>
- WHO (Weltgesundheitsorganisation) (2015a): Hepatitis E vaccine : WHO position paper, May 2015. *Wkly Epidemiol Rec*, 90: 185-200. doi: 10665/242352
- WHO (Weltgesundheitsorganisation) (2015b): WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015. Abgerufen am: 09. November 2021 um 13:00 Uhr über folgende URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1)
- WHO (Weltgesundheitsorganisation) (2019): Five Keys to Safer Food. Abgerufen am: 09. November 2021 um 12:15 Uhr über folgende URL: <https://www.who.int/activities/promoting-safe-food-handling>
- WHO (Weltgesundheitsorganisation) (2021): Hepatitis E Key facts. Abgerufen am: 04. November 2021 um 17:00 Uhr über folgende URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>

- Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl D L, Friendship R, Rajic A, Houde A, McEwen S (2016): Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *Can J Vet Res*, 80: 95-105.
- Wilhelm B J, Leblanc D, Avery B, Pearl D L, Houde A, Rajic A, McEwen S A (2016): Factors Affecting Detection of Hepatitis E Virus on Canadian Retail Pork Chops and Pork Livers Assayed Using Real-Time RT-PCR. *Zoonoses Public Health*, 63: 152-159.  
doi: 10.1111/zph.12216
- 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. doi: 10.1128/jcm.39.9.3040-3046.2001
- 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 aetiology. *Lancet*, 2: 876-879. doi: 10.1016/s0140-6736(80)92045-0
- Woo P C, Lau S K, Teng J L, Cao K Y, Wernery U, Schountz T, Chiu T H, Tsang A K, Wong P C, Wong E Y, Yuen K Y (2016): New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis*, 22: 2219-2221. doi: 10.3201/eid2212.160979
- Wu J C, Chen C M, Chiang T Y, Sheen I J, Chen J Y, Tsai W H, Huang Y H, Lee S D (2000): Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol*, 60: 166-171. doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(200002)60:2<166::AID-JMV10>3.0.CO;2-8
- Wu X, Dao Thi V L, Liu P, Takacs C N, Xiang K, Andrus L, Gouttenoire J, Moradpour D, Rice C M (2018): Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication in Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. *Gastroenterology*, 154: 663-674.  
doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.041
- Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammar L, Cheng R H (1999): Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology*, 265: 35-45. doi: 10.1006/viro.1999.0005



Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng R H, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li T C, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y (2009): Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 12986-12991. doi: 10.1073/pnas.0903699106

Zhang J, Zhang X F, Huang S J, Wu T, Hu Y M, Wang Z Z, Wang H, Jiang H M, Wang Y J, Yan Q, Guo M, Liu X H, Li J X, Yang C L, Tang Q, Jiang R J, Pan H R, Li Y M, Shih J W, Ng M H, Zhu F C, Xia N S (2015): Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*, 372: 914-922. doi: 10.1056/NEJMoa1406011

Zhao Z Y, Ruan B, Shao H, Chen Z J, Liu S L (2007): Detection of hepatitis E virus RNA in sera of patients with hepatitis E by polymerase chain reaction. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 6: 38-42.

Zhu F C, Zhang J, Zhang X F, Zhou C, Wang Z Z, Huang S J, Wang H, Yang C L, Jiang H M, Cai J P, Wang Y J, Ai X, Hu Y M, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian Y L, Wu T, Li Y M, Miao J, Ng M H, Shih J W, Xia N S (2010): Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 376: 895-902. doi: 10.1016/s0140-6736(10)61030-6



## PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Publikationen mit Peer-Review-Verfahren

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2020)

#### **High Predictive Power of Meat Juice Serology on the Presence of Hepatitis E Virus in Slaughter Pigs**

Journal of Foodborne Pathogens and Diseases 17 (11): 687-692

DOI: 10.1089/fpd.2020.2797

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2021)

#### **Hepatitis E virus cross-contamination on the surface of porcine livers after storage in Euro meat containers in a German pig abattoir**

Journal of Consumer Protection and Food Safety 17: 33-39

DOI: 10.1007/s00003-021-01357-7

## Vorträge

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2019)

### **Hepatitis E – Vorkommen beim Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung zur Risikoabschätzung von Rohfleischerzeugnissen.**

*19. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene*

05.03.2019 - 06.03.2019, Berlin

In: 19. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene, Abstracts – Bundesinstitut für Risikobewertung (Hrsg.)

Berlin: BfR Abstracts, S. 23–24

ISBN: 978-3-00-061932-8

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2019)

### **Hepatitis E - analyzing the occurrence in slaughter pigs for a risk assessment of raw meat products.**

*13th SafePork 2019. One Health - Tear down interdisciplinary walls*

26.08.2019 - 29.08.2019, Berlin

In: 13th SafePork 2019: One Health - Tear down interdisciplinary walls

Proceedings SafePork-Conference (Hrsg.)

Berlin: MCI Deutschland GmbH, S. 105–106

ISBN: 978-3-00-063507-6

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2019)

### **Wie zielführend sind serologische Untersuchungen beim Mastschwein zur Abschätzung des Eintragsrisikos von Hepatitis E-Viren in die Lebensmittelkette?**

*60. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz*

24.09.2019 - 27.09.2019, Garmisch-Partenkirchen

In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz. 24.-27. September 2019 in Garmisch-Partenkirchen

Verlag der DVG Service GmbH, Gießen; 60, S. 193–194

ISBN: 978-3-86345-492-0

**Poster**

Janine Dzierzon und Diana Meemken (2018)

**From farm to fork: Hepatitis E virus in fattening pigs - a food safety risk in Europe?**

*11. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences"*

*Fu Berlin*

21.09.2018, Berlin

In: 11. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences",  
Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 21. September 2018, Programm &  
Abstracts

Berlin: Mensch und Buch Verlag, S. 39

ISBN: 978-3-86387-929-7

*- Auszeichnung mit dem 3. Platz für das beste wissenschaftliche Poster -*

Janine Dzierzon, Nina Langkabel und Diana Meemken (2018)

**Das zoonotische Potential des Hepatitis E-Virus beim Schwein in Europa.**

*59. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen  
Veterinärmedizinischen Gesellschaft*

25.09.2018 - 28.09.2018, Garmisch-Partenkirchen

In: Programm- und Abstract-Band / DVG: 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes  
Lebensmittelhygiene; Dreiländertagung; 59 (Sonderausgabe), S. 183–184

Janine Dzierzon, Verena Oswaldi, Roswitha Merle, Nina Langkabel und  
Diana Meemken (2019)

**Serological tests on fattening pigs as a tool for the risk assessment of Hepatitis E  
virus entering the food chain?**

*Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research*

16.10.2019 - 18.10.2019, Berlin

In: Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research: Book of Abstracts –  
International Symposium on Zoonoses Research (Hrsg.)

Berlin, S. 115

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es mir ein großes Anliegen nachstehenden Personen meinen besonderen Dank entgegenzubringen, die mit ihrer Unterstützung zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich Frau *Prof. Dr. Diana Meemken* herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen und die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung dieses interessanten und aktuellen Themas danken. Vielen Dank für die zahlreichen Gespräche sowohl auf wissenschaftlicher als auch auf persönlicher Ebene, durch die ich stets Motivation und Ermutigung gewinnen konnte. Unsere Zusammenarbeit war mir immer eine große Freude.

Mein besonderer Dank gilt Frau *Dr. Nina Langkabel* und Frau *PD Dr. Roswitha Merle* für die wissenschaftliche Unterstützung in der Phase der Studienplanung sowie bei der Ergebnisauswertung und bei der Anfertigung der beiden Manuskripte.

Außerdem danke ich Frau *Dr. Eva Trojnar*, Frau *Dr. Nadine Althof* sowie Herrn *Prof. Dr. Reimar Johne* für die Einführung in die HEV-PCR und die fachliche Unterstützung bei der Probenbearbeitung.

Für die Bereitstellung des QIAcubes möchte ich herzlich Frau *Dr. Dörte Lüscho* danken, ohne die eine zügige Abwicklung der Probenbearbeitung nicht möglich gewesen wäre.

Frau *Mag. Verena Oswaldi* danke ich von Herzen für die Freude und die großartige Unterstützung bei der Probenahme. Die Zeit als Doktorandin ist durch Dich zu einem unvergesslichen Erlebnis geworden.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen des Teams der Arbeitsgruppe Fleischhygiene für den Spaß und die immer gute Stimmung bei der Arbeit sowie für die gemeinsamen Mittagessen, die jedes Mal ein kulinarischer Hochgenuss waren. Ein großer Dank gilt Frau *Lieselotte Bräutigam*, deren Wissen und unermüdliche Geduld zu der Entstehung der Laborergebnisse beigetragen haben.

In tiefer Verbundenheit dankbar bin ich meinen Brüdern *Philipp, Marc* und *Alexander*. Das Band, welches uns zusammenhält, gibt mir jeden Tag aufs Neue Kraft und Mut für die vielen Abenteuer des Lebens. Und so auch für diese Arbeit.

## DANKSAGUNG

---

*Jean-Philippe*, Dir gebührt mein größter Dank und Respekt für die mühevollle Geduld und das liebevolle Verständnis in dieser doch häufig turbulenten Zeit. Du hast so oft meine Sorgen, Ängste und Zweifel vertrieben und dafür danke ich Dir von Herzen.

## **FINANZIERUNGSQUELLEN**

Für die vorliegende Arbeit bestand keine finanzielle Unterstützung.

## **INTERESSENKONFLIKTE**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.



## **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit

### **„Das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus beim Mastschwein zum Zeitpunkt der Schlachtung**

Eine Analyse der Vorhersagekraft der Fleischsaftserologie auf das Vorkommen von Hepatitis-E-Virus in Leber und Muskulatur beim Schwein und des Auftretens einer möglichen Kreuzkontamination im Schlachthof“

selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 23.05.2022

Janine Dzierzon









