

Nachweis und Charakterisierung von Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in Umweltproben

vorgelegt von
M. Sc.
Sophia Beyer

an der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Sven-Uwe Geißen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hans-Christoph Selinka

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Januar 2022

Berlin 2022

Zusammenfassung

Durch die Überwachung von humanpathogenen Viren in der Umwelt können Infektionsgeschehen in der Bevölkerung kontrolliert sowie mögliche Übertragungen über die Umwelt abgeschätzt werden. In der vorliegenden Arbeit war das Vorkommen von Hepatitis-E-Viren (HEV) und Cosaviren (CoSV) in Umweltproben in Deutschland von hauptsächlichem Interesse. Das Vorhandensein der beiden zoonotischen RNA-Viren wurde vor allem im Berliner Raum untersucht.

Für den Nachweis von HEV in Abwasser- und Oberflächengewässerproben eigneten sich Proben ohne Aufkonzentrierung (Direktproben) sowie via Ultrazentrifugation (UZ) aufkonzentrierte Proben am besten. Cosaviren hingegen ließen sich am besten in Proben, die mittels UZ oder Polyethylenglykol (PEG)-Fällung aufkonzentriert wurden, detektieren. Die ermittelten Viruskonzentrationen werden von der verwendeten Aufkonzentrierungsmethode beeinflusst. Beim Vergleich verschiedener Studien sollten die Ergebnisse daher immer im Zusammenhang mit dem Verfahren der Aufkonzentrierung bewertet werden.

Während der einjährigen Abwasserüberwachung einer Berliner Kläranlage wurden durchschnittliche HEV-Konzentrationen von 2×10^4 Kopien/100 ml (Direktproben) beziehungsweise 4×10^3 Kopien/100 ml (UZ-Proben) in den Zulaufproben mittels RT-qPCR quantifiziert. In den korrespondierenden Ablaufproben war die Konzentration an HEV mindestens um 1 \log_{10} -Stufe reduziert. In den Sommermonaten wird der Ablauf der Kläranlage zusätzlich mit UV-Licht desinfiziert, wodurch die Viruseliminierung noch gesteigert wird. Besonders deutlich zeigte sich der Desinfektionseffekt im Lebendnachweisverfahren von Phagen. In mit UV-Licht bestrahlten Kläranlagenablaufproben waren alle somatischen Coliphagen und F+-spezifischen RNA-Phagen inaktiviert. Die quantitative PCR hingegen stellt kein geeignetes Verfahren dar, um das Vorhandensein von aktiven Viren in Wasserproben nach einer UV-Desinfektion zu bewerten, da die Nukleinsäuren weitgehend erhalten bleiben. Cosaviren wurden in den monatlichen Kläranlagenzulaufproben insgesamt in geringeren Konzentrationen als HEV detektiert. Durchschnittlich wurden 7×10^2 CoSV-Kopien/100 ml (PEG-Proben) beziehungsweise 9×10^2 CoSV-Kopien/100 ml (UZ-Proben) nachgewiesen. Insgesamt konnte die Häufigkeit der humanpathogenen Viren im Abwasser, die in dieser Arbeit untersucht wurden, in folgende Reihenfolge gebracht werden: Humane Adenoviren (HAdV) > Humane Noroviren (HNV) > Hepatitis-E-Viren > Cosaviren. HEV und CoSV kommen ganzjährig in ähnlichen Konzentrationen im Abwasser vor und zeigen daher keine saisonalen Unterschiede im Vorkommen.

Alle Kläranlagenablaufproben und Berliner Oberflächengewässerproben waren CoSV RNA negativ. Somit besteht keine Gefahr einer CoSV-Infektion durch Freizeitaktivitäten in den untersuchten Berliner Gewässern. Falls CoSV jedoch in hohen Konzentrationen in Oberflächengewässern vorkommen, wie in einer untersuchten fäkal belasteten indischen Flussprobe, können sie dort ebenfalls quantifiziert werden (6×10^2 Kopien/100 ml). HEV konnten hingegen in Berliner Oberflächengewässerproben nachgewiesen werden. In 30 % der Havel-Flussproben konnte HEV RNA detektiert werden, wobei die positiven Proben einen Median von 9×10^2 HEV-Kopien/100 ml besaßen. Ebenfalls wurden zum Teil hohe Konzentrationen an HAdV ermittelt. In Flussproben der Spree wurden im Gegensatz zur Havel geringere HEV-Detektionsraten (19 %) und Konzentrationen (6×10^2 HEV-Kopien/100 ml) identifiziert. Humane Adenoviren und Noroviren wurden ebenfalls nur vereinzelt nachgewiesen. Die Spree ist ein sauberer Fluss, von dem bei normalen Wetterbedingungen eine sehr geringe Gefahr einer HEV-Infektion durch Freizeitaktivitäten im Wasser ausgeht. Nach Starkregenereignissen kann es jedoch zu einem starken Konzentrationsanstieg von humanpathogenen Viren in der Spree kommen. Durch Mischwasserüberläufe gelangt dann ungeklärtes Abwasser zusammen mit Regenwasser in den Fluss.

Dies äußert sich in der auf 75 % gestiegenen HEV-Detektionsrate mit durchschnittlich 3×10^3 HEV-Kopien/100 ml in Spreeproben nach starken Regenfällen. Auf Freizeitaktivitäten in der Spree sollte direkt nach extremen Niederschlägen verzichtet werden, da das Risiko einer Infektion mit HEV und anderen humanpathogenen Erregern erhöht sein könnte. An der Badestelle „Kleine Badewiese“, die stromabwärts des Flusses Havel gelegen ist, wurden während der Badesaison nur in vereinzelt Proben (15 %) geringe HEV-Konzentrationen nachgewiesen. Es konnten auch keine anderen Indikatorviren für fäkale Verunreinigungen detektiert werden. In den Sommermonaten besteht somit für die Badegäste an der Badestelle in der Havel kein erhöhtes Risiko für Virusinfektionen.

Um den tierischen Eintrag von HEV in die Umwelt zu untersuchen, wurden Oberflächengewässerproben aus Forstrevieren in Brandenburg parallel zu Wildschweinleberproben (untersucht am BfR) aus demselben Gebiet auf HEV getestet. Die geringe HEV-Detektionsrate in den Umweltproben und die durchweg HEV RNA negativen Wildschweinleberproben deuteten darauf hin, dass zum Zeitpunkt der Untersuchungen kein akutes HEV-Infektionsgeschehen in den Wildschweinpopulationen vorherrschte.

Die nachgewiesenen HEV-Fragmente wurden via *nested*-RT-PCR weiter charakterisiert. Für die Genotypisierung eigneten sich vor allem mittels UZ oder PEG-Fällung aufkonzentrierte Proben. Alle in den Umweltproben identifizierten HEV gehörten dem Genotypen HEV-3 an. Zehn der isolierten HEV-Sequenzen konnten dem Subgenotyp HEV-3c zugeordnet werden, welcher somit in den Berliner Abwasserproben vorherrschend war. Zwei Isolate wurden als HEV-3f identifiziert. Drei Sequenzen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, waren aber zweimal wahrscheinlich dem Subtyp HEV-3a und einmal HEV-3c oder HEV-3i zugehörig. Die in den Umweltproben charakterisierten HEV-Isolate wurden außerdem mit publizierten Sequenzen von HEV-infizierten Patienten aus Berlin auf Homologien verglichen. In den Patientenproben spiegelten sich die Subgenotypen der Umweltproben wider, HEV-3c wurde am häufigsten identifiziert und HEV-3f konnte ebenfalls detektiert werden. Da die HEV-Sequenzen aus Umwelt- und Patientenproben innerhalb des phylogenetischen Stammbaums clusterten, kann eine geringe genetische Distanz der Isolate vermutet werden. Die übereinstimmenden HEV-Subgenotypen, die in der Umwelt und der Bevölkerung zirkulieren, deuten auf eine Korrelation hin und bestätigen die Annahme, dass sich das Infektionsgeschehen der Bevölkerung im Abwasser widerspiegelt und dadurch wertvolle Informationen über das aktuelle Infektionsgeschehen liefern kann.

Summary

Environmental surveillance of human pathogenic viruses is a tool for assessing emerging infections in the human population and possible environmental transmission pathways. In the present study, emphasis is given to the prevalence of hepatitis E viruses (HEV) and cosaviruses (CoSV) in environmental samples from Germany. The occurrence of both zoonotic RNA viruses was primarily investigated in the Berlin area.

For detection of HEV in wastewaters and surface waters, samples without virus concentration steps (direct samples) and via ultracentrifugation (UC) concentrated samples were most suited. Cosaviruses were detected in ultracentrifugated and polyethylene glycol (PEG) precipitated samples the best. Determined virus concentrations depend on the used virus concentration methods. When comparing different studies results should always be evaluated considering the virus concentration techniques.

During the one-year HEV surveillance of a Berlin wastewater treatment plant (WWTP) samples were quantified by RT-qPCR. HEV concentrations of influent samples were 2×10^4 copies/100 ml (direct samples) and 4×10^3 copies/100 ml (UC samples), respectively. In the corresponding effluent samples HEV concentrations were reduced at least by 1 Log_{10} unit. During summer season WWTP effluents were additionally disinfected with UV light whereby virus elimination was even increased. This disinfection effect was particularly noticeable when bacteriophage concentrations were measured by infection-based detection methods. In WWTP effluent samples treated with UV light all somatic coliphages and F⁺-specific RNA-phages were inactivated. However, quantitative PCR is not an appropriate method to assess the presence of active viruses in water samples after disinfection with UV light since nucleic acids remain largely intact. Cosaviruses were detected in lower concentrations than HEV in the monthly WWTP samples. Average concentrations of influent samples were 7×10^2 CoSV-copies/100 ml (PEG samples) and 9×10^2 CoSV-copies/100 ml (UC samples), respectively. Overall frequency of human pathogenic viruses tested in wastewater samples was in the order of: human adenoviruses (HAdV) > human noroviruses (HNV) > hepatitis E viruses > cosaviruses. HEV and CoSV occur in similar concentrations in wastewater samples during the surveilled year, therefore no obvious seasonal pattern was observed.

All WWTP effluent samples and Berlin surface water samples were CoSV RNA negative. Thus, there is no risk of CoSV infection during recreational activities in the investigated Berlin waters. If CoSV occur in high concentrations, they can be quantified as well in surface waters, as shown by testing a fecal contaminated Indian river sample (6×10^2 CoSV-copies/100 ml). In contrast, HEV were detected in Berlin surface water samples. In 30 % of Havel river samples HEV RNA were identified with a median concentration of 9×10^2 HEV-copies/100 ml of positive samples. Some high concentrations of HAdV were also detected in the Havel samples. In water samples of the river Spree lower HEV detection rates (19 %) and concentrations (6×10^2 HEV-copies/100 ml) in comparison to the river Havel were identified. HAdV and HNV were detected only sporadic. Therefore, the Spree is an unpolluted river that poses only a very low risk of HEV infection during water based recreational activities under normal weather conditions. But after heavy rainfall events sharp increases of human pathogenic virus concentrations in the river Spree could occur. In this case untreated wastewater together with rainwater enters the river by combined sewer overflows. This is reflected in the increased HEV detection rate of 75 % with mean concentrations of 3×10^3 HEV-copies/100 ml in Spree water samples after extraordinary rainfalls. Recreational activities in the river Spree directly after heavy rainfall events should be avoided since the infection risk of HEV and other human pathogenic viruses may be increased. At the bathing area "Kleine Badewiese" located downstream the river Havel only few water samples were HEV RNA

positive (15 %) with low HEV concentrations during the bathing season. Besides that, no other viral indicators of fecal contaminations were detected. Therefore, no increased risk of virus infections for the bathers was found at this bathing area during the summer months.

To assess HEV of animal origin in the environment, surface water samples of forest districts in Brandenburg parallel to wild boar liver samples (investigated at the BfR) from the same territory were tested for HEV RNA. The low HEV detection rate in environmental samples and consistently HEV RNA negative liver samples indicate that there were no active HEV infections in the wild boar populations at the time of investigation.

To further characterize detected HEV fragments nested-RT-PCR and subsequent genotyping was carried out. By UC or PEG precipitation concentrated samples were most suited for this characterization. All HEV originating from environmental samples belonged to genotype HEV 3. Ten HEV sequences were classified as subgenotype HEV-3c, which is the most prevalent HEV subtype in Berlin wastewater samples. Two isolates contained HEV genotype 3f. Of three samples which could not be subtyped exactly, two were most likely of subtype 3a and one of subtype 3c or 3i. HEV strains obtained from Berlin environmental samples were compared to sequences of HEV infected patients from the same area. HEV isolates from patient samples correlate with subtypes identified in wastewater samples: HEV-3c was the most common type und HEV-3f was also identified. As HEV sequences from environment and patients clustered within a phylogenetic tree, a low level of genetic distance can be assumed. Corresponding HEV subgenotypes circulating in the environment and humans suggest an existing correlation and confirm that infections from the population are reflected in wastewater samples and could provide precious information of current infections.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei jedem einzelnen bedanken, der mich unterstützt und dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Zuerst möchte ich mich bei Frau Dr. Regine Szewzyk bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in Ihrem Fachgebiet II 1.4. am Umweltbundesamt anzufertigen. Ich danke ihr auch sehr dafür, dass sie sich stets um alle Anliegen gekümmert hat und durch ihre hervorragende Arbeitsgruppenleitung dazu beigetragen hat, dass ein gutes Arbeitsklima herrschte.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk für die Betreuung meiner Arbeit an der Technischen Universität in Berlin und die Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Reimar Johne vom Bundesinstitut für Risikobewertung danke ich sehr für die zur Verfügung gestellte, *in vitro* kultivierte HEV RNA, welche mir als Positivkontrolle diente und außerdem für die gute Zusammenarbeit im Projekt „Untersuchung von Oberflächenwasser aus Jagdgebieten auf Hepatitis-E-Viren“.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Hans-Christoph Selinka, der meine Arbeit am Umweltbundesamt betreute, mich bei der Planung der Versuche unterstützte und mir beim Anfertigen des Papers und der Dissertation zu Seite stand.

Ein großes Dankeschön möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe des Fachgebiets II 1.4 am UBA aussprechen. Ich habe mich immer gut aufgehoben gefühlt und es herrschte immer ein freundliches und hilfsbereites Miteinander, wodurch ich jeden Tag gerne zur Arbeit gekommen bin.

Besonders möchte ich Bettina Süßenbach für die Durchführung der quantitativen PCRs zur Detektion von Adenoviren und Noroviren und für die Nukleinsäureextraktionen danken. Weiterhin danke ich Christine Arndt für die Untersuchung der Proben auf somatischen Coliphagen und F+-spezifischen Phagen. Mein Dank gilt auch Christel Mekonnen, die mir die Methoden der Virusaufkonzentrierung beigebracht hat. Ich möchte mich bei Florian Kubek dafür bedanken, dass wir in Berlin zusammen Wasserproben genommen haben und uns über Labormethoden und phylogenetische Analysen ausgetauscht haben. Ein Dankeschön möchte ich auch Jeanette Farshadi aussprechen, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich in jeder Situation unterstützt hat.

Für die finanzielle Förderung meiner Doktorandinnenstelle gilt mein Dank dem Umweltbundesamt.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung in den letzten Jahren danken. Es bedeutet mir sehr viel, dass ihr immer für mich da seid.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	III
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Einheiten- und Symbolverzeichnis	10
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation der Arbeit.....	1
1.2 Kreislauf Wasserversorgung und mögliche Kontaminationsgefahren.....	2
1.3 Bedeutung von Zoonosen	3
1.4 Hepatitis-E-Viren	4
1.4.1 Charakterisierung, Taxonomie, Genom, Lebenszyklus	4
1.4.2 Fallzahlen, Krankheitsverlauf, Genotypen weltweit.....	7
1.4.3 Übertragungswege und Vorkommen in Deutschland.....	8
1.4.4 Untersuchungen in Patienten und Umweltproben in Europa	11
1.5 Cosaviren	12
1.5.1 Charakterisierung, Taxonomie, Genom, Lebenszyklus	12
1.5.2 Krankheitssymptome und Verbreitung weltweit.....	14
1.5.3 Bisherige EV- und CoSV-Untersuchungen	15
1.6 Verfahren zur Aufkonzentrierung von Viren aus Wasserproben.....	16
1.7 Virusnachweisverfahren.....	16
1.7.1 Nested- und quantitative RT-PCR.....	16
1.7.2 PMA-RT-qPCR	18
1.8 Indikatoren für fäkale Verunreinigungen: Bakteriophagen und humane Viren	18
1.9 Zielstellung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte.....	21
2.2 Probenahmen.....	22
2.3 Virusaufkonzentrierungsverfahren	24
2.3.1 Polyethylenglykol-Fällung.....	24
2.3.2 Ultrazentrifugation	25
2.3.3 Glaswollefiltration	26
2.4 Virenelution aus Sedimentproben	27
2.5 Extraktion viraler Nukleinsäuren.....	27

2.6	Quantitative real-time PCR.....	28
2.6.1	Verwendete Reaktionsansätze, Primersysteme, Temperaturprofile.....	28
2.6.2	Qualitätssicherung der RT-qPCR zur Detektion von HEV	30
2.6.3	Herstellung von Standards für die Quantifizierung (mit Beispiel HEV)	31
2.6.4	RT-qPCR für HEV	32
2.6.5	RT-qPCR für Cosaviren.....	32
2.6.6	RT-qPCR für humane Noroviren	33
2.6.7	RT-qPCR für murine Noroviren.....	33
2.6.8	QPCR für humane Adenoviren	33
2.6.9	Durchführung der qPCR.....	34
2.6.10	Auswertung der qPCR (am Beispiel HEV)	34
2.7	PMA-qPCR	36
2.8	Nested-RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.9	HEV-Sequenzierung und phylogenetische Analyse	39
2.9.1	Probenvorbereitung für Sequenzierung.....	39
2.9.2	Phylogenetische Analysen	39
2.10	Phagenuntersuchungen	40
2.11	Statistische Analysen.....	41
2.12	Zusammenfassung aller Methoden.....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Methodenvergleiche für den Nachweise von HEV.....	44
3.2	Auswahl geeigneter Probenahmestellen	46
3.3	Nachweise von HEV in Abwässern	47
3.3.1	Vorkommen in Kläranlagenzuläufen und -abläufen.....	47
3.3.2	Vorkommen in Kläranlagenabläufen nach UV-Behandlung.....	51
3.3.3	Untersuchung von Abwasserproben mittels PMA-qPCR	53
3.4	Nachweis von HEV in Oberflächengewässern	55
3.4.1	Virusuntersuchungen im Fluss Spree	56
3.4.2	Nachweise von Viren nach Mischwasserüberläufen in die Spree.....	57
3.4.3	Virusuntersuchungen im Fluss Havel	58
3.4.4	Virusuntersuchungen von Gewässerproben einer Badestelle an der Havel.....	59
3.4.5	Virusuntersuchungen von Sedimentproben der Badestelle	60
3.4.6	Übersicht der HEV Nachweise in Oberflächengewässern	61
3.5	Genotypisierung der in Abwasserproben nachgewiesenen HEV	62
3.6	HEV-Untersuchungen von Oberflächengewässern zweier Forstreviere	69
3.7	Methodenvergleiche für den Nachweis von Cosaviren	71

3.8	Nachweis von Cosaviren in Umweltproben	74
3.9	Vorkommen von HEV und CoSV im Vergleich zu HAdV und HNV im Abwasser	77
4	Diskussion	80
4.1	Begründung der Auswahl der durchgeführten umweltvirologischen Untersuchungen	80
4.2	Virenanreicherungen aus Wasserproben.....	81
4.2.1	Methodenvergleiche zur Aufkonzentrierung von HEV und CoSV	82
4.3	Bestimmung der Konzentrationen von HEV und CoSV in Abwässern.....	84
4.3.1	Viruskonzentrationen in Kläranlagenzuläufen	84
4.3.2	Reinigungsleistung der Kläranlagen bezogen auf Viren	86
4.3.3	Effekt der UV-Behandlung auf Kläranlagenabläufe.....	87
4.3.4	PMA-qPCR zur Testung der Lebensfähigkeit von Viren.....	88
4.4	Bestimmung der Konzentrationen von HEV und CoSV in Oberflächengewässern	90
4.5	Molekularbiologische Charakterisierung von HEV und CoSV in Umweltproben	93
4.6	Risikobewertung von HEV- oder CoSV-Infektionen über die Umwelt	95
4.7	Resümee und Ausblick	97
5	Anhang.....	99
6	Literaturverzeichnis	105
6.1	Internetquellen.....	105
6.2	Publikationen.....	106
7	Bisherige Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	122
8	Abbildungsverzeichnis	123
9	Tabellenverzeichnis	126
10	Selbständigkeitserklärung.....	127

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Akute schlaffe Lähmung	KA	Kläranlage
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	KBW	Kleine Badewiese (Badestelle)
BHQ	<i>black hole quencher</i>	Log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung	MGB	<i>minor groove binder</i>
BSW	Baumschulenweg	MH	Münchehofe (Kläranlage)
bzw	beziehungsweise	MNV-1	murines Norovirus 1
C/G-Gehalt	Cytosin/Guanin-Gehalt	MW	Mittelwert
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA	MWÜ	Mischwasserüberlauf
Cosa	<i>common stool associated</i>	NaCl	Natriumchlorid
CoSV	Cosaviren	NWG	Nachweisgrenze
ct	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwert	ORF	<i>open reading frame</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
dNTPs	Desoxyribonukleosid-triphosphate	PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PEG	Polyethylenglycol
EV	Enteroviren	PMA	Propidiummonoazid
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	Q-Q	Quantil-Quantil
GA	Garching (Kläranlage)	RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
GG	Genogruppe	RKI	Robert Koch-Institut
GW	Glaswolle	RL	Ruhleben (Kläranlage)
HAdV	Humane Adenoviren	RNA	Ribonukleinsäure
HAdV-2	HAdV C Serotyp 2	RT	Raumtemperatur
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure	RT-qPCR	Reverse Transkriptions-quantitative <i>real-time</i> PCR
HEV	Hepatitis-E-Virus	Seq	Sequenz
HNV	Humane Noroviren	SL	Schönerlinde (Kläranlage)
HSPG	Heparansulfatproteoglykane	Som.	Somatische
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	ST	Spreetunnel
		TAMRA	6-Carboxytetramethyl-rhodamine

TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetra-essigsäure	UZ	Ultrazentrifug(e/ation)
		WHO	Weltgesundheitsorganisation
UBA	Umweltbundesamt	z. B.	Zum Beispiel
UV	Ultraviolettstrahlung	ZKÜ	Zellkulturüberstand

Einheiten- und Symbolverzeichnis

~	ungefähr	min	Minute
%	Prozent	ml	Milliliter
°C	Grad Celsius	mmol	Millimol
μl	Mikroliter	mol	Molar
μM=μmol/l	Mikromolar	n	Anzahl
bp	Basenpaare	ng	Nanogramm
cm	Zentimeter	nt	Nukleotid(e)
g	Gramm	p	Signifikanzwert
h	Stunde	pfu	Plaque-bildende Einheiten
kb	Kilobasenpaare	R ²	Korrelationskoeffizient
kDa	Kilodalton	s	Sekunden
L	Liter	x	x-fach
M= mol/l	Molarität	x g	x-fache Schwerkraft

1 Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Zoonosen sind in der heutigen Zeit immer bedeutsamer werdende Infektionskrankheiten, die zwischen Tieren und Menschen übertragen werden können. Zwei Drittel aller bekannten humanpathogenen Infektionskrankheiten sind auf zoonotische Erreger zurückzuführen [Internetquelle 1]. Zum Teil sind sehr schwere Krankheitsverläufe durch Infektionen mit zoonotischen Viren möglich, z.B. durch die Erreger, die Tollwut oder Ebola verursachen, oder das 2019 aufgetretene Pandemievirus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), das weltweit bereits mehr als 3,9 Millionen Todesfälle verursacht hat. Um Zoonosen weltweit zu bekämpfen, wurde von der WHO ein *One-Health-Approach* etabliert (Hillienhof, 2019). *One-Health* ist ein ganzheitlicher Ansatz, der die Fachbereiche Humanmedizin, Veterinärmedizin und Umweltwissenschaften verbindet. Um die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt zu erhalten oder zu verbessern, wird der Übertragung von Krankheitserregern entgegengewirkt.

Auch in Deutschland ist das Monitoring von zoonotischen Viren von wichtiger Bedeutung. Von einigen Viren, wie z. B. dem Hepatitis-E-Virus (HEV), gibt es Daten zum Vorkommen in Menschen und Tieren, aber nur wenig Informationen über deren Verbreitung über die Umwelt. Die HEV-Seroprävalenz in der deutschen Bevölkerung und im Tierreich, vor allem bei Schweinen und Wildschweinen, ist hoch (Dremsek *et al.*, 2013; Schielke *et al.*, 2015; Faber *et al.*, 2018A). Im Gegensatz dazu wird das Virus vergleichsweise selten bei Menschen diagnostiziert. Diese Diskrepanz macht das HEV zu einem potenziellen Gesundheitsrisiko für die deutsche Bevölkerung, da die Infektion oft unerkannt bleibt und die Gefahr des Virus unterschätzt werden könnte. Um den *One-Health-Approach* zu vervollständigen und Kenntnisse über das Vorkommen von HEV in der Umwelt zu sammeln, wurden in der vorliegenden Arbeit Umweltproben aus Deutschland auf HEV untersucht und diese Viren charakterisiert.

Ein weiteres zoonotisches Virus, über das es bislang wenig Daten zum Vorkommen in Deutschland, weder in Menschen, Tieren noch der Umwelt, gibt, ist das Cosavirus (*common stool associated picornavirus*, CoSV). In den letzten Jahren kam es jedoch in Deutschland zu einer Anhäufung von Patienten mit „Poliovirus-ähnlichen“ Symptomen. Die akuten schlaffen Lähmungen (*acute flaccid paralysis*, AFP) konnten in diesen Fällen jedoch nicht auf eine Poliovirusinfektion zurückgeführt werden (Diedrich und Böttcher, 2017). Da CoSV ähnliche Symptome hervorrufen, könnte die AFP auf eine mögliche Infektion mit diesen Viren hindeuten. Um die Verbreitung von CoSV und die damit verbundene Infektionsgefahr für die Bevölkerung in Deutschland zu untersuchen, wurden die gesammelten Umweltproben neben HEV ebenfalls auf CoSV getestet.

1.2 Kreislauf Wasserversorgung und mögliche Kontaminationsgefahren

Der Kreislauf der Wasserversorgung in Deutschland ist in Abbildung 1 entgegen dem Uhrzeigersinn dargestellt. Das von den Verbrauchern verursachte Abwasser gelangt zur Kläranlage und wird dort in mehreren Reinigungsstufen gesäubert. Das geklärte Abwasser wird dann in die Oberflächengewässer geleitet, sollte aber möglichst nicht in das Grundwasser gelangen. In Deutschland wird vor allem das Grundwasser und nur zu einem geringen Teil abwasserunbeeinflusstes Oberflächenwasser für die Wasseraufbereitung in den Wasserwerken genutzt. Das Trinkwasser gelangt anschließend wieder zu den Verbrauchern, wo sich der Wasserkreislauf schließt.

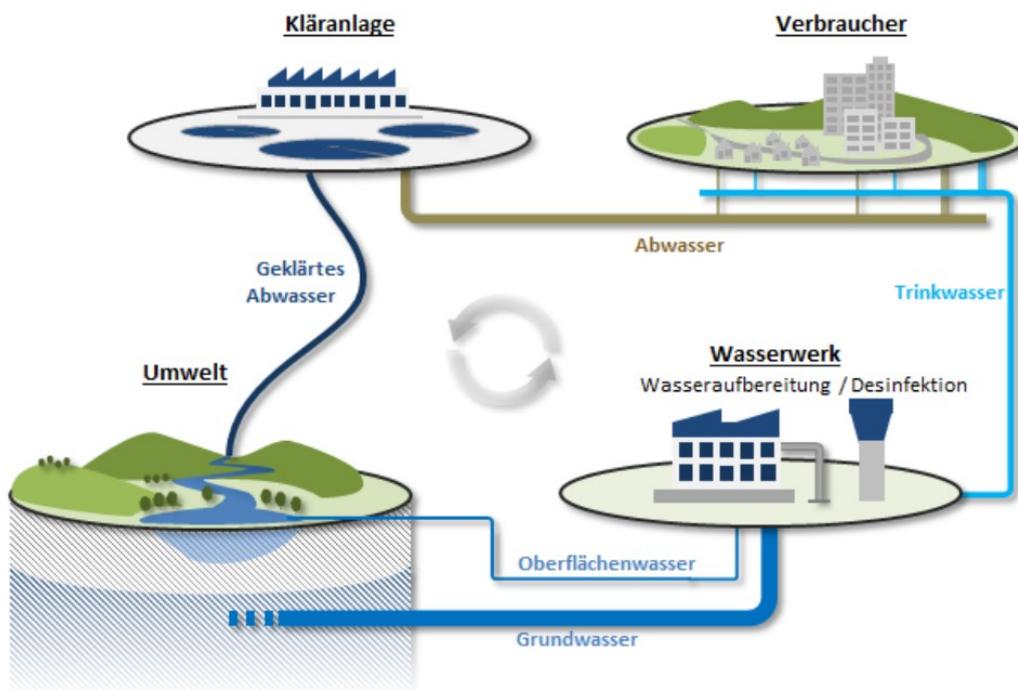


Abbildung 1: Der Wasserkreislauf in Deutschland vom Verbraucher zur Kläranlage, in die Umwelt, zum Wasserwerk und wieder zurück zum Verbraucher (Ho, 2017).

Das von den Verbrauchern stammende Abwasser enthält humanpathogene Erreger, unter anderem humane Adenoviren und Noroviren. Die Konzentration dieser Viren in den Kläranlagenzuläufen ist stets hoch, schwankt jedoch zwischen den Berichten. Adenoviren kommen in einem Bereich von 10^5 Kopien/100 ml bis 10^7 Kopien/100 ml und Noroviren von 10^4 Kopien/100 ml bis 10^6 Kopien/100 ml in den ungereinigten Abwässern vor. Das gereinigte Abwasser besaß noch Konzentrationen an Adenoviren und Noroviren zwischen 10^3 Kopien/100 ml bis 10^5 Kopien/100 ml (Laverick *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018 A; Selinka *et al.*, 2020). Die Reduktion der Viren innerhalb der Kläranlagen belief sich in diesen Studien auf ca. 2 Log_{10} -Stufen, was einer 99%igen Reduktion entspricht. Die Reinigung des Abwassers in Kläranlagen erfolgt üblicherweise durch mechanische und biologische Verfahren und zum Teil auch chemische und physikalische Verfahren, wie Ultraviolett (UV)-Strahlung. Durch UV-C-Strahlung, meistens mit einer Wellenlänge von 254 nm, können Mikroorganismen und Viren inaktiviert werden. Da jede Kläranlage andere Reinigungsstufen und -verfahren besitzt, variieren die Viruskonzentrationen in den geklärten Abwässern. Generell stellen

Kläranlagenabläufe, welche in Oberflächengewässer geleitet werden, jedoch eine potenzielle Quelle des Viruseintrages in die Umwelt dar. Dadurch lässt sich auch erklären, dass in Deutschland und anderen europäischen Länder wie den Niederlanden oder Italien humanpathogene Viren in Oberflächengewässern detektiert werden konnten (Lodder und de Roda Husman, 2005; Hamza *et al.*, 2009; Idolo *et al.*, 2013; Selinka *et al.*, 2020). Mischwasserüberläufe (MWÜ) sind ein weiterer Faktor, der zum Konzentrationsanstieg von humanpathogenen Viren in Oberflächengewässer beitragen kann (Fong *et al.*, 2010; Selinka *et al.*, 2020). Dabei erreichen Mischwasserkanäle, die Abwasser und Regenwasser zur Kläranlage leiten, bei Starkregenereignissen ihr Kapazitätsmaximum und leiten dann ungeklärtes Abwasser zusammen mit Regenwasser in Flüsse ab.

Zur Trinkwasseraufbereitung in den Wasserwerken wird neben Oberflächengewässern hauptsächlich Grundwasser verwendet. Trinkwasser ist eines der am strengsten kontrollierten Lebensmittel in Deutschland und die Trinkwasserverordnung legt fest, dass sich darin keine Krankheitserreger befinden dürfen, die die Gesundheit des Menschen schädigen könnten (TrinkwV, 2001). Der 2003 in Deutschland stattgefundenen trinkwasserassoziierten Norovirusausbruch mit 88 an Gastroenteritis erkrankten Personen stellt daher eine seltene Ausnahme dar. Ursache hierfür war eine Trinkwasserleitung, die saniert wurde und eine unzulässige Verbindung zu einer Zisterne hatte, die mit abwasserbelastetem Oberflächenwasser gefüllt war (Merbecks *et al.*, 2004). Abgesehen von diesem Sonderfall ist das Trinkwasser in Deutschland so rein, dass sich das Virusmonitoring in dieser Arbeit auf Abwässer und Oberflächengewässer konzentriert hat. In Abwässern wird von einer hohen Virusbelastungen ausgegangen und zirkulierende Stämme können dort identifiziert werden.

Um das potenzielle Infektionsrisiko für die Bevölkerung abschätzen zu können, wurden außerdem Oberflächengewässer untersucht. Vor allem das Verschlucken von Wasser während diversen Freizeitaktivitäten oder dem Schwimmen könnte zu Virusinfektionen führen. Bei Freizeitbeschäftigungen mit wenig Kontakt zum Wasser selbst, wie dem Fahren von Booten, Kanus, Kajaks, Ruderbooten oder dem Angeln, werden ca. 3-12 ml des Oberflächenwassers geschluckt (Dorevitch *et al.*, 2011). Beim Schwimmen hingegen nehmen Kinder und Erwachsene zwischen 20 bis 50 ml auf (Schets *et al.*, 2011). Die minimale Infektionsdosis ist nur von wenigen Viren bekannt, da Humanexperimente durch ethische Aspekte beschränkt sind. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit Rotaviren beispielsweise besteht schon bei der Exposition mit einem bis zehn dieser Viren (Schiff *et al.*, 1984). Für Noroviren wurde berichtet, dass 1300 bis 2800 Viruspartikel notwendig sind, um bei 50 % der Menschen eine Infektion hervorzurufen (Atmar *et al.*, 2014). Die Infektionsdosis der meisten enteropathogenen Bakterien hingegen liegt in einem Bereich von 10^6 bis 10^8 Bakterienzellen (Leclerc *et al.*, 2002). Das Risiko einer Infektion durch virale Erreger wurde generell als 10 bis 10.000-fach erhöht im Vergleich zu pathogenen Bakterien bei ähnlichen Expositionen beschrieben (Haas *et al.*, 1993; Bosch, 1998).

1.3 Bedeutung von Zoonosen

Zoonosen sind Infektionskrankheiten, die wechselseitig zwischen Menschen und Tieren übertragen werden können und von Bakterien, Parasiten, Pilzen, Prionen oder Viren ausgelöst werden. Bislang sind mehr als 250 Krankheiten bekannt, die zu den Zoonosen gezählt werden (Pal, 2005). Die gesundheitliche Gefahr durch Zoonosen ist ein immer größer werdendes globales Problem. Die Anzahl an Ausbrüchen von humanen Infektionskrankheiten durch Zoonosen steigt stetig an (Smith *et al.*, 2014A). Zwei Drittel aller bekannten humanpathogenen Infektionskrankheiten können von Tieren übertragen werden [Internetquelle 1]. Ungefähr 60 % aller neu auftretenden Infektionskrankheiten

sind ebenfalls Zoonosen, wobei der Hauptteil aus Wildtieren stammt (Jones *et al.*, 2008). Die Übertragungswege der Erreger zwischen den verschiedenen Wirten sind vielfältig. Ansteckungen können zum einen durch den immer enger werdenden direkten Kontakt zu Tieren oder über sogenannte Vektoren, wie Mücken oder Zecken, erfolgen. Menschen können sich außerdem über Lebensmittel tierischer Herkunft mit Pathogenen infizieren. Die schnelle Verbreitung solcher Erreger wird durch das zunehmende Wachstum der Weltbevölkerung und die Globalisierung, die einen weltweiten Handel und Fernreisen ermöglicht, begünstigt. Klimaveränderungen können ebenfalls dazu beitragen, dass sich zoonotische Pathogene auf neue Gebiete ausweiten können (Wang und Crameri, 2014).

Viele der zoonotischen Erreger sind Viren. Um die Artenbarriere überwinden zu können, müssen die Proteine auf der Virusoberfläche durch Mutationen so verändert sein, dass das Virus an die Rezeptoren des neuen Wirtes binden und in die Zelle eindringen kann. Außerdem besitzen Viren Mechanismen, mit denen sie das Immunsystem des Wirtes umgehen können, um sich in dessen Zelle zu replizieren. Insbesondere RNA-Viren sind so in der Lage, sich an neue Wirte zu adaptieren, da sie eine hohe Rate von Nukleotidsubstitutionen aufweisen und nur eine geringe Fähigkeit zur Fehlerkorrektur von Mutationen besitzen (Jones *et al.*, 2008; Bae und Son, 2011). Zu den prominentesten zoonotischen RNA-Viren zählen das Ebolavirus, Norovirus, SARS-Coronavirus-2, Rabiesvirus, das Tollwut auslöst, Viren, die Vogel- und Schweinegrippe verursachen (Bengis *et al.*, 2004) und auch die in dieser Arbeit untersuchten Hepatitis-E-Viren und Cosaviren. An Zoonosen sind neben dem Menschen oft Nagetiere, Vögel, Fledermäuse oder Schweine, wie es bei HEV und CoSV der Fall ist, beteiligt.

Hepatitis-E-Viren, die Säugetiere infizieren, haben einen gemeinsamen Vorfahren, der vor 536 Jahren bis 1344 Jahren existierte. Dieser Vorläufer entwickelte sich in zwei Varianten weiter, zum einen in Genotypen, die auf den Menschen beschränkt sind, und solche, die vor allem Schweine und Menschen infizieren können (Purdy und Khudyakov, 2010). Über die Evolutionsgeschichte der CoSV ist bislang wenig bekannt, da sie erstmals 2008 beschrieben wurden (Kapoor *et al.*, 2008).

1.4 Hepatitis-E-Viren

1.4.1 Charakterisierung, Taxonomie, Genom, Lebenszyklus

Erstmals wurde das Hepatitis-E-Virus 1983 mittels Immunelektronenmikroskopie beschrieben. Es wurde als eigenständiges *non-A, non-B* Hepatitis-Virus bezeichnet, das fäkal-oral übertragen werden kann (Balayan *et al.*, 1983). HEV sind zoonotisch und können Menschen und Tiere infizieren (Pina *et al.*, 2000; Meng, 2000). Mit einem Durchmesser von 27 nm - 34 nm sind die Viren recht klein. Das 6,4 kb - 7,2 kb große Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität und ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben (Balayan *et al.*, 1983; Tam *et al.*, 1991; Emerson und Purcell, 2003). Dieses besteht aus Homodimeren eines einzigen Proteins (Xing *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005A). HEV sind unbehüllte Viren, sie kommen aber auch als membranassoziierte Partikel vor, wobei die Lipidmembran von der Wirtszelle stammt. Die von einer zellulären Membran umhüllten HEV zirkulieren lediglich im Blutkreislauf. In Fäkalien hingegen wurden nur unbehüllte HEV nachgewiesen (Takahashi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2015). Die zelluläre Membran beeinflusst die Stabilität der Virionen in der Umwelt und reduziert die Zellanheftung, was das Risiko einer Infektion verringert (Yin *et al.*, 2016; Yin und Feng, 2019).

Hepatitis-E-Viren gehören zur Familie *Hepeviridae*, welche die beiden Gattungen *Orthohepevirus* und *Piscihepevirus* beinhaltet (ICTV, Stand 2020). Die Gattung *Piscihepevirus* besitzt nur die Spezies *Piscihepevirus A*, welche aus Forellen in Nordamerika isoliert wurde (Batts *et al.*, 2011). Die Gattung

Orthohepevirus enthält die vier Spezies *Orthohepevirus A-D*, welche verschiedene Wirte besitzen. Das *Orthohepevirus B* hat Vögel als Wirt, *Orthohepevirus C* Frettchen und Ratten und das *Orthohepevirus D* infiziert Fledermäuse. Die Spezies *Orthohepevirus A*, welche sich in 8 verschiedene Genotypen untergliedert, besitzt ein breites Säugetier-Wirtsspektrum (Smith *et al.*, 2014B; Woo *et al.*, 2016). Die Genotypen HEV-1 und HEV-2 infizieren ausschließlich Menschen. Die Genotypen HEV-3, HEV-4 und HEV-7 sind zoonotisch, wobei der Typ 3 die größte Anzahl von Wirten besitzt. Er wurde bislang in Menschen, Schweinen, Wildschweinen, Kaninchen, Mangusten und in Rotwild nachgewiesen. HEV-4 nutzt ebenfalls Menschen, Schweine, Wildschweine sowie Yaks als Wirt und HEV-7 Menschen und Kamele. Die Genotypen HEV-5, HEV-6 und HEV-8 zirkulieren ausschließlich in Tieren, die Typen 5 und 6 in Wildschweinen und Typ 8 in Kamelen. Die etwa 7,2 kb große, einzelsträngige RNA des HEV besteht aus drei bzw. vier *open reading frames* (ORF). Der Genotyp HEV-1 bildet eine Ausnahme und besteht aus vier ORFs, wobei innerhalb des ORF1 noch ein kleinerer ORF4 enthalten ist, der die Replikation effizienter macht (Nair *et al.*, 2016). Die anderen HEV-Genotypen besitzen drei ORFs in ihrem Genom (Abb. 2).

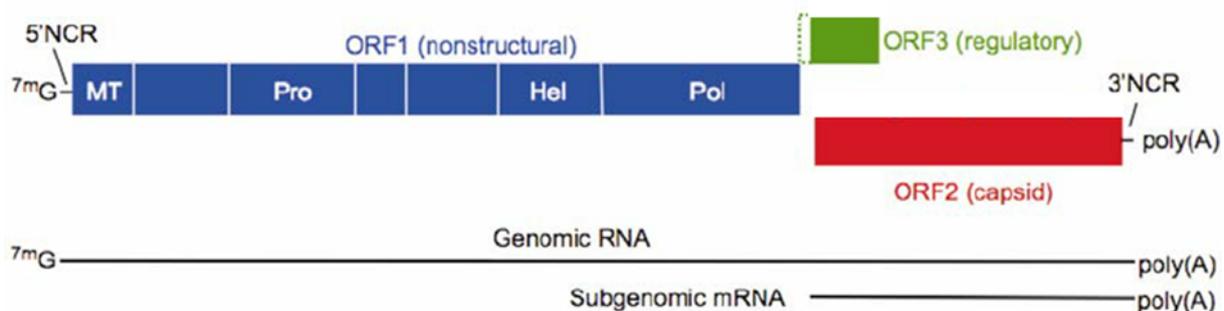


Abbildung 2: HEV-Genom mit der genomischen und subgenomischen RNA, die während der Replikation erzeugt wird. Die RNA beinhaltet drei ORFs, die für verschiedene Proteine kodieren. MT: Methyltransferase, Pro: Papain-ähnliche Cysteinprotease, Hel: RNA-Helikase, Pol: RNA-abhängige RNA-Polymerase, NCR: nicht-kodierende Region (Kumar *et al.*, 2010).

Das HEV-Genom ist am 5'-Ende methyliert (7^mG) und besitzt am 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz (Abb. 2). An beiden Enden befinden sich nicht-kodierende Regionen (NCR). Das etwa 5 kb lange ORF1 ist genomisch, nicht überlappend und kodiert für Nichtstrukturproteine wie die Methyltransferase, Papain-ähnliche Cysteinprotease, RNA-Helikase und RNA-abhängige RNA-Polymerase (Cao und Meng, 2012). Das ORF2 (~2 kb) und ORF3 (~350 bp) sind im Gegensatz zum ORF1 überlappend und die Proteine werden von einer subgenomischen RNA translatiert. Die Virionen sind aus einem Kapsidprotein mit ca. 660 Aminosäuren aufgebaut, das vom ORF2 encodiert wird. Dieses Kapsidprotein bindet an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) auf der Oberfläche von Leberzellen und ist für die virale Infektion notwendig (Kalia *et al.*, 2009). Ein 12,5 kDa großes, immunreaktives Protein, das vom ORF3 encodiert wird, ist an der Morphogenese, dem Austritt und der Pathogenese der Viren beteiligt (Cao und Meng, 2012). Der HEV-Lebenszyklus ist in der Abbildung 3 dargestellt und zeigt auch die Funktion der einzelnen Proteine detaillierter auf.

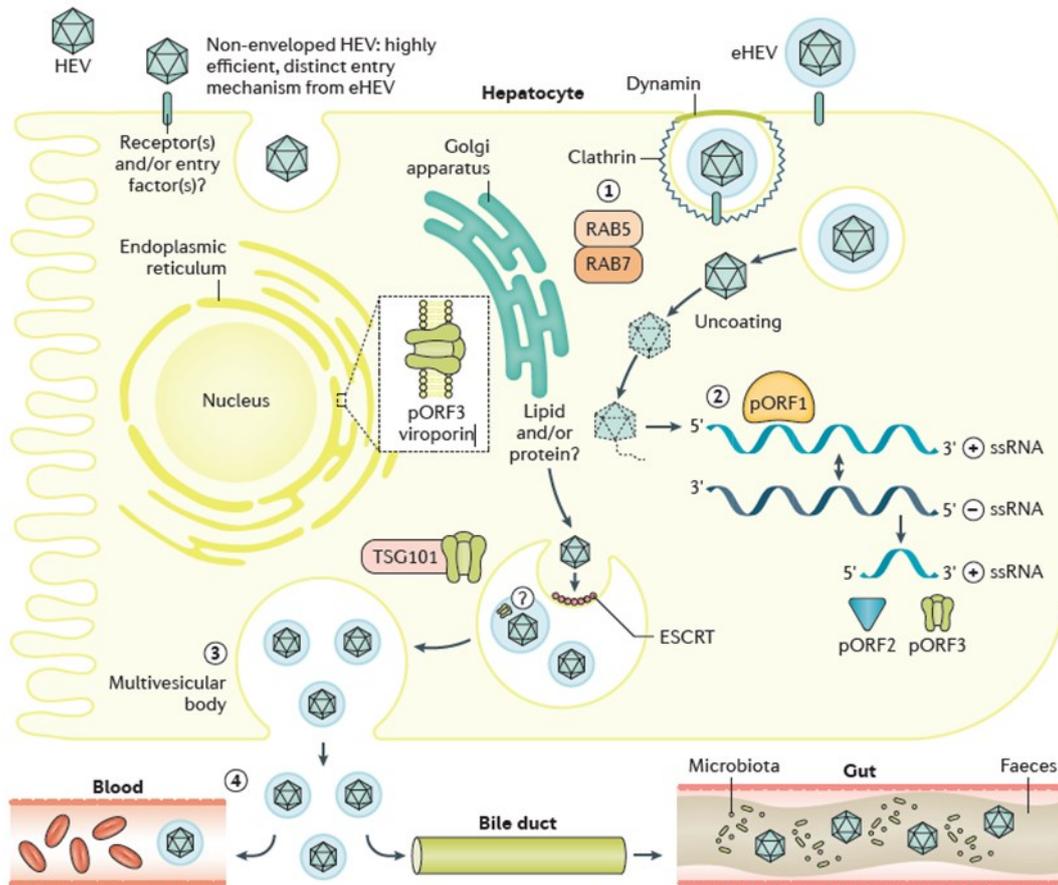


Abbildung 3: Lebenszyklus von Hepatitis-E-Viren in Leberzellen (Nimgaonkar *et al.*, 2018).

Der HEV-Lebenszyklus findet in den Hepatozyten (Leberzellen) des Wirtes statt. Die Viren werden vor allem enteral übertragen, wie sie jedoch in die Darmzellen eindringen, um den Blutkreislauf zu erreichen, ist noch unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass unbehüllte Virionen notwendig sind, um eine Hepatitis-E-Infektion auszulösen (Yin und Feng, 2019). Neben der unbehüllten Form kommen diese Viren auch als membranassoziierte Partikel vor. Die Membran stammt dabei von der Wirtszelle und die „quasi-behüllten“ Virionen werden als eHEV bezeichnet. Um in die Leberzellen einzudringen, heften sich HEV, wie viele andere Viren, auf der Zelloberfläche an HSPG, speziell an Syndecane (Kalia *et al.*, 2009). Unbehüllte HEV und mit einer Lipidmembran umgebene eHEV besitzen unterschiedliche Eintrittsmechanismen. Bislang ist weniger über den Mechanismus der unbehüllten Virionen bekannt. Obwohl der spezifische Zelloberflächenrezeptor für den eHEV-Eintritt noch nicht ausfindig gemacht wurde, konnte die rezeptorvermittelte Endozytose als Eintrittsmechanismus identifiziert werden. Die eHEV-Aufnahme in die Hepatozyten wird durch Clathrin, Dynamin-2 und membranständiges Cholesterin vermittelt, außerdem werden die GTPasen Rab5 und Rab7 benötigt. Nach dem Eintritt erfolgt der Abbau der Lipidmembran in Lysosomen und die virale RNA wird freigesetzt (Holla *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2016). Von der viralen RNA mit positiver Polarität wird zunächst durch zelluläre Prozesse des Wirtes das ORF1-Polyprotein, welches die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) enthält, translatiert. Die positiv-strängige HEV RNA wird mit Hilfe der RdRp in RNA negativer Polarität transkribiert. Diese RNA dient wiederum als Template, um virale RNA mit positiver Polarität zu transkribieren, die dann in die nachfolgende Generation von Virionen verpackt wird. Die negativ-strängige RNA dient außerdem als Template für die kürzere subgenomische RNA (sgRNA). Von dieser sgRNA wird durch Ribosomen des Wirtes das Kapsidprotein pORF2 und das Protein ORF3 (pORF3)

translatiert (Agrawal *et al.*, 2001; Graff *et al.*, 2006; Varma *et al.*, 2011). Das Protein pORF3 bindet an das Tumor-Suszeptibilitätsgen 101 Protein (TSG101). TSG101 ist eine Komponente der zellulären *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT)-Maschinerie. Der ESCRT-Komplex regelt den vesikulären Transport in multivesikulären Körper (MVB), welche bei der rezeptorvermittelten Endozytose gebildet werden. Die Interaktion von pORF3 mit TSG101 fördert wahrscheinlich die Knospung der neu assemblierten HEV Virionen in die MVB hinein, welche dann mit der Plasmamembran fusionieren, um die Virionen aus der Zelle freizusetzen. Während des ESCRT-Vorgangs erwerben die HEV ihre Lipidhülle, die von einer intrazellulären Membran stammt und Proteine vom trans-Golgi-Netzwerk enthält (Surjit *et al.*, 2006; Nagashima *et al.*, 2011A; Nagashima *et al.*, 2014). Die Virionen sind bei der Freisetzung aus den Hepatozyten mit ORF3-Proteinen und einer Lipidschicht umhüllt. Das pORF3 spielt dabei eine entscheidende Rolle, da es als Viroporin das Membranpotential auflöst und somit die virale Knospung und den Viraustritt aus der Wirtszelle veranlasst (Nagashima *et al.*, 2011B; Nieva *et al.*, 2012). HEV, die im Blutkreislauf zirkulieren, besitzen ORF3-Proteine und liegen in der quasi-behüllten Form vor. Die in Fäkalien detektierten HEV besitzen keine ORF3-Proteine und keine Lipidhülle, diese wird vermutlich nach der Virusfreisetzung im Gallengang durch die Gallenflüssigkeit abgebaut (Takahashi *et al.*, 2008).

1.4.2 Fallzahlen, Krankheitsverlauf, Genotypen weltweit

Hepatitis-E-Viren sind zu einer globalen gesundheitlichen Gefährdung in Entwicklungsländern und Industriestaaten geworden. Weltweit sind HEV der Hauptverursacher von akuter viraler Hepatitis (Murrison und Sherman, 2017). Jährlich treten ca. 20 Millionen HEV-Infektionen auf, wovon 3,3 Millionen symptomatisch verlaufen und 44.000 tödlich enden [Internetquelle 2].

Zu den Symptomen zählen in der Anfangsphase: leichtes Fieber, Appetitmangel, Übelkeit, Erbrechen, Oberbauchbeschwerden, Juckreiz, Ausschlag und Gelenkschmerzen. Danach kann die Hepatitis-E-Infektion zu einer Gelbsucht (Haut und Augen) mit dunklem Urin und hellem Stuhl führen und schließlich in einer vergrößerten, schmerzempfindlichen Leber enden (Kamar *et al.*, 2012; RKI, 2015). Es wurden auch Symptome außerhalb der Leber, wie neurologische und hämatologische Störungen, in Patienten mit akuter und chronischer HEV-3 Infektion beschrieben (Woolson *et al.*, 2014). Die Inkubationszeit der Hepatitis-E-Infektion reicht dabei von 15 Tage - 64 Tage und ist klinisch nicht von der Hepatitis-A-Infektion zu unterscheiden. In seltenen Fällen können HEV-Infektionen schwer verlaufen und es kann zu einem lebensgefährlichen, akuten Leberversagen kommen (RKI, 2015). Somit ist ein schwerer Verlauf der Krankheit mit einer Mortalitätsrate von ca. 1 % möglich (Pérez-Gracia *et al.*, 2015), obwohl der Großteil der HEV-infizierten Patienten eine asymptomatische und selbstlimitierende Infektion erfährt. Die Genotypen HEV-1,-2,-3 und -4 können akute Infektionen hervorrufen. Vor allem für schwangere Frauen ist eine Infektion mit dem Genotyp HEV-1 gefährlich, da die Sterberate bei bis zu 30 % liegt (Clemente-Casares *et al.*, 2016). Chronische HEV-Infektionen, die meist auf immunsupprimierte Patienten beschränkt sind, können bei einer Infektion mit den Genotypen HEV-3 und HEV-4 vorkommen (Murrison und Sherman, 2017). Weltweit dominieren die Genotypen 1 bis 4 der Spezies *Orthohepevirus A*, die alle zu einem Serotyp gehören (Emerson *et al.*, 2006). Die Verteilung dieser Genotypen auf den Kontinenten ist in Abbildung 4 gezeigt.

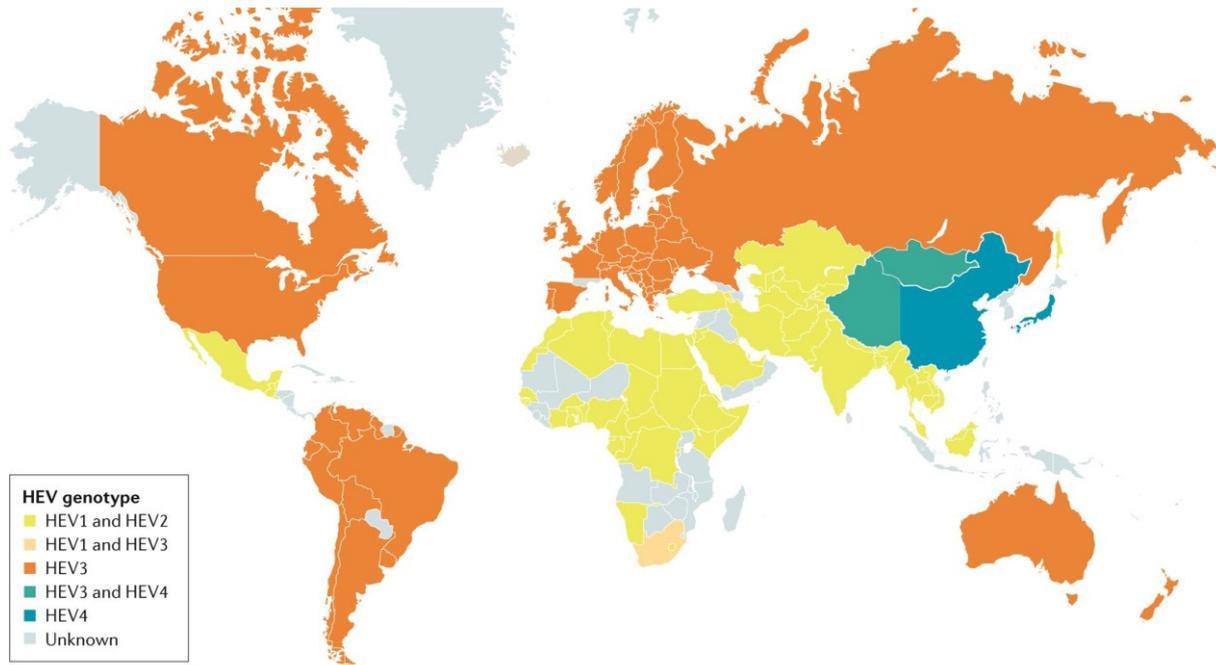


Abbildung 4: Verteilung der Genotypen HEV-1, HEV-2, HEV-3 und HEV-4 auf der Welt (Kamar *et al.*, 2017).

In Entwicklungsländern stellen vorwiegend die Genotypen HEV-1 und HEV-2 eine Gefahr dar (Abb. 4). Diese Genotypen dominieren vor allem in Mexiko, großen Teilen Afrikas und West-, Süd- und Zentralasien. Die auf menschliche Wirte beschränkten Genotypen HEV-1 und HEV-2 werden hauptsächlich fäkal-oral und in Ländern mit schlechten sanitären Bedingungen über kontaminiertes Trinkwasser übertragen (Aggarwal und Naik, 2009; Hakim *et al.*, 2016). Für sehr große HEV-Ausbrüche, wie in Indien im Jahr 2008 mit 24.000 Infektionen (Vivek *et al.*, 2010) oder 2007-2009 in Uganda mit über 10.000 Erkrankten (Teshale *et al.*, 2010), ist hauptsächlich der Genotyp HEV-1 verantwortlich.

Die Genotypen HEV-3 und HEV-4 werden vorwiegend zoonotisch, vor allem über die Nahrung, übertragen (RKI, 2015). Der Genotyp HEV-4 ist hauptsächlich in China und der Mongolei verbreitet. In den meisten Industriestaaten, wie Nordamerika, Australien und Europa, kommt überwiegend der Genotyp HEV-3 vor (Clemente-Casares *et al.*, 2003; Meng, 2010; Dalton *et al.*, 2014). Auch in Europa konnten vereinzelt HEV-Ausbrüche, vorwiegend mit zoonotischen Genotypen, beobachtet werden. Zum Beispiel wurde bei 33 Passagieren eines Kreuzfahrtschiffes, die 2008 nach Großbritannien zurückkehrten, eine akute HEV-3-Infektion festgestellt. Die Personen wurden vermutlich durch den Konsum von Meeresfrüchten mit HEV infiziert (Said *et al.*, 2009). Außerdem wurde 2011 von einem kleinen HEV-4-Ausbruch in Italien berichtet, wobei die Übertragungsrouten jedoch nicht bekannt war (Garbuglia *et al.*, 2013). In Deutschland ist der Genotyp 3 vorherrschend (Vollmer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018B). Die bisher identifizierten möglichen Übertragungswege von HEV auf den Menschen in Deutschland sind in Abschnitt 1.4.3 im Detail dargestellt.

1.4.3 Übertragungswege und Vorkommen in Deutschland

In Deutschland und mehreren anderen europäischen Ländern werden ansteigende HEV-Infektionen, hauptsächlich mit dem Genotyp 3, berichtet (Adlhoch *et al.*, 2016). Es gibt verschiedene HEV-Übertragungswege auf den Menschen. HEV können indirekt von Mensch zu Mensch, über die fäkal-

orale Route, den Kontakt zu infizierten Tieren oder durch Fleischkonsum auf den Menschen übertragen werden (Abb. 5).

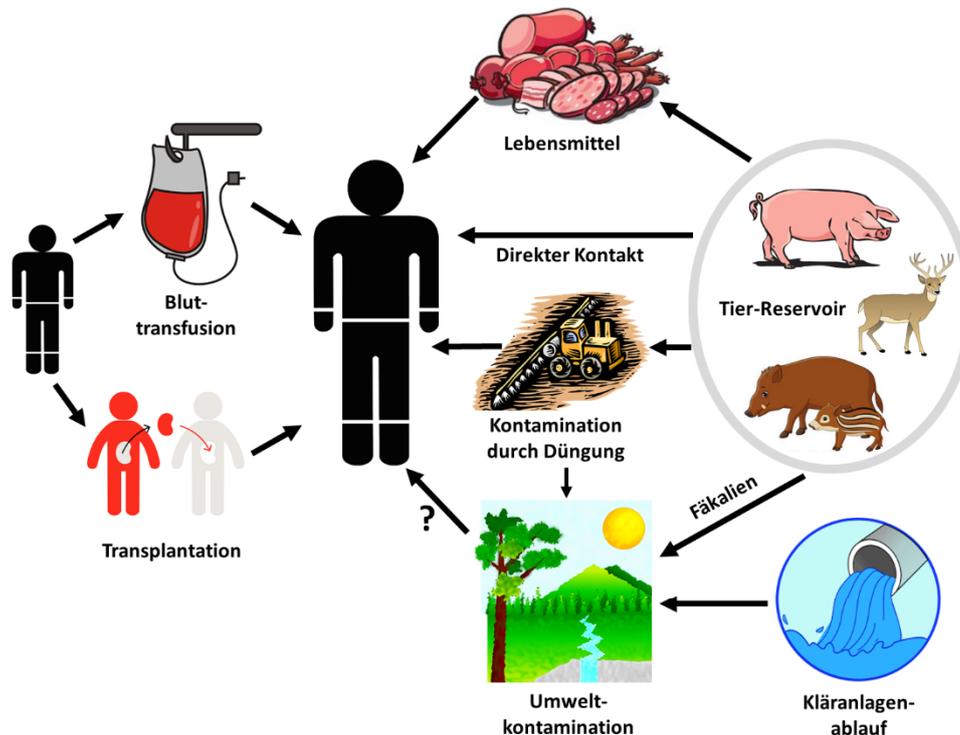


Abbildung 5: Potenzielle Übertragungswege des HEV Genotyps 3 auf den Menschen in Deutschland.

Die potenziellen Übertragungswege des in Deutschland vorherrschenden HEV-3 Genotyps sind in Abbildung 5 gezeigt. Eine indirekte Übertragung von Mensch zu Mensch ist über Organ-Transplantationen (Schlosser *et al.*, 2011) oder Bluttransfusionen (Huzly *et al.*, 2014; Nelson, 2014) möglich. Das Paul-Ehrlich-Institut hat daraufhin reagiert und angeordnet, dass in Deutschland ab dem Jahr 2021 alle Blutkomponenten von Spendern auf HEV getestet werden müssen [Internetquelle 3]. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch kommt nur bei den Genotypen HEV-1 und HEV-2 vor (RKI, 2015). HEV werden hauptsächlich durch den Konsum von rohen oder halbgegartem Fleischprodukten von infizierten Tieren auf den Menschen übertragen (Banks *et al.*, 2004; Meng, 2013). In Deutschland wurden Schweineleberproben auf HEV RNA untersucht und in 4 % der Proben detektiert (Wenzel *et al.*, 2011). Durch eine ausreichende Erhitzung des Fleisches lässt sich dieses Risiko jedoch vollständig eliminieren (Schielke *et al.*, 2011). Auch der direkte Kontakt zu HEV infizierten Tieren steigert, vor allem für Schlachter, das Risiko einer HEV-Infektion (Krumbholz *et al.*, 2012 und 2014A). Eine fäkal-orale Route der HEV-Übertragung ist ebenfalls möglich, da die Viren von infizierten Menschen und Tieren mit dem Stuhl ausgeschieden werden (Balayan, 1983). Fäkal verunreinigtes Oberflächenwasser in der Umwelt könnte ebenfalls ein HEV-Infektionsrisiko darstellen. Die Virusbelastung in der Umwelt kann mehrere Ursprünge haben. Zum einen werden Fäkalien von Schweinen für die Düngung von Feldern genutzt, welche wiederum in die Umwelt gelangen können (Krog *et al.*, 2017). Durch den Einsatz von Gülle kann auch die Ernte, wie es bei Erdbeeren festgestellt wurde, kontaminiert werden (Brassard *et al.*, 2012). Außerdem könnten Exkremente von Wildschweinen die Umwelt mit HEV belasten sowie tierische und menschliche Fäkalien, die über Kläranlagenabläufe in Oberflächengewässer gelangen können. Die Übertragung von HEV über fäkal

kontaminiertes Wasser auf den Menschen ist in Entwicklungsländern für die Genotypen HEV-1 und HEV-2 bekannt. Diese Genotypen werden in Deutschland vereinzelt bei infizierten Reiserückkehrern diagnostiziert. Die Rolle der wasserbasierten HEV-Übertragung des zoonotischen HEV-3 wurde bislang nur vermutet (Hakim *et al.* 2017; Fenaux *et al.*, 2019). Eine indirekte HEV-Übertragung über die Wasserroute scheint jedoch möglich zu sein, da in Meeresfrüchten der zoonotische Genotyp 3 nachgewiesen werden konnte (Crossan *et al.*, 2012). Außerdem hat eine Studie den beruflichen Kontakt mit Abwasser als einen Risikofaktor identifiziert, der mit autochonen Hepatitis-E-Fällen in Deutschland assoziiert ist. Das unterstützt die Annahme, dass eine wasserbasierte Übertragung von HEV-3 möglich ist (Faber *et al.*, 2018B).

Seit 2001 ist die HEV-Infektion beim Menschen eine meldepflichtige Erkrankung in Deutschland und wurde in das Infektionsschutzgesetz aufgenommen. Abbildung 6 demonstriert die Anzahl an gemeldeten HEV-Erkrankungen von 2001 bis 2019 in Deutschland.

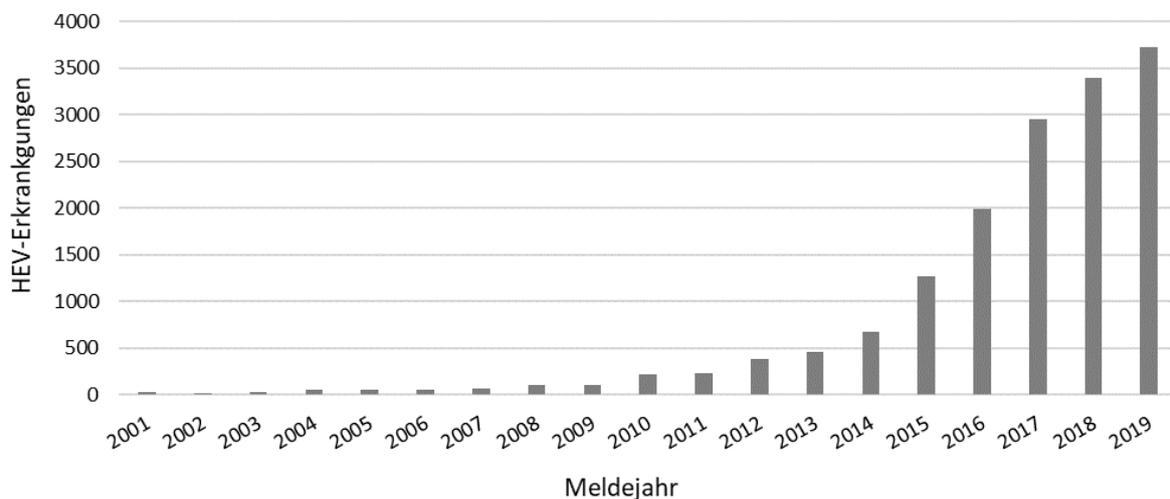


Abbildung 6: An das RKI gemeldete HEV-Erkrankungen von 2001 bis 2019 in Deutschland [Internetquelle 4].

In den letzten Jahren konnte ein kontinuierlicher Anstieg an gemeldeten HEV-Erkrankungen in Deutschland verzeichnet werden (Abb. 6). Im Jahr 2019 wurden ca. 3.700 Neuinfektionen registriert. Diese Steigerung lässt sich zum Teil durch eine gesteigerte Aufmerksamkeit sowie die Verbesserung der Nachweismethoden erklären. In Deutschland herrscht eine Seroprävalenz für HEV-spezifische IgG-Antikörper von 1 % in Kindern (Krumbholz *et al.*, 2014B) und ca. 15 % unter Erwachsenen (Faber *et al.*, 2018A). Basierend auf der hohen Seroprävalenz im Vergleich zu den relativ geringen Meldezahlen von Neuinfektionen kann davon ausgegangen werden, dass es viele unerkannte oder subklinische HEV-Infektionen in Deutschland gibt.

Bislang gibt es einige Studien aus Deutschland, die das Vorkommen von HEV in Patienten und deren Genotypen bestimmten. Im Jahr 2011 wurden Proben von Blutspendern auf HEV getestet und der Genotyp HEV-3c am häufigsten, neben HEV-3a und HEV-3e, identifiziert (Vollmer *et al.*, 2012). Im ersten deutschen klinischen Report einer akuten Hepatitis-E-Erkrankung während einer Schwangerschaft wurde ebenso der Genotyp HEV-3c nachgewiesen (Tabatabai *et al.*, 2014). Kürzlich wurden in einer deutschen Untersuchung HEV-Genotypen in Blut- und Stuhlproben von chronisch HEV infizierten Patienten aus Berlin, Hamburg und Hannover bestimmt. In diesen Proben von 2009 bis

2016 wurde vorwiegend der Genotyp HEV-3c charakterisiert, seltener HEV-3e und HEV-3f (Wang *et al.*, 2018B). In zwei weiteren Veröffentlichungen wurde ebenfalls HEV-3c als vorherrschender Typ in Deutschland (Adlhoch *et al.*, 2016) und der gesamten Europäischen Union beschrieben (EFSA, 2017).

Auch in deutschen Hausschweinen wurden mehrfach hohe HEV-Seroprävalenzen nachgewiesen, wobei durchschnittlich 43 % - 50 % aller Tiere IgG-Antikörper gegen HEV besaßen (Baechlein *et al.*, 2010; Dremsek *et al.*, 2013; Krumbholz *et al.*, 2013). In Wildschweinen aus verschiedenen Regionen in Deutschland wurden ähnliche Raten von HEV-Antikörpern (41 % - 45 %) in Blutproben detektiert. Leberproben von Wildschweinen aus Deutschland wurden ebenfalls auf HEV RNA mittels RT-qPCR untersucht. Dabei waren 15 % - 18 % der Proben HEV positiv, was wiederum auf aktive Infektionen hindeutet (Schielke *et al.*, 2009; Schielke *et al.*, 2015; Anheyer-Behmenburg *et al.*, 2017). Berlin (3,8 Millionen Einwohner) ist nicht nur die Hauptstadt Deutschlands, sie wird auch immer wieder als Hauptstadt der Wildschweine mit einer geschätzten Population von 5.000 Individuen bezeichnet (Schielke *et al.*, 2009). Die Stadt beherbergt die größte urbane Wildschweinpopulation Deutschlands. Sie sind vor allem in Wäldern vorzufinden, welche 20 % Berlins bedecken. Innerhalb von Berlin sind die Wildschweine vor allem im Grunewald und im Bezirk Treptow-Köpenick anzufinden (Abb. 7, modifiziert nach Stillfried *et al.*, 2017). Die Tiere scheinen in diesen Gebieten endemisch zu sein, da sie schon seit längerer Zeit dort vorgefunden werden (Kotulski und König, 2008). In diesem urbanen Raum wurden bereits Lebergewebeproben von Wildschweinen auf HEV RNA untersucht und die Genotypen bestimmt. In Berlin wurde z. B. ein Tier positiv auf HEV getestet und der Genotyp als HEV-3c oder HEV-3g angegeben. Der Genotyp HEV-3a wurde in zwei Wildschweinen aus Potsdam identifiziert (Schielke *et al.*, 2009).

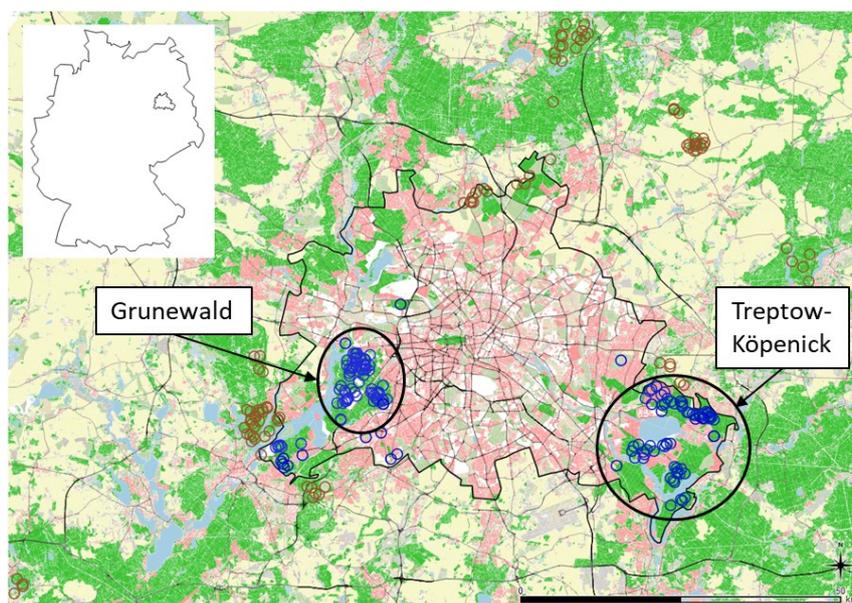


Abbildung 7: Hauptvorkommen von Wildschweinen in Berlin. Gezeigt sind die Probenahmestellen erlegter Wildschweine innerhalb (blau) und außerhalb (braun) von Berlin, die mit der Auftrittswahrscheinlichkeit der Tiere in der Stadt korrelieren (mod. Stillfried *et al.*, 2017).

1.4.4 Untersuchungen in Patienten und Umweltproben in Europa

Die HEV-Seroprävalenz der europäischen Bevölkerung ist recht hoch. In einigen Ländern wurde das Vorkommen von HEV-spezifischen-IgG-Antikörpern in Blutspendern bestimmt. Dabei ergaben sich HEV-Seroprävalenzen von 17 % in Frankreich, 21 % in Dänemark, 11 %-20 % in Spanien (abhängig vom

Assay), 14 % in Österreich bis hin zu 49 % in Italien (Mansuy *et al.*, 2008; Christensen *et al.*, 2008; Sauleda *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2015; Lucarelli *et al.*, 2016). Die Anzahl von gemeldeten, im Labor nachgewiesenen HEV-Fällen steigt in den meisten europäischen Ländern stetig an (Adlhoch *et al.*, 2016).

Im Gegensatz zu Deutschland wurden in einigen Ländern Europas bereits Umweltproben auf HEV untersucht, um das Vorkommen und oftmals auch die HEV-Genotypen zu bestimmen. Hauptsächlich wurden Abwasserproben aus Kläranlagen getestet. In einigen Studien aus Spanien und Italien wurde nur das ungeklärte Abwasser beprobt (Pina *et al.* 1998; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010; La Rosa *et al.* 2010; Alfonsi *et al.* 2018). In anderen Untersuchungen aus Spanien und Italien sowie der Schweiz, Frankreich, Portugal und Schweden wurde das HEV-Vorkommen sowohl in Zu- als auch in Abläufen der Kläranlagen bestimmt (Masclaux *et al.* 2013; Rusiñol *et al.*, 2015; Miura *et al.*, 2016; Iaconelli *et al.*, 2017; Matos *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018A). Die ersten monatlichen Überwachungen des Vorhandenseins von HEV in Abwasserproben wurden in Italien und Norwegen über ein Jahr hinweg durchgeführt sowie in Großbritannien über einen Zeitraum von 9 Monaten (Idolo *et al.*, 2013; Myrmel *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016A). Da Kläranlagenabläufe meist in Oberflächengewässer eingeleitet werden, wurden Flussproben in den Niederlanden, Spanien und Italien ebenfalls auf HEV untersucht (Rutjes *et al.*, 2009; Rusiñol *et al.*, 2015; Idolo *et al.*, 2013; Iaconelli *et al.*, 2017). Trinkwasserproben wurden weniger häufig auf HEV getestet, von Italien und Schweden gibt es Untersuchungen dazu (Iaconelli *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Wie bereits erwähnt, gab es in Deutschland bislang kaum Informationen zum HEV-Vorkommen in der Umwelt. Die aus der vorliegenden Doktorarbeit entstandene Veröffentlichung (Beyer *et al.*, 2020) beschreibt zum ersten Mal das HEV Vorkommen im Wasserkreislauf deutscher Großstädte.

1.5 Cosaviren

1.5.1 Charakterisierung, Taxonomie, Genom, Lebenszyklus

Cosaviren (*common stool associated picornavirus*, CoSV) wurden im Jahr 2008 durch Metagenomanalysen erstmals beschrieben. Sie wurden in Stuhlproben von pakistanischen Kindern identifiziert, die an einer AFP litten, die nicht auf Polioviren zurückzuführen war (Kapoor *et al.*, 2008). Cosaviren zirkulieren wahrscheinlich schon deutlich länger in Menschen. Sie wurden in einer archivierten Stuhlprobe von 1981 identifiziert, die von einem australischen Kind mit Durchfallerkrankung stammte (Holtz *et al.*, 2008). Als Wirte der CoSV wurden bislang hauptsächlich Menschen und auch Schweine identifiziert (Okitsu *et al.*, 2016).

Cosaviren bilden eine eigene Gattung in der sehr umfangreichen Familie der *Picornaviridae*. Diese Virusfamilie umfasst noch 46 weitere Gattungen, unter anderem die prominente Gattung der Enteroviren, die sich wiederum in 15 Spezies unterteilt, zu denen Coxsackieviren, Echoviren, Polioviren und Rhinoviren gehören. Die Gattung *Cosavirus* ist mit den 5 Spezies *Cosavirus A*, *-B*, *-D*, *-E* und *Cosavirus F* hingegen überschaubar. Die *Cosavirus* Spezies A unterteilt sich in die Genotypen A1-A24 und die Spezies D besitzt die Genotypen D1-D5. Die Spezies B, E und F hingegen haben jeweils nur einen Genotyp. Die offizielle Beschreibung der *Cosavirus* Spezies C ist noch ausstehend, da die Virussequenz bislang unvollständig ist (ICTV). Cosaviren sind unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 30 nm. Ein Virionquerschnitt und die Kapsidoberfläche der CoSV sind in Abbildung 8 dargestellt.

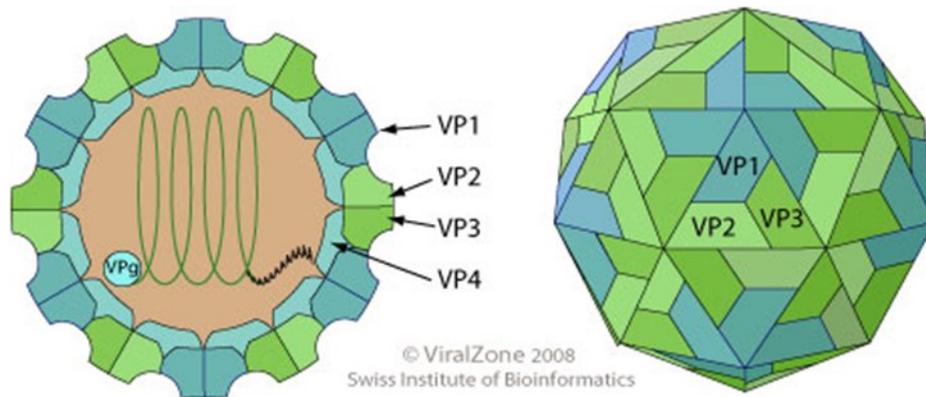


Abbildung 8: Querschnitt und Oberfläche eines CoSV-Virions mit ikosaedrischer Symmetrie [Internetquelle 5].

Das Kapsid der CoSV ist ein Ikosaeder, der aus insgesamt 180 Kapsidproteinen zusammgebaut ist. Das T=pseudo3 Kapsid besteht dabei aus 60 asymmetrischen Einheiten, die sich wiederum aus drei verschiedenen Proteinen (VP1, VP2, VP3) zusammensetzen. Das vierte Kapsidprotein (VP4) befindet sich an der Innenseite des Kapsids [Internetquelle 6]. Cosaviren haben ein 7,6 kb - 7,8 kb großes, einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität, das genetisch sehr divers ist (Kapusinszky *et al.*, 2012). Das RNA-Genom und die daraus translatierten viralen Proteine sind in der nachfolgenden Abbildung 9 dargestellt.

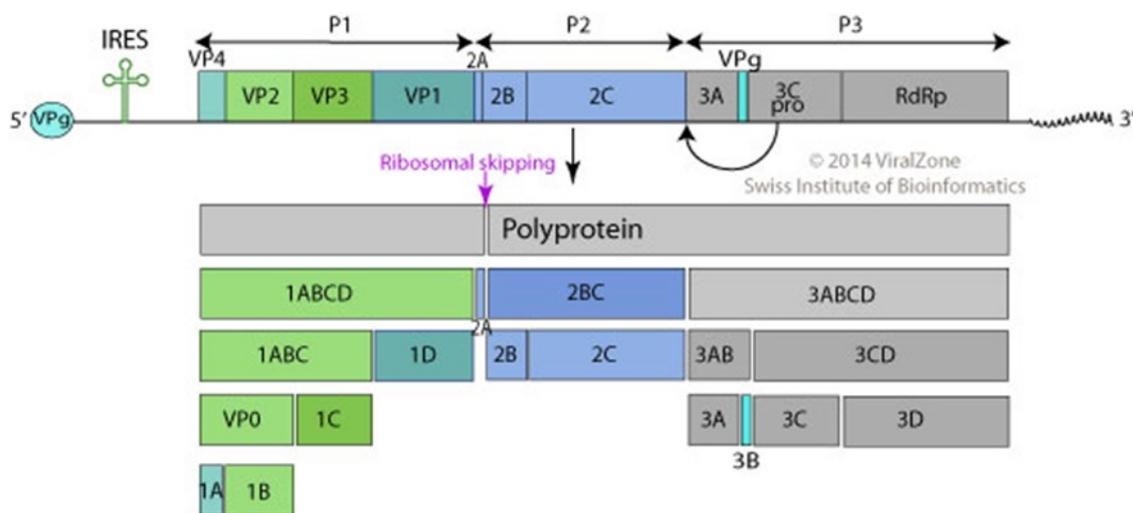


Abbildung 9: Das RNA-Genom der CoSV und die daraus resultierenden 11 viralen Proteine. Alle Proteine werden aus einem Polyprotein gebildet, das in verschiedene Vorläuferproteine gespalten wird, aus denen die funktionellen Proteine entstehen [Internetquelle 5].

Die nun folgende Genom- und Lebenszyklusbeschreibung der CoSV basiert auf den Charakteristika und Mechanismen, welche für die meisten Picornaviren übereinstimmend sind. Das RNA-Genom der Viren dient gleichzeitig als virale *messenger* RNA. Am 5'-Ende der genomischen RNA befindet sich ein virales kovalent gebundenes Protein (VPg), das bei allen Picornaviren vorkommt. Downstream davon liegt ein Bereich, der nicht translatiert wird, aber eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) vom Typ 2

besitzt. Diese RNA-Sekundärstruktur vermittelt die Bindung an Ribosomen und ermöglicht die direkte Translation des Polyproteins, welches vom einzigen vorhandenen ORF kodiert wird. Das Polyprotein besteht aus 2113 bis 2133 Aminosäuren und wird in verschiedene Vorläuferproteine gespalten. Dies geschieht während der Translation durch Ribosomales *Skipping* und durch die viral kodierte Proteinase. Die Vorläuferproteine werden anschließend zu den viralen funktionellen Proteinen (1A-D, 2A-C, 3A-D) weiterverarbeitet. Das Polyprotein besitzt die drei Regionen P1, P2 und P3. Die RNA-P1-Region kodiert dabei für die vier Strukturproteine 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) und 1D (VP1), aus denen sich das Kapsid zusammensetzt. Nicht-Strukturproteine werden von den RNA-Regionen P2 und P3 kodiert. Die für die Replikation notwendige RdRp wird vom Protein 3D kodiert. Die Protease (3C) spaltet wahrscheinlich die Proteine des P2 und P3-Teils. Downstream des ORF1 liegt ein kurzer untranslatierter Bereich und am 3'-Ende befindet sich eine Poly-A-Sequenz (ICTV; Holtz *et al.*, 2008; Zell, 2018).

Untersuchte Sequenzdaten der CoSV weisen auf mögliche Rekombinationen zwischen den verschiedenen Spezies hin (Kapusinszky *et al.*, 2012).

Die Replikation der Picornaviren findet im Zytoplasma der Wirtszellen statt. In diese dringen die Viren mittels rezeptorvermittelter Endozytose ein. In den Endosomen verändert sich die Konformation des Viruskapsids und das Protein VP4 wird von der Innenseite freigesetzt. Dieses Protein ist an der Bildung von Ionenkanälen in der Endosomenmembran des Wirts beteiligt, wodurch das virale Genom aus dem Kapsid in das Zytoplasma gelangt (Danthi *et al.*, 2003). Dort wird das Protein VPg am 5'-Ende entfernt und die RNA in das Polyprotein translatiert. Die Replikation findet dann in Multimer-Replikations-Komplexen statt. Diese bestehen aus Vesikeln, welche aus dem Endoplasmatischen Retikulum stammen, viralen Nicht-Strukturproteinen und deren Vorläuferproteinen sowie Wirtsfaktoren. Die RdRp synthetisiert von der viralen RNA mit positiver Polarität eine negativ-strängige RNA. Diese dient wiederum als Template für die Vervielfältigung der genomischen Virus-RNA mit positiver Polarität. Die neu synthetisierten viralen Genome werden in vorgefertigte Prokapside verpackt und die Virionen werden durch Lyse der Zelle freigesetzt (Chase und Semler, 2012; Zell, 2018).

1.5.2 Krankheitssymptome und Verbreitung weltweit

Humane Cosaviren infizieren hauptsächlich Kinder. In Erwachsenen sind sie sehr selten und vermutlich nicht pathogen (Stöcker *et al.*, 2012). Das durchschnittliche Alter von CoSV-positiven Kinder liegt bei 5,2 Jahren und die Infektionen sinken mit ansteigendem Alter (Maan *et al.*, 2013). Cosavirus-Infektionen werden mit AFP assoziiert, obwohl auch Infektionen in gesunden Kindern beobachtet wurden (Kapoor *et al.*, 2008). Durchfall scheint außerdem ein typisches Symptom beim Auftreten von CoSV zu sein (Holtz *et al.*, 2008; Khamrin und Maneekarn, 2014; Ayouni *et al.*, 2016). Durchfallerkrankungen können schwerwiegend sein, auf der Welt sterben jährlich allein eine halbe Million Kinder unter 5 Jahren daran [Internetquelle 7]. Cosaviren, deren mögliche Symptome Lähmungen und Durchfall sind, wurden bereits in verschiedenen Regionen der Welt in Patienten- oder Umweltproben nachgewiesen (Abb. 10).

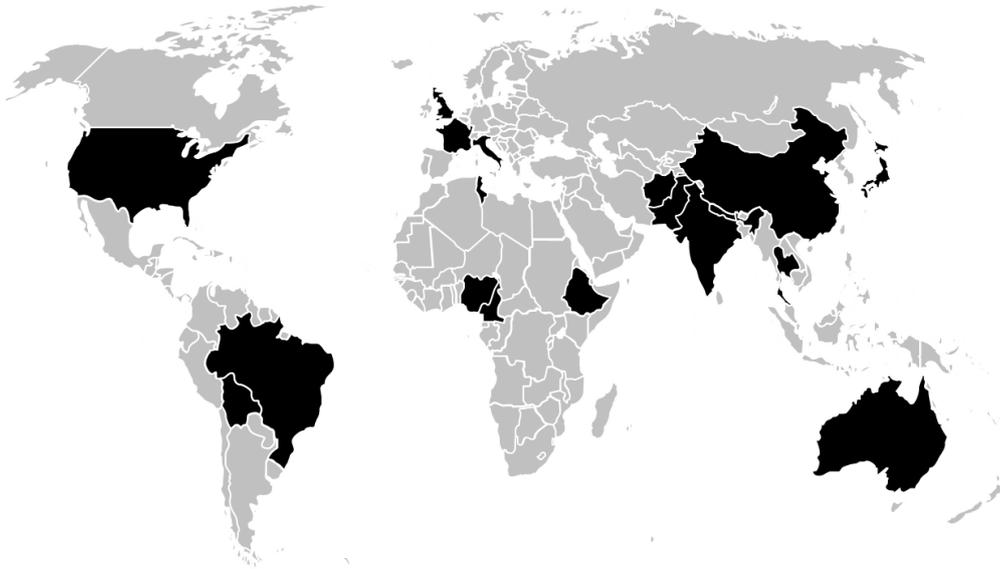


Abbildung 10: Länder, in denen bereits CoSV detektiert wurden, sind auf der Weltkarte in schwarz gekennzeichnet (Karte erstellt basierend auf veröffentlichten Publikationen).

Cosaviren wurden bisher in mindestens 18 Ländern auf allen Kontinenten der Welt in Patienten- oder Umweltproben detektiert (Abb. 10). Die möglichen Übertragungswege sind bisher nicht detailliert bekannt, es wird jedoch von einer fäkal-oralen Verbreitung ausgegangen. In Europa wurden CoSV bislang nur in Patientenproben aus Großbritannien und Italien sowie in Umweltproben aus Frankreich detektiert (Holtz *et al.*, 2008; Campanini *et al.*, 2013; Prevost *et al.*, 2015).

1.5.3 Bisherige EV- und CoSV-Untersuchungen

Über die Verbreitung von Cosaviren in Deutschland gibt es bisher wenig Informationen. In Deutschland kam es in den letzten Jahren jedoch zu einer Häufung von Poliovirus-ähnlichen Erkrankungsfällen mit AFP. In der bundesweiten Enterovirus (EV)-Surveillance wurden von 2010-2018 jährlich 29-76 Proben, überwiegend von Patienten unter 15 Jahren, mit AFP auf Enteroviren untersucht. Davon waren jeweils bis zu 14 % der Proben positiv für EV-RNA, wobei nicht eindeutig zu klären war, ob diese Viren auch die Verursacher der Lähmungen waren. In den übrigen Patienten konnte kein möglicher Erreger identifiziert werden und Poliovirusinfektionen wurden ausgeschlossen (Diedrich und Böttcher, 2017). Die Patientenproben wurden im Rahmen der Enterovirus-Surveillance nicht auf CoSV untersucht. Cosaviren können somit nicht als Verursacher der Lähmungen, an denen die Kinder litten, ausgeschlossen werden.

Akute schlanfe Lähmungen können neben Polioviren auch andere Ursachen haben. Diese können nicht viralen Ursprungs (Nervenentzündung, neurologische Erkrankungen, Nervengift) oder viralen Ursprungs sein und durch Non-Polio Enteroviren, West-Nil-Viren, Zika-Viren oder eben Cosaviren verursacht werden. In Stuhlproben von pakistanischen Kindern konnte gezeigt werden, dass in Patienten mit AFP der Anteil an EV- und CoSV-Detektionen anstieg (Kapoor *et al.*, 2008). Auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Cosaviren im Stuhl eines aus Pakistan eingereisten Kindes mit Non-Polio AFP detektiert, welches in Deutschland hospitalisiert wurde. Es wurde vermutet, dass Cosaviren an der Entstehung der Lähmungserscheinungen beteiligt waren, da ansonsten keine anderen relevanten Pathogene nachgewiesen werden konnten (Schneider *et al.*, 2021). Da CoSV mit dem Stuhl ausgeschieden werden, können sie ins Abwasser gelangen und dort nachgewiesen werden.

In einigen Ländern wurden ungeklärte Abwässer bereits auf CoSV untersucht. In den USA wurden 2008 und 2015 CoSV im Abwasser nachgewiesen und die Virusspezies charakterisiert (Blinkova *et al.*, 2008; Kitajima *et al.*, 2015). Des Weiteren wurden in Nepal, Japan und Italien Kläranlagenproben entnommen und CoSV darin detektiert (Ng *et al.*, 2012; Haramoto und Otagiri, 2014; Ferraro *et al.*, 2018). Auch in geklärten Abwasserproben oder Flüssen konnten in Japan, den USA, Nepal und Frankreich CoSV nachgewiesen werden (Haramoto und Otagiri, 2014; Kitajima *et al.*, 2015; Prevost *et al.*, 2015; Tandukar *et al.*, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden deutsche Kläranlagen und Oberflächengewässern auf Cosaviren untersucht.

1.6 Verfahren zur Aufkonzentrierung von Viren aus Wasserproben

Humanpathogene Viren, wie HEV und CoSV, kommen meistens in geringen oder sehr geringen Mengen in der Umwelt vor. Vor allem in Oberflächengewässern werden Viren nach Kontaminationsereignissen durch Verteilungsprozesse schnell verdünnt. Viren in Wasserproben müssen deshalb vor der molekularbiologischen Analyse aufkonzentriert werden. Die meisten Aufkonzentrierungsverfahren basieren auf einer Membranfiltration, Glaswollefiltration, Ultrazentrifugation oder Fällungsreaktion (Selinka *et al.*, 2011). Da jedes Virus eine spezifische Oberflächen- und Genomstruktur besitzt, gibt es für die Virusaufkonzentrierung keine Methode der Wahl, welche für alle gleichermaßen geeignet wäre. Dies wird auch in einer Studie deutlich, welche vier Anreicherungsmethoden: Polyethylenglykol-Fällung (PEG), organische Flockung mit Magermilchpulver (SMF), Glaswollefiltration (GW) und monolithische Adsorptionsfiltration (MAF) miteinander vergleicht, um 14 verschiedene humanpathogene Virusfamilien in Abwasserproben nachzuweisen (Hjelmsø *et al.*, 2017). Für die Detektion der verschiedenen Viren war nicht jede Methode gleich gut anwendbar. Das Nukleinsäureextraktionskit hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse der Virusdetektion, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie die Methode der Virusanreicherung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Viren aus Umweltproben hauptsächlich mittels Ultrazentrifugation und PEG-Fällung aufkonzentriert und mit Direktproben ohne Aufkonzentrierungsverfahren verglichen. Diese Methoden wurden gewählt, da sie bereits häufiger bei HEV-Untersuchungen eingesetzt wurden und auch schon erfolgreich für die Detektion von CoSV getestet wurden. Diese Techniken sind außerdem einfacher und sicherer in der Handhabung im Vergleich zu Filtrations- oder Adsorptions/Elutions-Verfahren.

1.7 Virusnachweisverfahren

1.7.1 Nested- und quantitative RT-PCR

Zum Nachweis von Viren aus Umweltproben werden hauptsächlich molekulare Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Bosch, 1998; Girones *et al.*, 2010). Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem die DNA bzw. RNA von Viren nachgewiesen werden kann. Für RNA-Viren, wie es HEV und CoSV sind, ist vor der eigentlichen PCR eine Reverse Transkription notwendig. Bei dieser Reaktion wird die RNA des Virusgenoms in eine komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase (RT) umgeschrieben.

Bei der *nested*-RT-PCR wird eine variable Region des HEV-Genoms amplifiziert, um im Anschluss eine Genotypisierung des detektierten HEV-Stamms durchführen zu können. Das Prinzip der *nested*-PCR ist die Synthese eines längeren Fragmentes in der ersten PCR, welches als Template in einer zweiten PCR

eingesetzt wird, um wiederum einen kürzeren Abschnitt innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes zu vervielfältigen. Durch dieses Verfahren können auch Proben mit einer geringen Ausgangsmenge an PCR-Template so weit vervielfältigt werden, dass genug PCR-Produkt für eine Genotypisierung vorhanden ist. Mit der *nested*-PCR kann jedoch keine quantitative Aussage über die Ausgangskonzentration der Viren in den Umweltproben getroffen werden.

Diese Quantifikation bzw. Konzentrationsbestimmung der Viren in Umweltproben ist mit der quantitativen RT-PCR (RT-qPCR) hingegen möglich. Bei dieser Methode wird eine spezielle Sequenz im HEV- bzw. CoSV-Genom amplifiziert, die bei allen Genotypen nahezu identisch ist. In der RT-qPCR wird neben den Primern eine TaqMan[®]-Sonde mit gekoppeltem Farbstoff und Quencher verwendet, dessen Fluoreszenz in den Umweltproben und in den parallel mitlaufenden internen Standards in Echtzeit gemessen wird. Die qPCR-Methode ist ein Verfahren, um Viren sensitiv, spezifisch und schnell zu detektieren (Girones *et al.*, 2010). Die Amplifikation der Nukleinsäuren während der qPCR kann jedoch durch inhibierende Substanzen wie Proteine, Fette, Polysaccharide oder Salze beeinträchtigt werden. Die Inhibitoren können eine Fällung oder Denaturierung der DNA bewirken oder die Polymerasefunktion hemmen (Rossen *et al.*, 1992; Demeke und Jenkins, 2010). Da in Umweltproben viele unterschiedliche Komponenten mit potenziell inhibierender Wirkung vorhanden sein können, sollten grundsätzlich in den qPCR-Assays auch Inhibitionskontrollen eingesetzt werden.

Da Viruskonzentrationen mittels qPCR schnell bestimmt werden können, ist es möglich, auf deren Vorhandensein zu reagieren. Beispielsweise kann kontrolliert werden, ob sich noch Viren in Lebensmitteln nachweisen lassen. HEV wurden so bereits in Wurstwaren oder Meeresfrüchten detektiert (Wenzel *et al.*, 2011; Crossan *et al.*, 2012). In der Diagnostik ist die quantitative PCR auch eine wichtige Technik, um durch den Nachweis von HEV RNA eine aktive Infektion in Patienten zu identifizieren (Vollmer *et al.*, 2012; Tabatabai *et al.*, 2014). Auch in der Analytik von Umweltproben kann die qPCR eingesetzt werden, um die Reinigungsleistung von Kläranlagen in Bezug auf bestimmte Viren, unter anderen auch von HEV, zu bestimmen (Masclaux *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2018). Ebenfalls kann eine erhöhte humanpathogene Viruslast nach besonderen Wetterbedingungen wie Starkregen, der Mischwasserüberläufe oder Überflutungen verursachen kann, identifiziert werden (Fong *et al.*, 2010).

Mit der qPCR-Nachweistchnik ist jedoch keine Aussage über die Lebensfähigkeit oder die Intaktheit der Viruspartikel möglich. Die detektierte Viruskonzentration kann nicht mit infektiösen Viruspartikeln gleichgesetzt werden, da mit der qPCR nur die virale Nukleinsäure nachgewiesen wird (Selinka *et al.*, 2011). Virusgenome können demnach auch amplifiziert werden, wenn die Viruspartikel beschädigt sind bzw. die Viren nicht mehr infektiös sind. Für eine Risikoabschätzung der Gefahr, die von den nachgewiesenen humanpathogenen Erregern für die Bevölkerung ausgeht, sind jedoch nur Viren relevant, die infektiös sind. In Untersuchungen von Umweltproben wurde bereits gezeigt, dass oft ein großer Unterschied zwischen PCR- und Lebendnachweis-Ergebnissen besteht. So wurden in Proben von Abwässern, Flüssen und Trinkwasserbrunnen hohe Detektionsraten von Enteroviren, Adenoviren, Rotaviren und Hepatitis-A-Viren gefunden, deren Infektiosität jedoch mit Zellkulturverfahren nicht bestätigt werden konnte (Pina *et al.*, 1998; Borchardt *et al.*, 2004). Für HEV und CoSV gibt es bislang kein geeignetes Zellkulturverfahren, um die Infektiosität dieser Pathogene zu untersuchen. Durch die Zugabe von Propidiummonoazid in eine Probe kann die quantitative PCR jedoch so modifiziert werden, dass zwischen beschädigten und intakten Viruspartikeln unterschieden werden kann. Sind die Viruspartikel intakt, kann wiederum davon ausgegangen werden, dass sie auch potenziell noch infektiös sind (siehe Abschnitt 1.7.2).

1.7.2 PMA-RT-qPCR

Die Propidiummonoazid (PMA)-RT-qPCR kann einen Hinweis darauf geben, ob Viruspartikel in einer Probe beschädigt oder intakt und somit potenziell infektiös sind. Vor der Nukleinsäureisolierung und qPCR findet dabei eine Behandlung der Proben mit PMA statt. PMA ist ein Farbstoff, der mit freien Nukleinsäuren interagiert sowie in beschädigte Viruskapside eindringen kann und dort mit der DNA bzw. RNA interkaliert. Die kovalente Einlagerung der PMA-Moleküle wird durch die photoinduzierte Azidogruppe des Farbstoffes ermöglicht und findet während der Photoaktivierung unter Einwirkung von blauem LED-Licht statt. Durch die Belichtung werden außerdem nicht gebundene PMA-Moleküle inaktiviert. Sind die Viruskapside jedoch intakt, kann PMA nicht eindringen und die Nukleinsäure nicht modifizieren. Während der Nukleinsäureextraktion wird die mit PMA modifizierte DNA/RNA entfernt und das ungebundene PMA beseitigt. Der Farbstoff inhibiert außerdem die PCR-Amplifikation von Genomabschnitten mit interkalierten PMA-Molekülen, da die Polymerasen nicht mehr an die Nukleinsäuren binden können. Während der qPCR können somit nur Nukleinsäuren nachgewiesen werden, welche sich in einem intakten Viruskapsid befanden (Nocker *et al.*, 2006). Das Verfahren der PMA-qPCR ist bei Viren mit Einzel- oder Doppelstrang-DNA oder RNA anwendbar. Die Interaktion von interkalierenden Farbstoffen mit Einzelstrang-RNA ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die Interkalation in Sekundärstrukturen möglich ist, welche durch eine Photoaktivierung kovalent werden (Prevost *et al.*, 2016).

1.8 Indikatoren für fäkale Verunreinigungen: Bakteriophagen und humane Viren

Neben der Konzentration an HEV und CoSV wird in den Experimenten dieser Doktorarbeit in denselben Umweltproben zusätzlich auch die Konzentration an verschiedenen Indikatorviren für fäkale Verunreinigung gemessen. Dadurch ist es möglich, das Vorkommen an HEV und CoSV in der Umwelt und die Abbauraten während der Abwasseraufbereitung in den Kläranlagen mit diesen Indikatorviren zu vergleichen. Geeignete Indikatorviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht in unbelasteten Gewässern vorkommen, in größeren Mengen vorhanden sind als HEV und CoSV, sich nicht mehr außerhalb der Wirte vermehren können, in der Umwelt stabil sind und auch noch in niedrigen Konzentrationen nachweisbar bleiben (Bosch, 1998). Da HEV und CoSV von infizierten Personen mit dem Stuhl ausgeschieden werden, wurden für den Vergleich mit diesen ebenfalls enterale Viren herangezogen, die mit Excrementen in das Abwasser oder Oberflächenwasser gelangen. Es wurden somatische Coliphagen und F+-spezifische RNA-Phagen, welche Bakterien des Verdauungstraktes infizieren, quantifiziert. Außerdem wurden die Proben auf humane Adenoviren und Noroviren getestet, welche Zellen des menschlichen Darms infizieren. Die vier genannten Viren sind gängige Indikatoren für fäkale Kontaminationsereignisse (Ogorzaly *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015). Humanpathogene Adenoviren und Noroviren werden mittels PCR-Verfahren quantifiziert. Die Konzentrationen der Bakteriophagen werden im Gegensatz dazu mit einem Lebendnachweis anhand von Kulturverfahren (Plaqueassays) ermittelt. Die somatischen Coliphagen und F+-spezifischen RNA-Phagen infizieren dabei ihre Wirtszellen und lysieren diese, wodurch auszählbare Plaques in den Bakterienrasen entstehen.

Im Gegensatz zu den häufig herangezogenen bakteriellen Indikatoren besitzen Bakteriophagen ähnliche morphologische und biochemische Eigenschaften wie humanpathogene Viren. Somatische Coliphagen und F+-spezifische RNA-Phagen korrelieren mit dem Vorkommen von enteralen Viren. Sie wurden bereits als Indikatoren für humanpathogene Viren in Abwässern und Oberflächengewässern eingesetzt (Stetler, 1984; Havelaar *et al.*, 1993; Martin-Diaz *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2017). Des

Weiteren lassen sich Bakteriophagen abhängig von der Temperatur über einen längeren Zeitraum als bakterielle Fäkalindikatoren detektieren (Lucena *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2020). Die Bezeichnungen somatische- und F+-Phagen sind auf den jeweiligen Infektionsweg zurückzuführen. Somatische Coliphagen binden an Rezeptoren in der Bakterienmembran, die Infektion erfolgt somit über den Zellkörper (Soma) des Bakteriums (Michel *et al.*, 2010). F-spezifische Bakteriophagen hingegen binden bei der Infektion an einen Zellfortsatz von Bakterien, der F-Pilus genannt wird und dem horizontalen Gentransfer dient. Bakterien, die ein F-Pilus ausbilden können, besitzen ein F-Plasmid und werden folglich als F-positiv (F+) bezeichnet. Phagen, die den F-Pilus von Bakterien infizieren, werden daher F+-spezifische Bakteriophagen genannt. Somatische Coliphagen besitzen ein DNA-Genom, welches sich in einem ikosaedrischen Kapsid befindet. Ansonsten sind sie eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die Mitglieder gehören zu den Virusfamilien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae*, welche alle aus einem Kopf (60 - 110 nm) und einem Schwanzteil (20 - 455 nm) bestehen und eine doppelsträngige DNA besitzen. Eine weitere Familie der somatischen Coliphagen stellen die *Microviridae* dar. Diese Phagen besitzen eine Einzelstrang-DNA, einen Durchmesser von 26 nm und keinen Schwanz. Somatische Coliphagen infizieren *Escherichia coli* oder eng mit *E. coli* verwandte *Enterobacteriaceae* (Ackermann, 2006; Burbano-Rosero *et al.*, 2011, ICTV Stand 2019). Die F+-spezifischen RNA-Phagen bilden eine homogenere Gruppe und gehören alle zu der Virusfamilie *Leviviridae*. Sie besitzen wie die HEV und CoSV eine einzelsträngige RNA mit positiver Polarität und ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 26 nm (Bollback und Huelsenbeck, 2000; Kuzmanovic *et al.*, 2003; Ackermann, 2006; ICTV Stand 2019). Als Wirt dienen gram-negative Bakterien, die das F-Plasmid besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde *Salmonella enterica* als Wirtsbakterium verwendet.

Coliphagen wurden bereits vor mehreren Jahrzehnten als fäkale Indikatoren verwendet, um die Menge an Mikroorganismen im Wasser abschätzen zu können (Grabow *et al.*, 1984). In neueren Studien werden somatische Coliphagen und auch F+-spezifische Bakteriophagen als Indikatoren für Verunreinigungen von Gewässern mit Exkrementen eingesetzt. So wurde die fäkale Belastung von Flüssen in Frankreich (Ogorzaly *et al.*, 2009), Badestellen in Kalifornien (Jiang *et al.* 2001) und Spanien (Jesús *et al.*, 2007) oder verschiedene Freizeitgewässer in den USA (McMinn *et al.*, 2017) anhand dieser Phagen bewertet. In dem vom UBA durchgeführten Projekt FLUSSHYGIENE wurden ebenfalls die Konzentrationen an somatischen Coliphagen und F+-spezifischen Bakteriophagen bestimmt, um fäkale Verschmutzungen in Berliner Flüssen zu untersuchen (Selinka *et al.*, 2020).

Während Coliphagen von Menschen und Tieren stammen können, sind die in dieser Arbeit detektierten Adenoviren und Noroviren menschlichen Ursprungs. Außerdem werden die Phagen von allen Individuen ausgeschieden, wohingegen die humanpathogenen Adenoviren und Noroviren nur von aktuell erkrankten bzw. infizierten Personen mit dem Kot abgesondert werden. Humane Adenoviren gehören zur Spezies *Human mastadenovirus A* bis *Human mastadenovirus G*, welche in die Gattung *Mastadenovirus* und die Virusfamilie *Adenoviridae* einzuordnen sind. Die unbehüllten Virionen besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom und ein ikosaedrisches Kapsid mit einer Größe von 70 nm - 90 nm (ICTV, Stand 2019). Diese humanen Spezies gliedern sich wiederum in über 50 verschiedene Serotypen auf, die mit unterschiedlich schweren Verläufen und Symptomen in Verbindung gebracht werden. Atemwegs- und Durchfallerkrankungen sowie Bindehautentzündungen zählen zu den am häufigsten auftretenden Erscheinungen. Die Übertragung der Viren erfolgt fäkal-oral über Lebensmittel oder Wasser sowie über die Luft und Oberflächen durch Husten oder Niesen. Adenoviren kommen ganzjährig vor (Heim und Dürrwald, 2019; Price *et al.*, 2019).

In der Virusfamilie *Caliciviridae* besitzt die Gattung *Norovirus* nur die Spezies *Norwalk virus*. Diese einzelne Spezies unterteilt sich jedoch in 10 Genogruppen (GG) mit wiederum 49 Genotypen (Chhabra *et al.*, 2019). Die humanen Noroviren gehören zu den GG I, II, IV, VIII und IX. In Deutschland werden

Norovirus-Infektionen am häufigsten vom GG II verursacht (RKI, 2014). Humane Noroviren sind wie die HEV und CoSV unbehüllte, einzelsträngige RNA-Viren mit positiver Polarität. Sie besitzen einen Durchmesser von 35 nm -40 nm (ICTV, Stand 2019). Noroviren lösen bei Menschen Magen-Darm-Entzündungen (Gastroenteritiden) aus, die mit starkem Erbrechen und Durchfällen einhergehen. Die infektiösen Erreger werden von Mensch zu Mensch entweder fäkal-oral oder über das Erbrochene übertragen (RKI, 2000). Humane Noroviren kommen zwar das ganze Jahr über vor, vermehrt jedoch in den kühlen Monaten (Ahmed *et al.*, 2013).

1.9 Zielstellung der Arbeit

Angesichts der in Abschnitt 1.1 beschriebenen Motivation ist das Ziel dieser Arbeit, das Vorkommen von Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in Deutschland in der Umwelt zu untersuchen. Beides sind zoonotische, unbehüllte RNA-Viren, die vor allem Menschen und Schweine infizieren. Da humanpathogene Viren in Umweltproben meist in geringen Konzentrationen vorkommen, müssen sie vor der Analyse aufkonzentriert werden. Deshalb sollte zuerst ein Methodenvergleich durchgeführt werden, um geeignete Aufkonzentrierungsverfahren speziell für HEV und CoSV zu identifizieren. Die Viren werden dafür in den entnommenen Wasserproben mit Ultrazentrifugation, PEG-Fällung oder Glaswollefiltration aufkonzentriert und quantifiziert.

Um dann das Vorkommen von HEV und CoSV in der Umwelt zu bestimmen, sollten verschiedene Abwässer und Oberflächengewässer untersucht werden, da die Viren fäkal ausgeschieden werden. Zu den analysierten Wasserproben gehören Kläranlagenzuläufe und -abläufe, Mischwasserüberläufe, Flüsse, eine Badestelle und Oberflächengewässer aus Forstrevieren. Mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) sollten Detektionshäufigkeiten und Viruskonzentrationen dieser zoonotischen Viren ermittelt und verglichen werden. Diese Daten können Auskunft darüber geben, ob und in welchem Ausmaß HEV und CoSV in der Umwelt zirkulieren und dort eine mögliche Infektionsgefahr für die Bevölkerung darstellen könnten. Anhand der im Abwasser vorhandenen Viren lassen sich außerdem Rückschlüsse auf das Infektionsgeschehen in der deutschen Bevölkerung ziehen.

Da sich abhängig vom HEV-Genotyp die gesundheitliche Gefahr, vor allem für schwangere Frauen, stark unterscheidet, sollten die in der Umwelt vorkommenden HEV-Stämme weiter charakterisiert werden. Die vorherrschenden Genotypen können dabei durch Sequenzierungen von HEV-Genomabschnitten bestimmt werden. Zusätzlich sollten die in der Umwelt identifizierten Genotypen mit den aus Patienten isolierten HEV-Stämmen aus derselben Region verglichen werden.

Die ermittelten Konzentrationen an HEV und CoSV sollten außerdem mit anderen Indikatorviren für fäkale Verunreinigungen verglichen werden. Das Vorkommen von somatischen Coliphagen, F+-spezifischen RNA-Phagen, humanen Adenoviren und Noroviren sollte daher ebenfalls in den Abwasser- und Oberflächengewässerproben untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit lässt sich als *Nachweis und Charakterisierung von Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in Umweltproben* zusammenfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

1 L Zentrifugenbehälter für JLA 8.1 Rotor	Beckman Coulter
1 L-Weithals-Flaschen	Th. Geyer Gruppe
1 M Salzsäure (HCl); 1 M Natriumhydroxid (NaOH); 2-Propanol; Fleischextrakt, trocken, granuliert; Natriumchlorid (NaCl); Polyethylenglykol (PEG) 6000	Merck KGaA
50 ml Röhrchen steril und Pipetten für Pipetboy (10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Glasflaschen, Messzylinder	Schott AG
PBS Tabletten	Gibco
Pipetten (10 µl bis 5 ml) und Reaktionsgefäße PCR clean (0,5 ml bis 2,0 ml)	Eppendorf AG
Pufferlösungen zur Kalibrierung der pH-Meter pH 4, pH 7 und pH 10	WTW GmbH
Wasser Nuklease-frei, DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH & Co.KG

Geräte

Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH
Kühlschränke	Kirsch, Gorenje, Bosch
pH-Meter: pH 340i	WTW GmbH
Pipetboy INTEGRA	Biosciences AG
Reinstwasseranlage: Arium Mini	Sartorius AG
Rührer: IKAMAG REO oder IKA RET basic	IKA Werke GmbH & Co. KG
Sicherheitswerkbänke: Safe 2020, Typ HS12	Thermo scientific, Heraeus
Tiefkühlschränke	Liebherr, Bosch, Gesellschaft für Labortechnik mbH
Tischzentrifuge eppendorf centrifuge 5415R	Eppendorf AG
Vortexer: Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG
Waagen: EB Series oder sartorius TE2101	OHAUS Europe GmbH, Sartorius AG
Zentrifuge: Avanti J-26 XP mit Rotoren JS 5.3, JLA 8.1	Beckman Coulter

Alle spezifischen Chemikalien, Materialien und Geräte sind in den jeweiligen Abschnitten mit Angabe des Herstellers erwähnt.

2.2 Probenahmen

Zur Wasserprobenentnahme wurde mit einem Schöpfer, befestigt an einer Teleskopstange (Bürkle GmbH), Wasser aus einer Tiefe von ca. 30 cm unter der Wasseroberfläche entnommen. Die Proben wurden in 1 L-Weithals-Flaschen gefüllt und bis zum Labor in einer Thermobox transportiert. Für jede Probe wurden Datum, Uhrzeit, Ort, Probenehmer, Wassertemperatur und der Probeneingang im Labor notiert. Um die Viruslast in verschiedenen Umweltproben bestimmen und vergleichen zu können, wurden Abwasserproben sowie Oberflächengewässerproben und Sedimentproben genommen und anschließend auf verschiedene Viren analysiert. Die wichtigsten Probenahmestellen in Berlin sind in der Abbildung 11 gezeigt.

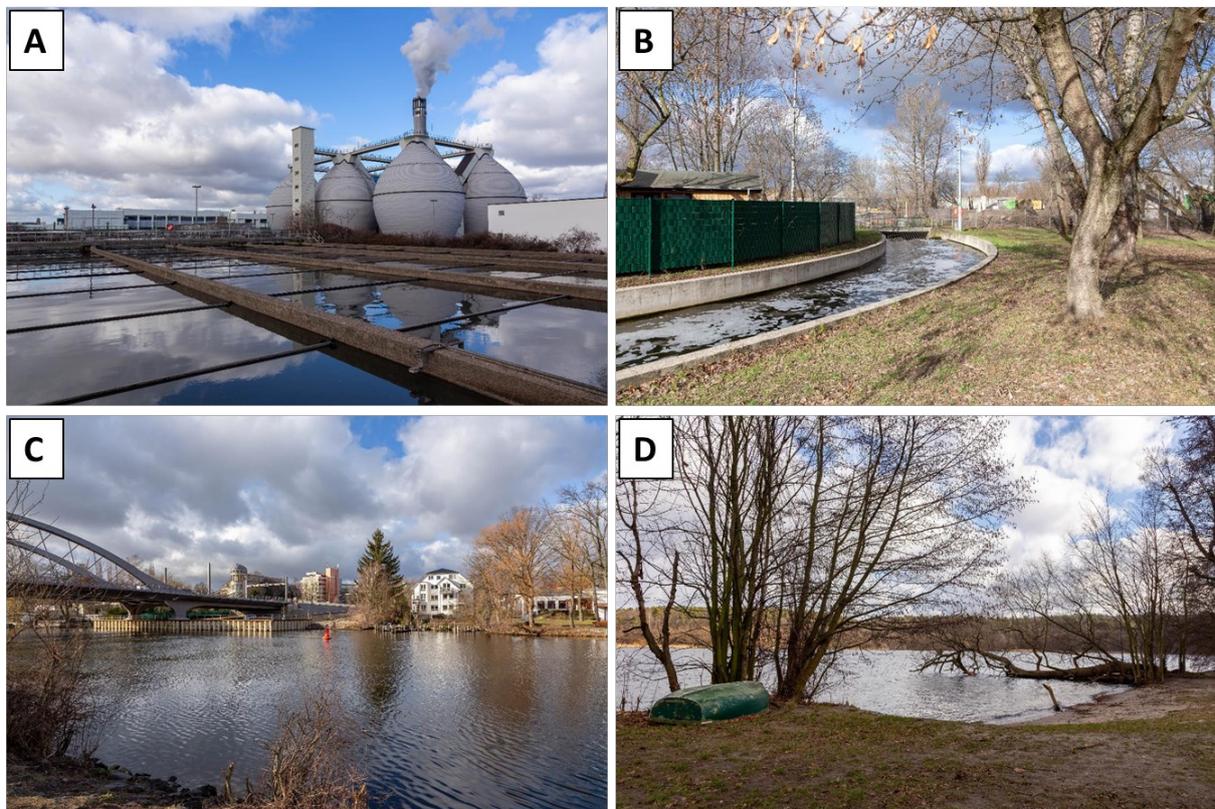


Abbildung 11: Vier Probenahmestandorte in Berlin Spandau. (A) Kläranlage Ruhleben Zulauf nach Grobrechen, (B) Kläranlage Ruhleben Ablauf Richtung Ruhlebener Altarm, (C) Fluss Havel nahe der Heerstraße an der Freybrücke, (D) Badestelle Kleine Badewiese. Fotos: Florian Kubek

Kläranlagenzulaufproben wurden nach der Entfernung von groben Verschmutzungen im Ablauf der Vorklärung genommen (Abb. 11A). Kläranlagenablaufproben haben den Reinigungsprozess der Kläranlage durchlaufen und wurden im Ablaufkanal, der Richtung Ruhlebener Altarm fließt, entnommen (Abb. 11B). Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben wurden jeweils am selben Probenahmetag genommen. In den Sommermonaten wird der Kläranlagenablauf zusätzlich in einer UV-Desinfektionsanlage (1100 J/m^2) gereinigt (Gnirss *et al.*, 2015). Nach diesem physikalischen Reinigungsverfahren wurden in diesen Monaten ebenfalls Proben am Ablauf der UV-Anlage genommen. Weitere Proben von Kläranlagenzu- und Ablaufproben stammen aus den Jahren 2016 bis 2019 von der zentralen innerstädtischen Kläranlage Berlin Ruhleben und aus den vorstädtischen

Kläranlagen der Städte Garching bei München (2017-2018) sowie den Kläranlagen Schönerlinde (2017) und Münchehofe (2014) in Brandenburg.

Die Oberflächengewässerproben wurden von zwei Berliner Flüssen, der Spree (2016/2017) und in den Jahren 2018/2019 aus der Havel (Heerstraße, Freybrücke, Abb. 11C), bei normalen Wetterbedingungen und nach Starkregenereignissen entnommen. Proben nach Mischwasserüberläufen (MWÜ) in die Spree (Spree/MWÜ) wurden im Jahr 2016 vom Kompetenzzentrum Wasser Berlin (KWB) während einer Probenahmekampagne nach Starkregenereignissen gesammelt. Außerdem wurden in den Jahren 2018/2019 Sediment- und Wasserproben von der Havel-Badestelle „Kleine Badewiese“ (Havel/KBW) entnommen, siehe Abbildung 11D. Für die Entnahme der Sedimentproben wurde mit einer kleinen Schaufel ein Loch von ca. 15 cm Tiefe gegraben und von dort Sediment in ein 50ml-Röhrchen überführt.

Alle Gefäße wurden nach der Probenahme von außen mit 2-Propanol gesäubert. Die Proben wurden entweder direkt nach der Probenahme im Labor bearbeitet oder bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

In den im Land Brandenburg gelegenen Forstrevieren Döberitzer Heide und Weisen wurden ebenso Oberflächengewässerproben gesammelt und auf HEV untersucht (Lokalisation siehe Abschnitt 3.2 Ergebnisteil). Von diesen Jagdgebieten war bekannt, dass sich dort dauerhaft Wildschweine aufhalten, da diese Reviere durch Straßen teilweise räumlich abgegrenzt sind. Die Koordinaten und die Bezeichnung der Probenahmestellen sind in Tabelle 1 zusammengetragen.

Tabelle 1: GPS-Koordinaten und Bezeichnung der Probenahmestellen in den beiden Forstrevieren.

Stelle	GPS-Koordinaten		Bezeichnung der Probenahmestelle
Forstrevier Döberitzer Heide			
1	52°30'48.6"N	12°59'73.6"E	Ferbitzer Bruch Nordwest
2	52°30'23.1"N	12°59'17.4"E	Bauernheide bei Hochsitz 609
3	52°29'82.9"N	12°59'69.8"E	Großer Graben Übergang am Mittelweg
4	52°29'79.1"N	13°00'14.9"E	Graben Ferbitzer Werder/Übergang BlmA-Fläche-HSS
5	52°30'51.1"N	13°00'43.1"E	Ferbitzer Bruch, Koppelsee
6	52°31'22.6"N	12°29'44.7"E	Priorter See
7	52°29'56.2"N	13°00'74.9"E	Großer Graben Übergang zum ehem. Dorf Ferbitz
8	52°29'13.0"N	13°00'24.1"E	Kleiner Flachspfuhl
9	52°30'26.6"N	12°58'69.4"E	Torfstich
Forstrevier Weisen			
1	53°02'57.5"N	11°47'43.2"E	Waldgebiet zw. Schilde und Perleberg, Abteilung Hochfeld, Suhle Schwarzwild
2	53°03'04.1"N	11°48'21.1"E	Abteilung 308, Suhle Schwarzwild
3	53°03'54.2"N	11°47'57.9"E	Abteilung Landwehr, aus Landwehr-Graben

In der Döberitzer Heide gab es neun und in Weisen drei verschiedene Probenahmestellen (Tab. 1), wobei diese Proben von externen Probenehmern genommen wurden. Parallel zur Wasserprobenahme wurden in diesen Forstrevieren Wildschweine geschossen, aufgebrochen und Leberproben entnommen. Diese wurden am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) auf HEV getestet, um einen

eventuellen Zusammenhang zwischen den HEV-Genotypen in den Tieren und der Umwelt feststellen zu können.

2.3 Virusaufkonzentrierungsverfahren

In Umweltproben sind humanpathogene Viren meistens in geringen oder sehr geringen Konzentrationen vorhanden und müssen für die weiteren Analysen aufkonzentriert werden. In dieser Arbeit wurden die drei Methoden Polyethylenglykol (PEG)-Fällung, Ultrazentrifugation (UZ) und Glaswollefiltration (GW) zur Aufkonzentrierung verwendet.

2.3.1 Polyethylenglykol-Fällung

Das Verfahren der Polyethylenglykol-Fällung basiert auf der Veröffentlichung von Manor *et al.* (2007). Drei wichtige Schritte der Methode sind der Abbildung 12 zu entnehmen.

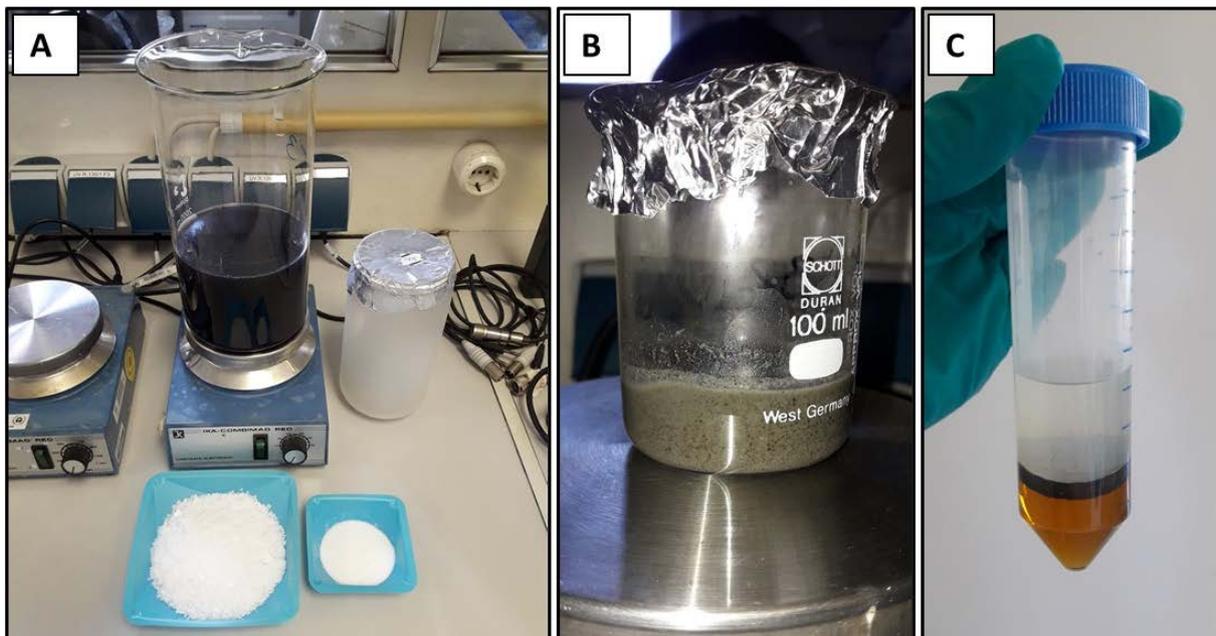


Abbildung 12: Drei Schritte der Polyethylenglykol-Fällung. (A) 1L Abwasserprobe mit abgewogenem Polyethylenglykol und Natriumchlorid sowie dem Zentrifugationsgefäß. (B) Das Pellet nach der ersten Zentrifugation wurde mit PBS, Chloroform und Tween 80 verrührt. (C) Phasenbildung nach einer weiteren Zentrifugation: unten Chloroformphase; mittiges Pellet und obere Phasen enthalten Viren.

Zuerst wurde die Wasserprobe auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Danach wurden 80 g Polyethylenglykol 6000 und 17,5 g Natriumchlorid je 1 Liter zur Probe gegeben. Diese wurde für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe in ein 1L-Zentrifugationsgefäß überführt (Abb. 12A). Danach wurde die Ausfällung, welche die Viren enthielt, nach 1 h Zentrifugation bei 10.000 x g und 10 °C als Pellet gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 ml PBS resuspendiert und in ein Becherglas überführt. Danach wurden 15 ml Chloroform zur Zerstörung der Bakterienzellen

und 150 µl Tween 80 (beides Merck KGaA) hinzugegeben und die Suspension für 15 min auf dem Rührer gemischt (Abb. 12B). Die Probe wurden dann in ein 50ml-Röhrchen überführt und für 15 min bei 1.400 x g und 10 °C zentrifugiert, wobei sich drei Phasen bildeten (Abb. 12C). Die oberste Phase wurde dabei für die Nukleinsäureextraktion behalten (siehe Abschnitt 2.5) und die untere Chloroformschicht abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml sterilem 3%igem Fleischextraktpuffer mit 0,05 mol/l Glycin (beides Merck KGaA) bei pH 7,2 aufgenommen, in ein Becherglas überführt und für 15 min gerührt, um die noch an Partikel gebundenen Viren zu lösen. Nach dieser Elution wurde die Zentrifugation bei 1.400 x g für 15 min wiederholt und der gewonnene Überstand mit dem ersten Überstand auf ein finales Volumen von circa 20 ml vereint. Fünf ml davon wurden für die Nukleinsäureextraktion verwendet (Abschnitt 2.5).

2.3.2 Ultrazentrifugation

Die Vorgehensweise der Ultrazentrifugation stammt aus der Veröffentlichung von La Rosa *et al.* (2007). Die benötigten Röhrchen, die Ultrazentrifuge und das resultierende Pellet dieses Verfahrens sind in Abbildung 13 gezeigt.

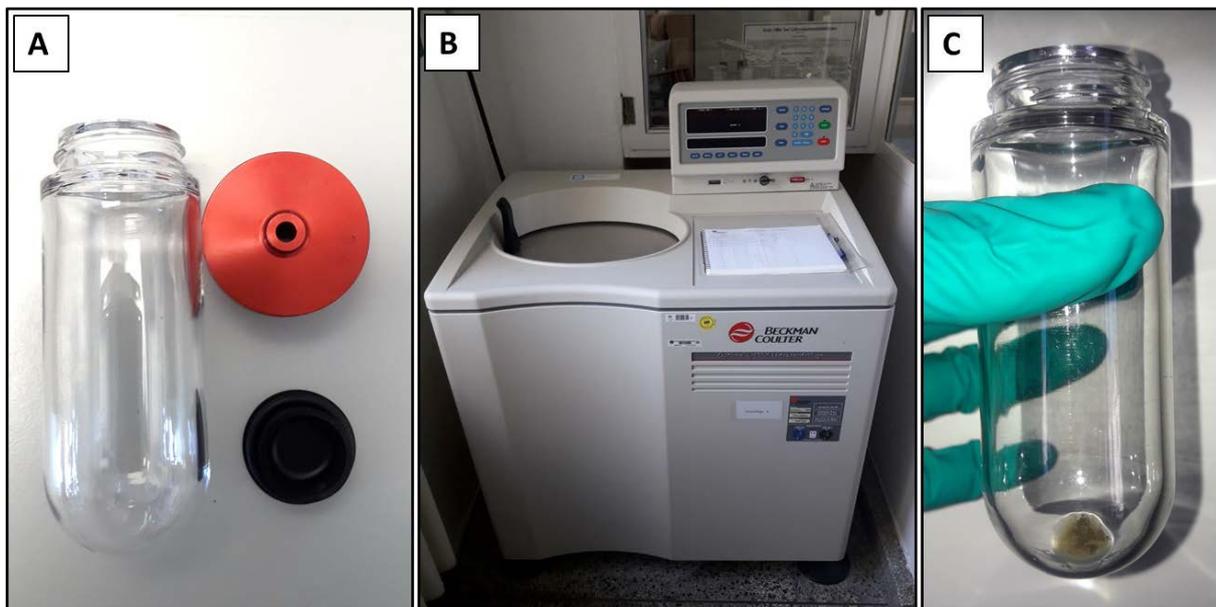


Abbildung 13: Röhrchen, Gerät und Pellet der Ultrazentrifugation. Für die Methode wurden Zentrifugationsröhrchen mit Stopfen und Deckel (A) und die Ultrazentrifuge (B) benötigt. Das Pellet nach dem Zentrifugationslauf befindet sich am unteren Rand des Röhrchens (C).

Um grobe Bestandteile der Wasserprobe zu entfernen, wurden 200 ml Proben bei 3.000 x g für 10 min bei 10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und 180 ml des Überstands auf 3 Polycarbonat-Zentrifugationsröhrchen (Abb. 13A; #355655, Beckman Coulter) aufgeteilt. Da 6 Röhrchen in dem Festwinkelrotor 45 Ti aus Titan (Beckman Coulter) Platz finden, konnten zwei Proben gleichzeitig aufkonzentriert werden. Die Wasserproben wurden dann bei 160.000 x g (45000 rpm) für 2 h bei 10 °C in der Optima L-100K Ultrazentrifuge (Abb. 13B; Beckman Coulter) pelletiert. Die drei Pellets je Probe (Abb. 13C) wurden in je 1,5 ml PBS resuspendiert, vereint und für die anschließende Nukleinsäureextraktion auf 5 ml aufgefüllt (Abschnitt 2.5).

2.3.3 Glaswollefiltration

Das Verfahren der Glaswollefiltration basiert auf der Publikation von Vilagiès *et al.* (1993). Entsprechend der weiterentwickelten Aufkonzentrierungsweise von Wyn-Jones *et al.* (2011) wurde die GW in dieser Arbeit durchgeführt. Die für die Methode benötigten Säulen und der Aufbau der Apparatur ist der Abbildung 14 zu entnehmen.

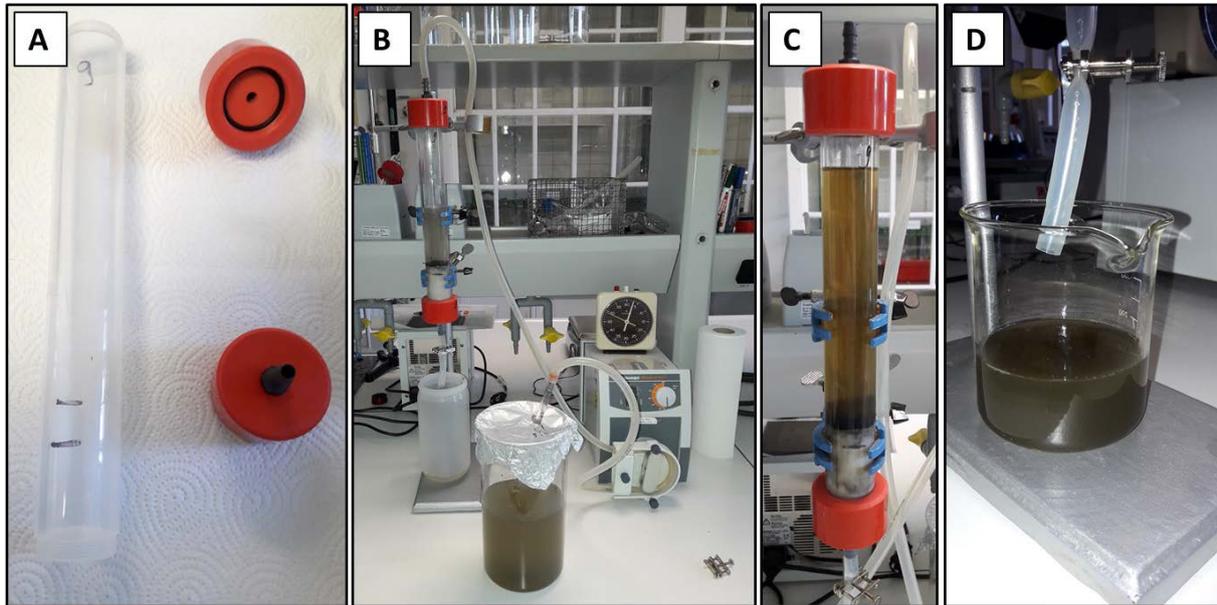


Abbildung 14: Materialien, Aufbau und Elution der Glaswollefiltration. (A) Einzelteile der GW-Säule, (B) gesamter Aufbau der Anlage, (C) Inkubation des Elutionspuffers, (D) Eluat aus der GW-Säule.

Die Polystyrol-Säulen (30 cm x 4 cm) wurden mit 10 g geölter Glaswolle (Bourre 725QN; Saint Gobain, Isover-Orgel, France; Lambertini *et al.*, 2008), welche zuvor aufgelockert wurde, um eine größere Oberfläche zu erreichen, befüllt. Am unteren Teil der Säule wurde die Glaswolle bis zu einer Höhe von 6-8 cm, gekennzeichnet durch Markierungen an der Säule, verdichtet. Dadurch konnte eine konstante Dichte der Glaswolle in allen Präparationen gewährleistet werden. Die Säule wurde dann mit Schraubdeckelverschlüssen geschlossen, an denen sich Schlauchverbindungen befanden. An diese wurden im weiteren Verlauf der Methode Schläuche angebracht, um die Probe über die Säule zu pumpen bzw. um den Ablauf der Probe und das Eluat auffangen zu können (Abb. 14A). Die Säule wurde dann aufrecht in einem Stativ befestigt und die enthaltene Glaswolle gewaschen. Dafür wurden 50 ml 1 M HCl, 50 ml Millipore-Wasser, 50 ml 1 M NaOH nacheinander auf die Säule gegeben und anschließend mit mindestens 1 L Millipore-Wasser gespült, bis die Säule wieder einen neutralen pH-Wert erreichte. Da die Säule nicht trockenstehen darf, wurde sie anschließend mit Millipore-Wasser gefüllt und innerhalb von 24 h verwendet. Da Kläranlagen-Zulaufproben die GW-Apparatur verstopfen würden, wurden zuerst 2 L des Kläranlagen-Zulaufs bei 3.000 x g für 15 min in zwei 1 L-Zentrifugationsgefäßen zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden aufgehoben und die Pellets in je 50 ml Fleischextrakt-Glycin-puffer mit pH 9,5 gelöst, 5 min inkubiert und bei 3.000 x g für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt und die Pellets verworfen. Dieser Schritt entfällt für Oberflächengewässerproben. Der pH-Wert des Gesamtüberstandes bzw. der Probe (Oberflächengewässer) wurde auf pH 3,5 ($\pm 0,1$) eingestellt, um die Bindung der Viren an die Glaswolle zu verstärken. Der Versuchsaufbau der GW ist in Abbildung 14B dargestellt. Eine 10ml-Einmal-Pipette wurde mit einem Masterflex-Silikonschlauch (Cole-Parmer) verbunden und in die Probe gestellt. Der

verwendete Schlauch wurde in seiner Mitte in die Peristaltikpumpe Pumpdrive 5006 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) eingespannt, um die Probe von oben auf die Säule zu pumpen. Während die Probe langsam (ca. 0,5 L/min) über die Glaswolle-Säule gepumpt wurde, konnten die Viren an die Glaswolle binden und der Durchfluss am unteren Ende der Säule wurde verworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die Säule stets halb voll mit der wässrigen Probe gefüllt war, sodass die Glaswolle nicht austrocknen konnte. Das Pumpen der Probe über die Säule wurde gestoppt, sobald der Wasserstand in der Säule bis kurz über der Glaswolle abgesunken war. Zur Elution der Viren von der Glaswolle wurden 200 ml Fleischextrakt-Glycin-Puffer pH 9,5 ($\pm 0,1$) auf die Säule geben, für 15 min inkubiert (Abb. 14C) und anschließend in ein Becherglas ausgetropft. Das aufgefangene Fleischextrakt-Eluat (Abb. 14D) wurde langsam auf pH 3,2 ($\pm 0,1$) abgesenkt, bis eine Trübung einsetzte. Die durch Ansäuerung gefällten Proteine mit den daran gebundenen Viren wurden für 30 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml PBS gelöst, wovon 5 ml für die Nukleinsäureextraktion verwendet wurden (Abschnitt 2.5).

2.4 Virenelution aus Sedimentproben

Um die Effizienz der Elution von Viruspartikeln von Sedimentproben bestimmen zu können, wurde vor der eigentlichen Untersuchung der Umweltproben ein Spikeversuch durchgeführt. Es wurden murine Noroviren 1 (MNV-1, Stamm S99 Berlin) hinzugegeben (gespikt), welche im Labor als Stock vorrätig waren. Im Spikeversuch wurden im Dreifachansatz MNV zu je 5 g Sediment und 5 ml Wasserprobe von der Badestelle Kleine Badewiese gegeben. Es wurden insgesamt drei verschiedene Konzentrationen an MNV gespikt. Die Gemische wurden über Nacht im Schüttler KS125 basic (IKA Labortechnik) inkubiert, um die Viren an die Sedimentpartikel binden lassen zu können. Der Wasserüberstand von 5 ml wurde am nächsten Tag abgenommen und die Nukleinsäuren daraus extrahiert (siehe Abschnitt 2.5). Je nachdem, wie viele MNV sich noch im Überstand befanden, konnte abgeschätzt werden, wie viele MNV-1 theoretisch noch an den Sedimentpartikeln gebunden waren. Um Viren, welche an Sedimentpartikel adsorbierten, ablösen zu können, wurde das folgende Verfahren angewandt (Lewis und Metcalf, 1988; Farkas *et al.*, 2017): in einem 50 ml-Röhrchen wurden 5 g der Sedimentprobe mit 15 ml Elutionspuffer für 30 min auf einem Schüttler gemixt. Als Elutionspuffer diente eine sterile 2 mol/l NaNO_3 -Lösung mit 3 % Fleischextrakt (beides Merck KGaA), die vor Gebrauch auf pH 5,5 eingestellt wurde. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 10 °C und 2500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen, auf pH 7,5 eingestellt und über Nacht mit 15 % PEG 6000 und 2 % NaCl (beides Merck KGaA) bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Suspension für 80 min bei 10 °C und 2500 x g zentrifugiert, das Pellet in 5 ml PBS durch vortexen gelöst und anschließend daraus die Nukleinsäuren isoliert (Abschnitt 2.5).

2.5 Extraktion viraler Nukleinsäuren

Zur Nukleinsäureextraktion wurde der NUCLISENS® EASYMAG® Lysispuffer (bioMérieux) in Kombination mit den NUCLISENS® EASYMAG® Magnetischen Extraktionsreagenzien (bioMérieux) verwendet. Für die Extraktion wurde ein Volumen von 5 ml verwendet, welches entweder von einer Direktprobe (nicht aufkonzentriert) oder von dem Eluat einer aufkonzentrierten Probe stammte (siehe Abschnitt 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3). Das NUCLISENS® EASYMAG® System wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll mit geringen Modifikationen angewendet. Jede Probe wurde mit der doppelten Menge an Lysispuffer versetzt und für 10 s gevortext. Nach 10 min Inkubation wurde eine

Zentrifugation bei 6.000 x g für 5 min durchgeführt, um gröbere Bestandteile der Probe zu entfernen. Dem Überstand wurden jeweils 50 µl Silicapartikel zugefügt und die Suspension wurde 10 s gevortext und 10 min inkubiert. Die Magnetpartikel wurden anschließend über einen Magnetseparationsständer (Novagen® Magnetight™) gesammelt und der Überstand abpipettiert, sobald sich alle Silicapartikel am Magnet befanden. Anschließend wurden die Partikel in 5 Schritten mit drei verschiedenen Puffern in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gewaschen. Es wurde zweimal 400 µl Waschpuffer 1 und dann zweimal 500 µl Waschpuffer 2 verwendet. Je Schritt wurde für 30 s gevortext, das Gefäß in den Magnetständer gestellt, der Überstand abpipettiert und das Gefäß wieder aus dem Ständer genommen, um den nächsten Puffer hinzuzufügen. Die Silicasuspension wurde dann für 10 s in 500 µl Waschpuffer 3 gevortext und der Puffer anschließend möglichst vollständig entfernt. Für die Elution der Nukleinsäuren von den Partikeln wurden 100 µl Elutionspuffer über die Silicapartikel gegeben, sodass sich alle Partikel im Puffer befanden. Die Suspension wurde für 5 min bei 60 °C und 1400 U/min in dem Thermomixer comfort eppendorf (Eppendorf AG) inkubiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt und die Überstände vereint, so dass ein Endvolumen von 200 µl je Probe entstand. Zuletzt wurden noch eventuell störende Silicapartikel durch eine Zentrifugation von 13.000 x g für 1 min entfernt und das Eluat bei -80 °C eingefroren.

Zur Methodenkontrolle der Nukleinsäureisolation wurde bei jeder Extraktion eine Positivkontrolle mitgeführt. Dazu wurden 100 µl HAdV-2 (humane Adenoviren Serotyp 2 der Gruppe C aus einem Zellkulturüberstand) in einer Konzentration von ca. 10^5 /ml in 5 ml PBS pipettiert und parallel zu den anderen Proben extrahiert. Die Positivkontrollen wurden zusammen mit Proben auf HAdV mittels qPCRs getestet.

2.6 Quantitative real-time PCR

Um eine Aussage über die vorhandene Viruskonzentrationen in den Umweltproben oder in Spikeversuchen treffen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) über fluoreszenzmarkierte TaqMan®-Sonden angewandt. Die qPCR stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, mit der die Nukleinsäure von Organismen nachgewiesen werden kann. Hierbei wird ein definierter Bereich des Genoms vervielfältigt, was durch die Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen nachverfolgt werden kann. Das RNA-Genom von HEV, CoSV und Noroviren wurde vor der PCR durch eine Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dieser Schritt entfällt für Adenoviren mit DNA-Erbgut. Bei der qPCR-Methode wird zunächst der DNA-Doppelstrang denaturiert, sodass sich Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie die Sonden an die Einzelstränge anlagern können. Die Taq-Polymerase verlängert dann die Primer und ein Doppelstrang entsteht. Die Fluoreszenz kommt zustande, indem die Polymerase die Sonde während der neuen Strangsynthese abbaut, da sich dann der Fluorophor vom Quencher entfernt und fluoresziert. In jedem der 45 Zyklen der qPCR findet theoretisch eine Verdopplung der Amplifikate statt.

2.6.1 Verwendete Reaktionsansätze, Primersysteme, Temperaturprofile

Die verwendeten Komponenten pro qPCR-Ansatz zur Amplifikation von Genomsequenzabschnitten der HEV, CoSV, HAdV, HNV und MNV sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die dafür eingesetzten Primer, Sonden und die entsprechenden Temperaturprofile der jeweiligen qPCR sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Genutzte Kits und Zusammensetzung der Reaktionsmischungen in der qPCR pro Ansatz zur Detektion von HEV, CoSV, HNV, MNV und HAdV.

Komponenten	HEV	CoSV	HNV	MNV	HAdV
qPCR-Kit	QuantiTect Probe RT-PCR-Kit (QIAGEN)				TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
Mastermix	1x	1x	1x	1x	1x
Vorwärts-/ Rückwärtsprimer	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,25 µM	0,9 µM
Sonde	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,1 µM	0,225 µM
Transkriptasemix	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	-
Wasser	-	-	-	0,75 µl	-
Probentemplate	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Endvolumen	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Tabelle 3: Verwendete Primer und Sonden sowie Temperaturprofile zur qPCR-Amplifikation von Sequenzen der HEV, CoSV, HNV, MNV und HAdV.

Virus	Standards	Sequenzen der Primer und Sonden	Temperaturprofil
HEV	GeneStrand (Eurofins) 210 bp in ORF2/3 Region	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3' 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3' 5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB-3' (Jothikumar <i>et al.</i> , 2006; Garson <i>et al.</i> , 2012)	30 min 50 °C; 15 min 95 °C; 45 Zyklen: 15 s 94 °C, 1 min 56 °C
CoSV	GeneStrand (Eurofins) 229 bp aus der untranslatierten Region (UTR)	5'-TTGTAGYGATGCTGTRTGTGTGTG -3' 5'-CCAYTGTGTGGGTCCTTTCG-3' 5'-FAM-AGCCTCACAGGC CRRAAGCCCTGTC-BHQ1-3' (Stöcker <i>et al.</i> , 2012)	30 min 50 °C; 15 min 95 °C; 45 Zyklen: 15 s 94 °C, 1 min 58 °C
HNV	gBlock®(ITD), 220 bp, Sequenz des Subtyps Lordsdale-Virus Genogruppe II	5'-AGCCAATGTTTCTCAGATGGATG-3' 5'-TCGACGCCATCTTCATTCAC-3' 5'-FAM-TGGGAGGGCGAT CGCAATCTGGC-TAMRA-3' (Höhne und Schreier, 2004)	30 min 50 °C; 15 min 95 °C; 45 Zyklen: 15 s 94 °C, 1 min 56 °C
MNV	GeneStrand (Eurofins), 234 bp, Sequenz des MNV Isolates S99 aus ZKÜ	5'-AGAGGAATCTATGCGCCTGG-3' 5'-GAAGGCGGCCAGAGACCAC-3' 5'-6-FAM-CGCCACTCCGC ACAAACAGCCC-DABCYL-3' (Müller <i>et al.</i> , 2007)	30 min 50 °C; 15 min 95 °C; 45 Zyklen: 15 s 95 °C, 45 s 55 °C
HAdV	Plasmid pAd41 (mit Hexonregion von AdV 41) durch BamHI linearisiert	5'-CWTACATGCACATCKCSGG-3' 5'-CRCGGGCRAAYTGCACCAG-3' 5'-FAM-CCGGGCTCAGGTAC TCCGAGGCGTCCT-TAMRA-3' (Hernroth <i>et al.</i> , 2002)	2 min 50 °C; 10 min 95 °C; 45 Zyklen: 15 s 95 °C, 1 min 60 °C

W= A oder T; R= A oder G; Y= C oder T; K= G oder T; S= C oder G

Um qPCRs durchführen zu können, müssen die Primer, Sonden und Standards fehlerfrei funktionieren. Ob diese Bedingungen vollständig gegeben sind, muss durch Qualitätskontrollen überprüft werden. Abschnitt 2.6.2 zeigt ein Beispiel einer Qualitätssicherung. Hier wurden die Ursachen für eine nicht mehr optimal verlaufende qPCR zur Quantifizierung von HEV identifiziert.

2.6.2 Qualitätssicherung der RT-qPCR zur Detektion von HEV

Bei der quantitativen PCR kann es zu Anwendungs- und somit Auswertungsproblemen durch die gebrauchten Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes kommen. Während dieser Arbeit traten Unregelmäßigkeiten der eingesetzten HEV-Standards und der neu synthetisierten HEV-Primer und Sonde auf. Mittels Ausschlussverfahren und taktisch gewählter Versuchskombinationen konnten jedoch die Fehler diagnostiziert und behoben werden. Die Herangehensweise dieser Fehlerdiagnose ist folgende:

Zu Beginn der Versuche wurden als HEV-Standards „gBlocks Genfragmente“ der Firma Integrated DNA Technologies (IDT) verwendet (Sequenz siehe Tab. 17 im Anhang). Diese Fragmente besaßen eine Länge von 213 bp und ein Cytosin(C)/Guanin(G)-Gehalt von 67 %. Dieser relativ hohe C/G-Gehalt wurde gewählt, um die Fragmente möglichst stabil zu konstruieren. Anfänglich funktionierten diese Standards einwandfrei, die Dreifachansätze der eingesetzten HEV-Standards resultierten in deckungsgleichen Fluoreszenzsignalen (Abb.15A). Nach einigen Monaten der Lagerung konnten diese Standards jedoch nicht mehr verwendet werden. Die ct-Werte des Dreifachansatzes einer Standardkonzentration variierten so stark (Abb. 15B), dass keine Auswertung der qPCR möglich war, weil keine geeignete Standardkurve erstellt werden konnte.

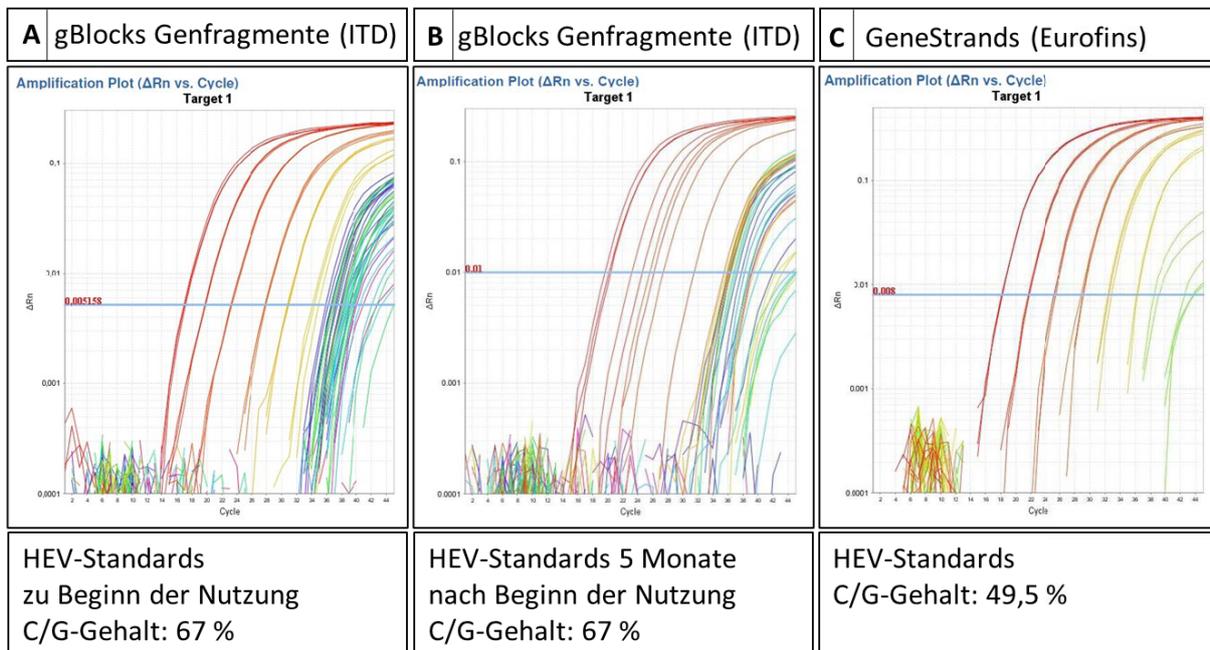


Abbildung 15: Standardkurven zur Quantifizierung von HEV. (A) Standards von ITD mit einem C/G-Gehalt von 67 % zu Beginn der Nutzung und (B) 5 Monate nach Beginn der Nutzung; (C) Standardkurven mit neu synthetisierten Primern, Sonde und Standards von Eurofins mit einem C/G-Gehalt von 49,5 %.

Die erste Erklärung für diese Fehlfunktion war, dass die Nukleotidstruktur der doppelsträngigen DNA-Standards während der Lagerung nicht stabil erhalten blieb. Eventuell bildeten sich im Laufe der Zeit Sekundärstrukturen, welche durch den relativ hohen C/G-Gehalt der Standards in der qPCR nur noch teilweise in die Einzelstränge denaturiert werden konnten. Wenn Bereiche, in denen die Primer und Sonde binden, davon betroffen waren, könnte dies die stark unterschiedlich detektierten Fluoreszenzsignale (Abb. 15B) erklären. Als Konsequenz wurde der C/G-Gehalt der Standards angepasst und von 67 % auf 49,5 % reduziert (Abb. 15C). Dabei wurden längere C/G-Bereiche durch Adenin oder Thymin-Nukleotide unterbrochen. Sequenzbereiche, an die Primer und Sonde binden, blieben unverändert. Die neu konstruierte HEV-Standardsequenz wurde anschließend bei der Firma Eurofins als GeneStrand bestellt (Sequenz siehe Tab. 17 im Anhang).

Im Verlauf des HEV-Nachweisverfahrens wurde die verwendete HEV-Sonde modifiziert, indem der Quencher der Sonde von einem BHQ zu einem *Minor Groove Binder* (MGB) ausgetauscht wurde (Tab. 3). Die Sonde mit MGB und neue Primer mit unveränderter Sequenz wurden bestellt (Eurofins). Bei der Verwendung der neuen Primer und MGB-Sonde trat dann das Problem auf, dass die Negativkontrollen (Wasser) oft falsch positive HEV-Signale aufwiesen, was bei der BHQ-Sonde und den bislang verwendeten Primern (iba) nie beobachtet werden konnte. Um die Ursache für die falsch positiven HEV-Signale ausfindig zu machen, wurde eine qPCR mit den nachfolgenden Kombinationen durchgeführt, von denen jede Kombination mit jeweils 8 Negativkontrollen getestet wurde:

- (I) Neue Sonde (MGB) + neue Primer (Eurofins)
- (II) Neue Sonde (MGB) + alte Primer (iba)
- (III) Alte Sonde (BHQ) + neue Primer (Eurofins)
- (IV) Alte Sonde (BHQ) + alte Primer (iba)

Für diese Testansätze wurde ein ungeöffnetes QuantiTect Probe RT-PCR Kit und neues Nuklease-freies verwendet, um Kreuzkontaminationen ausschließen zu können. Anhand der qPCR-Ergebnisse wurde deutlich, dass immer, wenn die neu bestellten Primer und/ oder die Sonde in den qPCR-Reaktionsansätzen enthalten waren, die Negativkontrollen teils falsch HEV-positive Ergebnisse lieferten. Es wurden ct-Werte bis zu 36 detektiert, was einer Konzentration von 100 HEV-Kopien/10 µl entsprach. Als Konsequenz wurden die Primer und die Sonde verworfen und eine Neusynthese veranlasst. In einem qPCR-Testlauf mit den neu synthetisierten Primern, Sonde und HEV-Standards mit einem geringeren C/G-Gehalt wurde deutlich, dass die Standards wieder fehlerfrei amplifiziert werden konnten. Die Dreifachbestimmung jeder Konzentration von 10^6 Kopien/10 µl bis 10^1 Kopien/10 µl (rot und gelb) war wieder deckungsgleich. Die grün dargestellten Kurven sind das Amplifikat einer gemessenen Abwasserprobe (Abb. 15C). Weiterhin kam es zu keiner falsch positiven HEV-Detektion in den 6 eingesetzten Wasserkontrollen. Die RT-qPCR-Methode zur Detektion von HEV konnte von nun an wieder problemlos verwendet und die Proben zuverlässig quantifiziert werden. Der C/G-Gehalt von Standards in einer qPCR sollte demnach nicht zu hoch gewählt werden, um das Aufschmelzen der DNA-Stränge zu gewährleisten. Hierbei kommt es nicht auf die einzelnen Nukleotide der Sequenz, sondern auf das Gesamtverhältnis an.

2.6.3 Herstellung von Standards für die Quantifizierung (mit Beispiel HEV)

Um in Umweltproben und gespikten Proben Viren quantifizieren zu können, wurden auf jeder qPCR-Testplatte Reaktionsansätze mit bekannten Nukleinsäurekonzentrationen verwendet, welche in dekadischen Verdünnungsreihen eingesetzt wurden. Die Standards besaßen die jeweilige

Genomsequenz des zu detektierenden Virus mit den spezifischen Bindungsstellen der Primer und Sonde. Der C/G-Gehalt der Standards wurde auf ungefähr 50 % angepasst, um stabile Standards zu erhalten und gleichzeitig die vollständige Auftrennung der DNA-Doppelstränge in der PCR sicher zu stellen. Als Standards wurden gBlocks® (ITD) bzw. GeneStrands (Eurofins) mit einer Länge von 210 bp bis 230 bp oder ein linearisiertes Plasmid genutzt. Anhand der vermessenen Standards wurde in jeder qPCR eine Standardkurve erstellt, um die Viruskonzentrationen in den unbekanntenen Proben zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.6.10 Abb. 16).

Nachfolgend ist erklärt, wie die HEV-Standards aus 300 ng der 210 bp langen Sequenz hergestellt wurden: mit einem Kopienzahl-Kalkulator [Internetquelle 8] wurde zunächst anhand der bekannten Größen (210 bp, 300 ng) ermittelt, dass sich $1,303 \cdot 10^{12}$ Kopien des HEV-Standards in dem gesamten Lyophilisat befanden. Das Lyophilisat wurde 5 min bei 2500 x g zentrifugiert, in 130,3 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert, um eine Konzentration von 10^{11} Kopien/10 µl zu erhalten. Die Suspension wurde seriell jeweils 1:10 verdünnt, um HEV-Standard der Konzentrationen von 10^6 Kopien/10 µl bis 10^1 Kopien/10 µl zu erhalten. Jede Konzentration der Standards wurde in allen qPCRs in Dreifachansätzen bestimmt.

2.6.4 RT-qPCR für HEV

Die Zusammensetzung der Komponenten für einen Reaktionsansatz, um HEV mittels RT-qPCR in Umweltproben nachzuweisen, ist Tabelle 2 in Abschnitt 2.6.1 zu entnehmen. Die verwendeten Primer und die Sonden (Tab. 3) amplifizieren ein 70 bp großes HEV-Fragment und können die HEV-Genotypen 1 bis 4 detektieren. Als Sonde wurde zunächst jene von Jothikumar *et al.* (2006) verwendet. Im Verlauf des HEV-Nachweisverfahrens wurde eine modifizierte Version dieser Sonde mit einem MGB-Quencher benutzt. Dieser Quencheraustausch erfolgte, um das Risiko von falsch negativen RT-qPCR-Resultaten zu reduzieren und die Spezifität der Reaktion zu erhöhen (Garson *et al.*, 2012). Bindet die Sonde nun an die Zielsequenz, lagert sich der MGB zusätzlich an die kleine Furche (*minor groove*) der cDNA und es entsteht eine stabile Duplex zwischen dem MGB und dem Einzelstrang. Die Sequenz der Sonde blieb unverändert. Als Standards wurden in den qPCRs zu Beginn gBlocks® (ITD) mit einer Länge von 213 bp und einem C/G-Gehalt von 67 % genutzt. Da die DNA-Doppelstränge vermutlich nicht ausreichend denaturiert werden konnten, wurde der C/G-Gehalt auf 49,5 % reduziert und von nun an GeneStrands (Eurofins) mit einer Sequenzlänge von 210 bp verwendet. Je getesteter Probe wurden vier PCR-Ansätze eingesetzt: ein Duplikat von 10 µl der unverdünnten Probe und ein Duplikat der 1:10 verdünnten Probe. Die sechs eingesetzten Standardkonzentrationen von 10^6 Kopien/10 µl bis 10^1 Kopien/10 µl dienten gleichzeitig als Positivkontrolle der RT-qPCR. Die Durchführung und Auswertung der qPCR ist den Abschnitten 2.6.9 und 2.6.10 zu entnehmen.

2.6.5 RT-qPCR für Cosaviren

Die Bestandteile pro Reaktionsansatz, um Cosaviren in Umweltproben nachzuweisen, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die benutzten Primer und die Sonde (Tab. 3) basieren auf den veröffentlichten Sequenzen von Stöcker *et al.* (2012) und amplifizieren ein 93 bp-Fragment. Der Quencher der Sonde wurde jedoch von DDQ1 (*deep dark quencher*) zu BHQ1 ausgetauscht. In qPCRs können die Cosavirus Spezies A, B, D und Spezies E detektiert werden. Die eingesetzten Standards besaßen eine Länge von 229 bp und einen C/G-Gehalt von 50 % (Sequenz siehe Tab. 17 im Anhang). Je Probe wurden in der PCR vier Ansätze getestet: ein Duplikat von 10 µl der unverdünnten Probe und ein Duplikat der 1:10 verdünnten Probe. Die Standards wurden in Konzentrationen von 10^6 Kopien/10 µl bis 10^1 Kopien/10 µl eingesetzt und dienten gleichzeitig als Positivkontrolle der RT-qPCR. Die Durchführung und Auswertung der qPCR ist den Abschnitten 2.6.9 und 2.6.10 beschrieben.

2.6.6 RT-qPCR für humane Noroviren

Die Komponenten für einen Reaktionsansatz, um humane Noroviren in Umweltproben mittels RT-qPCR nachzuweisen, sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die verwendeten Primer und die Sonde (Tab. 3) amplifizieren ein 94 bp-großes Genomfragment der humanen Noroviren der GG II, welche den Großteil der Norovirus-Infektionen in Deutschland verursachen (Höhne und Schreier, 2004). Seltener vorkommende Noroviren der GG I und GG IV wurden nicht gemessen. Als Positivkontrolle wurden ca. 1000 Kopien einer säulengereinigten HNV-RNA eingesetzt, welche aus dem NV-Virobathe-Mix („NV virobathe bluecap“) aus dem europäischen Virobathe-Projekt gewonnen wurden. Als HNV-Standards wurden gBlocks®(ITD) mit der Sequenz des Subtyps Lordsdale-Virus Genogruppe II benutzt, die eine Länge von 220 bp und einen C/G-Gehalt von 51 % besaßen. Um die Standardkurve für die HNV-Quantifikation zu erstellen, wurden fünf Standards der Konzentrationen 10^6 Kopien/10 μ l bis 10^2 Kopien/10 μ l eingesetzt. Je Probe wurden sechs PCR-Ansätze getestet: ein Duplikat von 10 μ l der unverdünnten Probe und ein Duplikat der 1:10 verdünnten Probe. Zusätzlich wurden zwei Reaktionsansätze pro Probe für Inhibitionskontrollen vorgesehen. Dafür wurden jeder Probe 500 HNV-Kopien des Standards hinzu pipettiert und deren Wiederfindungsrate bestimmt, um eine mögliche Inhibition zu identifizieren. Die Durchführung und Auswertung der qPCR ist in den Abschnitten 2.6.9 und 2.6.10 erläutert.

2.6.7 RT-qPCR für murine Noroviren

Murine Noroviren wurden für Spikeversuche gebraucht, da sie im Gegensatz zu humanen Noroviren in Zellkultur vermehrt werden können und nicht humanpathogen sind. Zur Quantifizierung der MNV mittels RT-qPCR wurden die im Abschnitt 2.6.1 aufgeführten Komponenten je Reaktionsansatz verwendet (Tab. 2). Des Weiteren wurden die Primer und Sonde von Müller *et al.* (2007), die ein Fragment von 92 bp amplifizieren, verwendet und Standards mit der Sequenz des MNV-Isolates S99 (Tab. 3). Die Standards hatten eine Länge von 234 bp und einen C/G-Gehalt von 53 % und wurden in Konzentrationen von 10^7 Kopien/10 μ l bis 10^1 Kopien/10 μ l eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein verdünnter MNV-Zellkulturüberstand, wobei ca. 1000 Kopien pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden. Je Probe wurden in den qPCRs sechs Ansätze getestet: zweimal 10 μ l der unverdünnten Probe und zweimal 10 μ l der 1:10 verdünnten Probe. Um die Inhibition der PCR zu bewerten, wurden zusätzlich zwei Ansätze für Inhibitionskontrollen vorgesehen. Dafür wurden zu jeder Probe 500 MNV-Kopien hinzugegeben und deren Wiederfindungsrate bestimmt. Die Durchführung und Auswertung der RT-qPCR für MNV ist in den Abschnitten 2.6.9 und 2.6.10 dargestellt.

2.6.8 QPCR für humane Adenoviren

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, um humane Adenoviren aus Umweltproben oder gespikten Proben zu quantifizieren, ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die benutzten Primer und die Sonde (Tab. 3) amplifizieren ein Fragment von 69 bp und können die humanen Adenovirus Spezies A, C, D, E und F nachweisen (Hernroth *et al.*, 2002). Als Positivkontrollen der HAdV-PCR diente ein verdünnter Zellkultur-Überstand mit ca. 1000 Kopien HAdV-2. Als Standard wurde das linearisierte Plasmid pAd41 in Konzentrationen von 10^6 Kopien/10 μ l bis 10^1 Kopien/10 μ l verwendet. Dieses Plasmid enthält die gesamte DNA der Hexonregion von HAdV F Serotyp 41 und wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert. Je Probe wurden in der qPCR sechs Ansätze getestet: zweimal 10 μ l der unverdünnten Probe, zweimal 10 μ l der 1:10 verdünnten Probe und zwei Ansätze, um die Inhibition der qPCR in der Probe kontrollieren zu können. Eine Inhibition kann beispielsweise auftreten, wenn die Polymerasen in ihrer Funktion gestört werden. Zur Kontrolle der Inhibition wurden zu 5 μ l der 1:10 verdünnten Probe im ersten Ansatz 5 μ l Wasser und im zweiten Ansatz 5 μ l mit 500 pAd41-Kopien hinzugegeben.

Die Beurteilung der PCR-Inhibition basierte dann auf der Wiederfindung dieser 500 pAd41-Kopien. Die 500 Kopien wiederum wurden innerhalb jeder PCR in einem Dreifachansatz exakt bestimmt. Die Durchführung und Auswertung der qPCR ist den Abschnitten 2.6.9 und 2.6.10 zu entnehmen.

2.6.9 Durchführung der qPCR

Die Reaktionsansätze der qPCRs (Tab. 2) wurden in einem nur dafür verwendeten PCR-Vorbereitungsraum angefertigt, um Kontaminationen mit Nukleinsäuren zu vermeiden. Die benötigten Komponenten wurden aufgetaut, 10 s gevortext und kurz zentrifugiert, bevor sie in einem 2ml-Reaktionsgefäß zusammengemischt wurden. Von diesem Mix wurden 15 µl in alle benötigten 0,1ml-Wells der MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte (Applied Biosystems) pipettiert. In einer separaten Sterilwerkbank erfolgte dann die Zugabe der Standards, Proben sowie der Positiv- und Negativkontrollen. Diese Komponenten wurden ebenfalls zuvor aufgetaut, kurz gevortext und zentrifugiert. Als Proben dienten die extrahierten Nukleinsäuren (Abschnitt 2.5) und als Negativkontrolle Nuklease-freies Wasser. Die vollständig beladene Reaktionsmikrotiterplatte wurde dann mit MicroAmp® Optical Adhesive Film und dem dazugehörigen Applikator (Applied Biosystems) versiegelt und für 10 s zentrifugiert (mps 1000, Labnet).

Im 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) erfolgte die RT-qPCR zur Quantifizierung der HEV und CoSV. HAdV, HNV und MNV wurden im 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) detektiert. Die PCR-Läufe wurden anschließend, wie in Abschnitt 2.6.10 beschrieben, ausgewertet.

2.6.10 Auswertung der qPCR (am Beispiel HEV)

Die Auswertung der qPCR-Läufe erfolgte direkt mit der 7500 Software Version 2.3 (Applied Biosystems) des Gerätes. Nach der Fluoreszenzmessung wurde der automatisch gesetzte Schwellenwert (*threshold*) überprüft und gegebenenfalls angepasst, sodass er sich in der exponentiellen Phase des Amplifikationssignals befand. Der gesetzte *threshold* sollte sich jedoch immer im selben Bereich befinden, um die Daten zwischen verschiedenen qPCR vergleichen zu können, vorausgesetzt, es wurden die gleichen Primer, Sonden und Standards in den qPCRs verwendet. Mit der Software wurde anhand der verwendeten Standards eine Standardkurve erstellt, mit der die Viruskonzentration in den Proben bestimmt werden konnte. In Abbildung 16 auf der nachfolgenden Seite ist die Standardkurve einer RT-qPCR zur Quantifizierung von HEV dargestellt, wobei der ct-Wert gegen die Kopienzahl aufgetragen wurde. Der ct (*cycle threshold*)-Wert gibt an, ab welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal den *threshold* kreuzt. Die Steigung (*slope*) der Kurve sagt etwas über die Effizienz der qPCR aus und sollte im Idealfall bei -3,3 (100 % Effizienz) liegen. Der *slope* der in Abbildung 16 gezeigten Gerade lag bei -3,587 und somit im festgelegten Akzeptanzbereich von -3,1 bis -3,9. Der Korrelationskoeffizient R^2 gibt an, wie linear die Daten sind. Durch die Linearität lässt sich die Variabilität der Mehrfachansätze abschätzen. Wenn es einen großen Unterschied zwischen den ct-Werten der Mehrfachansätze gibt, senkt dies R^2 . Im Idealfall beträgt $R^2=1$. Eine effiziente qPCR muss einen $R^2 > 0,99$ aufweisen, somit ist $R^2=0,998$ von der gezeigten Standardkurve optimal. Mit Hilfe der Standardkurve lässt sich nun aus dem ct-Wert der unbekanntenen Proben die Kopienzahl pro Reaktionsansatz mit 10 µl Template ermitteln. Mittels Microsoft Excel konnte dann die Konzentration in 100 ml der Ausgangsprobe errechnet werden. Die Tabelle 4 zeigt eine Beispielrechnung für die Direktprobe des Kläranlagenzulaufs von August 2018.

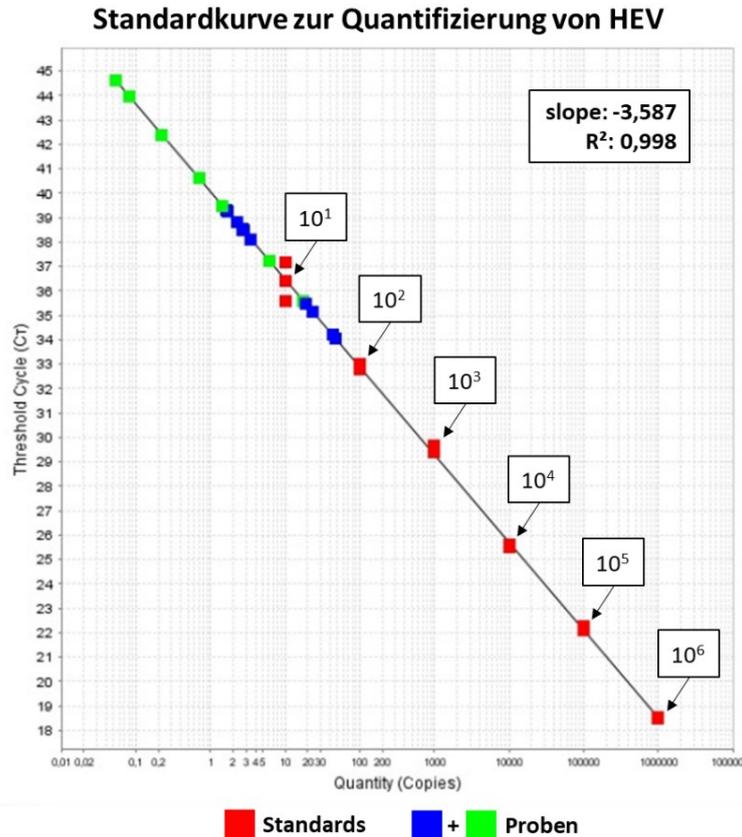


Abbildung 16: Standardkurve basierend auf den eingesetzten HEV-Standards von 10^6 Kopien/10 μ l bis 10^1 Kopien/10 μ l (rot) zur Quantifizierung von HEV in Umweltprouben (blau und grun).

Tabelle 4: Umrechnung der HEV-Kopienzahl pro Reaktionsansatz auf 100 ml der Ursprungsprobe.

A	B	C	D	E	F	G
n Kopien von 10 μ l unverd. Probe	n Kopien von 10 μ l unverd. Probe	n Kopien von 10 μ l 1:10 verd. Probe	n Kopien von 10 μ l 1:10 verd. Probe	Kopien-MW/ 200 μ l NSE von unverd. Probe	Kopien-MW/ 200 μ l NSE von 1:10 verd. Probe	Kopien-MW/ 200 μ l NSE von allen Werten
58	35	8	6	930	1.300	1.100

H	I	J	K	L
Gesamtproben- volumen Direktprobe [ml]	Kopien/100 ml Ursprungsprobe berechnet von unverd. Proben	Kopien/100 ml Ursprungsprobe berechnet von 1:10 verd. Proben	Kopien/100 ml Ursprungsprobe berechnet von allen Werten	Endergebnis pro 100 ml Probe
5	18.600	26.100	22.400	22.400

n: Anzahl; verd: verdunnt; MW: Mittelwert; NSE: Nukleinsäureeluat

Der Mittelwert der Doppelansätze (A+B bzw. C+D) wurde gebildet und mit 20 (unverdünnte Probe, E) bzw. bei der 1:10 verdünnten Probe erst mit 10 und dann mit 20 multipliziert (F), um die HEV-Kopien in 200 μ l NSE zu bestimmen (Tab. 4). Der Mittelwert der HEV-Kopien von allen 4 Ansätzen in 200 μ l NSE wurde ebenso ermittelt (G). Der MW pro 200 μ l NSE von den unverdünnten Proben (E) wurde mit

100 multipliziert und durch das Gesamtvolumen von 5 ml (H) geteilt, um die HEV-Konzentration in 100 ml der Ursprungsprobe zu berechnen (I). Ebenso wurde mit dem MW der 1:10 verdünnten Proben (F) und dem MW aller Proben (G) verfahren, um die detektierte Viruskopienzahl auf 100 ml Ausgangsprobe zu beziehen (J bzw. K). Besitzen die unverdünnten (I) und die 1:10 verdünnten Proben (J) ähnliche Konzentrationen, wurde der Wert aller Proben (K) als Endergebnis festgelegt (L). War die detektierte Kopienzahl an der Nachweisgrenze (A/B), wurde der Wert der unverdünnten Proben (I) als Endergebnis gewählt, da in der 1:10 verdünnten Probe wahrscheinlich nichts mehr nachgewiesen werden konnte. Wenn die 1:10 verdünnten Proben (C/D) wiederum ähnliche Kopienzahlen wie die unverdünnten Proben aufgewiesen haben (A/B), war davon auszugehen, dass in den unverdünnten Proben eine Inhibition stattgefunden hat. Dies kommt bei Umweltproben häufiger vor und muss daher durch die Testung verschiedener Verdünnungen ausgeschlossen werden. In diesem Fall wurde das Endergebnis der 1:10 verdünnten Proben als eher wahrscheinlich angenommen (J) und für die Berechnung verwendet.

Die Berechnung der Nachweisgrenze (NWG) bezieht sich auf 20 µl Nukleinsäure-Template (Doppelansatz mit je 10 µl), das insgesamt im unverdünnten Doppelansatz eingesetzt wurde und in dem eine Virus-Kopie detektiert werden kann. Im gesamten 200 µl NSE und somit auch in 5 ml der Direktprobe müssten sich wiederum 10 Virus-Kopien befinden, sodass eine Kopie im unverdünnten Doppelansatz detektiert werden kann. Bezogen auf 100 ml Ursprungsprobe ergibt das für Direktproben eine NWG von 200 Virus-Kopien/100 ml Probe. Wurde die Nukleinsäure von aufkonzentrierten Wasserproben mittels UZ eingesetzt, lag die NWG bei 6 Kopien/ 100 ml, bei mit PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben bei 4 Kopien/100 ml und bei GW-Proben bei 1 Kopie/100 ml. Wenn in der RT-qPCR keine Virus-Kopien detektiert werden konnten, wurde die NWG als Wert für die weiteren Berechnungen eingesetzt. Die Bestimmungsgrenze wurde als das 10-fache der NWG jeder Aufkonzentrierungsmethode definiert. Standardabweichungen wurden von 2 bis 7 vermessenen Proben innerhalb eines Monats während der einjährigen Virus-Überwachung berechnet.

2.7 PMA-qPCR

Bei einer klassischen qPCR (Abschnitt 2.6) kann nicht zwischen intakten und beschädigten Viruspartikeln unterschieden werden. Es kann lediglich eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein bestimmter Genomabschnitt, in dem die Primer und Sonde binden, vorhanden ist oder nicht. Die PMA (Propidiummonoazid)-qPCR jedoch kann einen Hinweis darauf geben, ob Viruspartikel noch intakt und somit potenziell infektiös sind (Abb. 17). Vor der Nukleinsäureisolierung und qPCR findet dabei eine Behandlung der Proben mit PMA statt. PMA ist ein Farbstoff, der in beschädigte Viruskapside eindringen kann und dort mit der DNA bzw. RNA interkaliert (Parshionikar *et al.*, 2010). Die Nukleinsäure ist dadurch während der qPCR nicht mehr amplifizierbar. Ist das Viruskapsid jedoch intakt, kann PMA nicht eindringen und eine Amplifikation von viralen Genomabschnitten ist möglich.

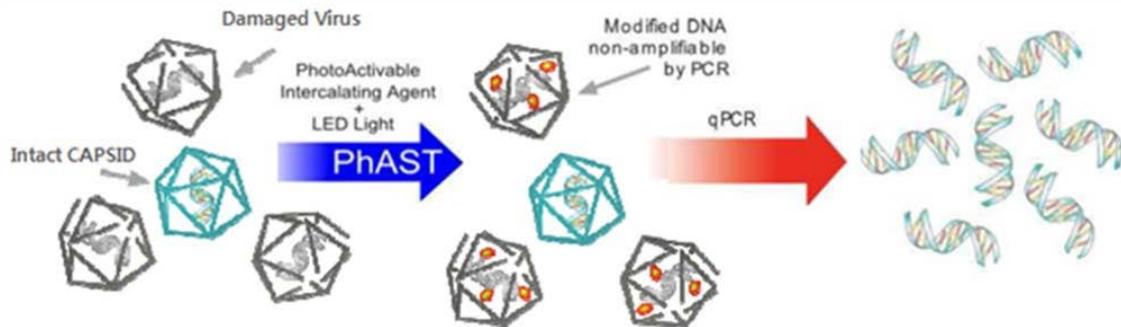


Abbildung 17: Funktionsweise der PMA-qPCR zur Unterscheidung von intakten und defekten Viruskapsiden [Internetquelle 9].

Zunächst wurde die PMA-Stock-Lösung von 20 mmol/l (gelöst in Wasser, Biotium) auf eine Arbeitskonzentration von 1 mmol/l verdünnt. PMA wurde dunkel gelagert und vor jeglichen Lichtquellen ferngehalten. Jeder Versuchsansatz bestand aus mindestens vier Kombinationen. Die Proben wurden mit oder ohne Hitze bei 60 °C bzw. 80 °C für 10 min behandelt, um die Viruskapside zu beschädigen. Außerdem wurde jeweils eine Probe mit und ohne PMA behandelt. Die gespikten Proben mit HAdV-2 (aus Zellkulturüberständen) oder die Kläranlagenzulaufproben mit einem Volumen von 200 µl wurden mit PMA versetzt und abgedunkelt, wobei PMA-Endkonzentrationen von 50 µmol/l, 100 µmol/l oder 200 µmol/l eingesetzt wurden. Die Proben wurden gevortext, 30 min auf Eis im Dunkeln in einer mit Alufolie umwickelten Styroporbox inkubiert und alle 10 min erneut gevortext. Anschließend erfolgte eine Belichtung mit der Belichtungsapparatur GenIUL PhAST Blue (PhotoActivation System for Tubes, GenIUL, S.L.) für 15 min bei 100 % Lichtintensität. Das PhAST Blue-Gerät bot die Vorteile einer definierten Wellenlänge und mehrere Proben konnten standardisiert behandelt werden (Fittipaldi *et al.*, 2012). Die Nukleinsäure wurde laut Abschnitt 2.5 aus einem Probenvolumen von 200 µl isoliert und die Viren, wie in Abschnitt 2.6.4, 2.6.5 und 2.6.7 beschrieben, quantifiziert.

2.8 Nested-RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Zu Beginn wurden zwei Primersysteme für die *nested*-RT-PCR miteinander verglichen, um zu prüfen, welche Primer am geeignetsten sind, um HEV zu detektieren. Zum einen wurden die Primer von Smith *et al.* (2013) genutzt, welche einen 242 bp großen HEV-Abschnitt in der ORF2/ORF3 überlappenden Region amplifizieren. Außerdem wurde ein zweites Primersystem, welches von Johnes *et al.* (2010) konzipiert wurde und die HEV-Genotypen 1 bis 4 detektieren kann, verwendet. Diese Primer amplifizierten ein 332 bp großes Fragment innerhalb des HEV ORF1 im RdRP-Genabschnitt (Primersequenzen siehe Tab. 5). RNA von dem HEV-Isolat 47832c (Johnes *et al.*, 2014) wurde als HEV-Positivkontrolle innerhalb der *nested*-RT-PCRs genutzt.

In der RT-PCR wurde zunächst aus der HEV RNA cDNA hergestellt. Für diese PCR wurde das OneStep Ahead RT-PCR Kit (QIAGEN) verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl pro Ansatz befanden sich 10 µl 2,5x Mastermix, 1 µl RT-Mix, 1,25 µl Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer (0,5 µM Endkonzentration), 6,5 µl nukleasefreies Wasser und 5 µl Nukleinsäure-Template. Für die anschließende *nested*-PCR wurde das Taq DNA Polymerase Kit (QIAGEN) gebraucht. Das Reaktionsvolumen von 50 µl enthielt 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase, 1 ml dNTP-Mix

(entspricht 200 µM je dNTP), 1,5 µl Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer (0,3 µM Endkonzentration), 38,75 µl Nuklease-freies Wasser und 2 µl Template, stammend aus der vorherigen RT-PCR. Die Temperaturprofile der PCRs sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die PCR-Mastermixe wurden in einem eigens dafür verwendeten Raum angefertigt, um eine Kontamination mit Nukleinsäuren zu vermeiden. Die Reaktionsmischungen der RT-PCR und *nested*-PCR wurden in 0,5 ml 8er-PCR-Strips mit anhängenden Einzeldeckeln (Brand GmbH + Co KG) pipettiert. Die Nukleinsäure-Templates wurden in einer gesonderten Sterilwerkbank zur Reaktionsmischung gegeben und mit einer Minitischzentrifuge (Model sprout, Kisker Biotech GmbH & Co. KG) zentrifugiert, bevor die HEV RNA im PCR Mastercycler epgradient S mit der Softwareversion 1.628 (Eppendorf AG) amplifiziert wurde.

Tabelle 5: Verwendete Primer und Temperaturprofile der RT-PCR und *nested*-PCR zur HEV-Detektion.

Sequenzen*		Temperaturprofil
1.	5'-CGGGTGGGAATGAATAACATGT-3' RT-PCR (Smith <i>et al.</i> , 2013)	10 min 50 °C; 5 min 95 °C; 40 Zyklen: 10 s 95 °C, 10 s 55 °C, 10 s 72 °C; 2 min 72 °C
	5'-TCGCGCATCACMTTYTTCCARAA-3' 5'-GCCATGTTCCAGACDGTRTTCCA-3' (Johne <i>et al.</i> , 2010)	
2.	5'-TYTGCCTATGCTGCCCGGCCACCG-3' <i>nested</i> -PCR (Smith <i>et al.</i> , 2013)	3 min 94 °C; 35 Zyklen: 45 s 94 °C, 45 s 60 °C, 1 min 72 °C; 10 min 72 °C
	5'-TGTGCTCTGTTTGGCCNTGGTTYCG-3' 5'-CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA-3' (Johne <i>et al.</i> , 2010)	

* D= A, G oder T; M= A oder C; N= A, C, G oder T; R= A oder G; Y= C oder T.

Die in der *nested*-PCR amplifizierten HEV-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert. Um ein 1,5%iges Agarosegel herzustellen, wurden 1,5 g Agarose (Biozym) in 100 ml 1x TBE-Puffer (Sigma-Aldrich) gegeben und die Suspension in der Mikrowelle (Panasonic) so lange aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Danach wurden 10 µl 10'000x GelRed® (Biotium) dazugegeben und die Lösung in eine Gelkammer mit einem 20 Taschen-Kamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm herausgezogen und die Taschen beladen. Dafür wurden 4 µl eines 6x konzentrierten DNA-Ladepuffers (Thermo Fisher Scientific) mit 20 µl der PCR-Produkte gemischt. Die Mischung wurde in die Geltaschen gegeben und das PCR-Amplifikat für ca. 50 min bei 90 Volt im Agarosegel durch ein Spannungsgerät (Bio-Rad Laboratories, Inc.) aufgetrennt. Als Größenmarker wurden 5 µl *Low range* DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Mit dem Agarosegel-Detektionsgerät Molecular Imager FX pro plus (Bio-Rad Laboratories, Inc.) und der dazugehörigen Software Quantity one Version 4.6.9. (Bio-Rad Laboratories, Inc.) konnten die entstandenen Banden im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Mit dieser Software konnten Abbildungen der Agarosegele hergestellt und gespeichert werden.

2.9 HEV-Sequenzierung und phylogenetische Analyse

2.9.1 Probenvorbereitung für Sequenzierung

Die mit einem UV-Transilluminator (Bioblock scientific) sichtbar gemachten Banden der erwarteten Größe von 332 bp wurden mit einem sterilen Einwegskalpell Nr.11 (Swann-Morton Limited) ausgeschnitten und mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena AG) aufgereinigt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zusammen mit 650 µl *Gel Solubilizer* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 50 °C und 1000 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf AG) vollständig aufgelöst. Danach wurden 50 µl *Binding Optimizer* hinzu pipettiert, gevortext, die Probe auf einen Spinfilter gegeben und für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter zweimal mit 700 µl Waschpuffer bei 11.000 x g für 1 min gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 2 min, um das Ethanol komplett zu entfernen. Die cDNA wurde dann zweimal mit 30 µl Elutionspuffer vom Filter eluiert. Hierbei wurde der Elutionspuffer auf den Filter gegeben, 1 min inkubiert und bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Eluate wurden vereint und mit dem Spektrophotometer DeNOVIX DS-11 FX+ (DeNOVIX) vermessen, um zu überprüfen, wie viel Nukleinsäure sich in der Probe befand. Es wurden 15 µl cDNA mit einer Konzentration von ca. 5 ng/µl mit 2 µl Vorwärts-Primer (Johnes *et al.*, 2010) gemischt und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics geschickt.

2.9.2 Phylogenetische Analysen

Die von der Firma Eurofins Genomics identifizierten HEV-Sequenzen wurden auf die Korrektheit ihrer Sequenzabfolge mit dem Nucleotide Blast-Tool getestet. Dafür wurde der Sequenzbereich im Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase im ORF1 mit anderen Sequenzen aus der Datenbank auf Aminosäure-Ebene verglichen, um ein korrektes Leseraster sicherzustellen. Die Sequenzalignments und die phylogenetischen Stammbäume wurden mit der Software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) Version 7.0 konstruiert (Kumar *et al.*, 2016).

Die erhaltenen HEV-Sequenzen aus den Umweltproben wurden mit 41 HEV-Subtyp-Referenzsequenzen (oder einer Teilmenge von 19 Genotyp-3 Referenzsequenzen) verglichen, um sie einem HEV-Subtyp zuzuordnen. Diese Referenzsequenzen wurden von Smith *et al.* (2016B) empfohlen, um verschiedene HEV-Genotyp-Untersuchungen miteinander vergleichen zu können. Die Referenzsequenzen wurden aus der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) GenBank heruntergeladen. Zusätzlich wurden die im Abwasser identifizierten HEV-Sequenzen mit 17 Sequenzen von HEV-infizierten Patienten aus der gleichen Region (Krankenhaus Charité in Berlin) verglichen (Wang *et al.* 2018B). Eine Positivkontrolle (Isolat 47832c von Johnes *et al.*, 2014) des Subgenotyps HEV-3c ist ebenso im erstellten Stammbaum enthalten. Für die multiplen Sequenzalignments wurde das *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE)-Programm genutzt. Die Referenzsequenzen wurden zuerst aligniert und auf einen Bereich von ca. 1600 Basen, in dem auch die Primer amplifizieren, eingekürzt. Danach wurden die im Abwasser identifizierten HEV-Sequenzen bzw. die Sequenzen der HEV-infizierten Patienten mit den Referenzsequenzen verglichen. Zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaums wurde als statistische Methode die Maximum-Likelihood (ML)-Methode verwendet. Das Kimura 2-Parameter-Modell (Kimura, 1980) mit diskreter Gammaverteilung konnte durch eine Funktion des MEGA-7-Programms als das am besten geeignete Modell für die ML-Methode, basierend auf dem erzeugten Alignment, identifiziert werden. Die phylogenetischen Stammbäume wurden durch 1000 Bootstrap-Wiederholungen validiert. Alle in dieser Arbeit identifizierten HEV-Sequenzen wurden in die NCBI GenBank unter den Zugangsnummern MT087290 bis MT087304 eingepflegt.

2.10 Phagenuntersuchungen

Die ermittelten Konzentrationen an HEV und CoSV in Direktproben ohne Virenaufkonzentrierung sollten mit der Konzentration an F+-spezifischen RNA-Phagen und somatischen Coliphagen (DNA-Genom) verglichen werden. Diese Phagen gelten als Indikatoren für fäkale Gewässerbelastungen. Sie wurden mit einem Zweischichtverfahren in mehreren Verdünnungsstufen durch das Auszählen von Plaques bestimmt. Diese Methode ist im Gegensatz zur qPCR ein Lebendnachweisverfahren.

In dem Zweischichtverfahren bestand die obere Schicht aus 2,5 ml Weichagar, 1 ml Probe und 1 ml Wirtsbakterium mit ca. 10^8 koloniebildenden Einheiten und die untere Schicht aus ca. 20 ml festem Agar in einer 9-cm-Petrischale. Bei einem Probenvolumen von 1 ml lag die Nachweisgrenze der Phagen bei 1 Plaque-bildenden Einheit/ml. F+-spezifische RNA-Phagen wurden gemäß DIN EN ISO 10705-1:2002 quantifiziert. In Abweichung von der DIN wurde keine RNase-Behandlung durchgeführt. Als Wirtsbakterien wurden *Salmonella enterica* Typhimurium (NCTC 12484) und als Medien Trypton-Hefeextrakt-Glucose (TYG)-Agar und TYG-Bouillon verwendet. Um die TYG-Bouillon herzustellen wurden zu 100 ml Reinstwasser 1 % Bacto™ Trypton (Becton Dickinson), 0,8 % NaCl (Sigma-Aldrich), 0,1 % Hefeextrakt (VWR International) und 1 ml von einer Lösung mit 10 % D(+)-Glucose (Merck Millipore) und 3 % Calciumchlorid (Supelco) hinzugegeben. Für den TYG-Agar wurden der Bouillon 1,6 % Agar (sifin diagnostics GmbH) bzw. für den Weichagar 0,8 % Agar hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente der Bakteriophage MS2 (DSM 13767). Die somatischen Coliphagen wurden nach DIN EN ISO 10705-2:2002 bestimmt. Hierfür wurde der Wirtsorganismus *E. coli* CN (ATCC 700078) und Modifizierter Scholtens'(MS)-Agar und MS-Bouillon zur Kultivierung genutzt. Die MS-Bouillon wurde mit 29,4 g des Trockennährmediums MS-Bouillon (sifin diagnostics GmbH) in 1 L Wasser und 6 ml einer 14,6%igen Calciumchlorid-Lösung hergestellt. Der Agar bestand aus MS-Bouillon mit 1,6 % Agar bzw. 0,8 % für den Weichagar. Der Phage ΦX174 (ATCC 13706-B1, DSM 4497) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Nach 18 ± 2 h Inkubation bei 36 ± 2 °C erfolgte die Auszählung der Plaques. Bei der Auszählung der somatischen Phagen wurden Platten mit 0 bis maximal 100 Plaques ausgewertet, für die deutlich kleineren Plaques der F+-Phagen lag der Wert bei 0 bis maximal 300 Plaques. Anhand der gezählten Plaques wurde die Anzahl X der Plaque-bildenden Einheiten (pfu) der Phagen in 1 ml Probe (pfu/ml) mit der Formel 1 berechnet:

$$X = \frac{N}{((n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2) \dots + (n_n V_n F_n))} \quad (1)$$

X: Anzahl Plaque-bildender Einheiten Phagen je Milliliter (pfu/ml)

N: Gesamtanzahl von gezählten Plaques auf allen Platten

n_1, n_n : Anzahl der Parallelbestimmungen, bezogen auf jede Verdünnung

V_1, V_n : im Test eingesetztes Probenvolumen in ml bezogen auf F_1, F_n

F_1, F_n : Verdünnungs-(oder Konzentrations-)faktor, bezogen auf V_1, V_n

2.11 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden durchgeführt, um zu bewerten, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Virusaufkonzentrierungsmethoden (Abb. 22 Ergebnisteil) sowie zwischen den monatlichen Viruskonzentrationen der Kläranlagen Zu- und Ablaufproben (Abb. 24 Ergebnisteil) vorlagen. Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel 2019 durchgeführt. Um die erhobenen Daten auf Normalverteilung zu testen, wurde zunächst ein Quantil-Quantil (Q-Q)-Diagramm erstellt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Die gemessenen Viruskonzentrationen der monatlich untersuchten Kläranlagenproben wurden zunächst der Größe nach sortiert und den Rängen 1 bis 12 zugeordnet.
2. Von jedem der 12 Datenwerte wurde das Perzentil berechnet, indem von dem zugeordneten Rang 0,5 subtrahiert wurde und dieser Wert durch die Anzahl ($n=12$) geteilt wurde. Die Resultate stellen codierte Ränge dar.
3. Basierend auf den codierten Rängen wurden mit der Excel-Funktion =NORM.S.INV die dazugehörigen theoretischen z-Werte bei einer Standardnormalverteilung ermittelt.
4. Die empirischen z-Werte, basierend auf den gemessenen Viruskonzentrationen, wurden mit der Formel 2 bestimmt:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad (2)$$

Z: empirischer z-Wert

X: gemessene Viruskonzentration

μ : Mittelwert der 12 Viruskonzentrationen

σ : Standardabweichung.S (S steht für Stichprobe) der 12 Viruskonzentrationen

Die empirischen z-Werte wurden dann den theoretischen z-Werten der Standardnormalverteilung graphisch gegenübergestellt. Zwei Q-Q-Diagramme von Kläranlagenproben sind im Anhang dargestellt (Abb. 42). Falls Daten normalverteilt sind, ergeben die Werte annähernd eine Gerade und besitzen die gleiche Verteilung. In den Q-Q-Diagrammen wird deutlich, dass die Datenpunkte nicht auf einer Gerade liegen, die gemessenen Viruskonzentrationen sind dementsprechend nicht normalverteilt.

Die Daten waren ordinal skaliert, was bedeutet, dass sie in eine logische Reihenfolge gebracht werden können, die Abstände zwischen den einzelnen Werten aber nicht quantifizierbar sind. Da die quantitativen Viruskonzentrationen nicht normalverteilt, aber ordinal skaliert waren, wurde der Mann-Whitney U-Test für die statistischen Analysen gewählt. Mit einem 95 %-Konfidenzintervall wurden die Daten auf statistische Signifikanz überprüft, es wurde also getestet, ob sich zwei Stichproben signifikant voneinander unterscheiden.

Für den Mann-Whitney U-Test wurden alle Viruskonzentrationen, die miteinander verglichen werden sollten, gemäß ihrer Größe mit Rängen versehen und die Rangsummen der jeweiligen Gruppe (z. B. Kläranlagenzulaufproben vs. Kläranlagenablaufproben) ermittelt. Der U-Wert wurde anschließend mit der Formel 3 berechnet:

$$U_{\text{errechnet}} = n_1 \cdot n_2 + \frac{(n_1 \cdot (n_1 + 1))}{2} - R_1 \quad (3)$$

n_1 = Stichprobengröße der Gruppe mit der größeren Rangsumme

n_2 = Stichprobengröße der Gruppe mit der kleineren Rangsumme

R_1 = größere der beiden Rangsummen

Der Wert von $U_{\text{errechnet}}$ wurde nun mit einem U_{kritisch} -Wert, der je nach Stichprobengröße variiert und Tabellen (zweiseitiger Test bei $\alpha = 0,05$) entnommen werden kann, verglichen. Da jeweils 12 monatliche Kläranlagenproben miteinander verglichen wurden, war der kritische Wert von 37 für die statistischen Berechnungen maßgebend (Abbildung 43 im Anhang [Internetquelle 10]). Ist $U_{\text{errechnet}} \leq U_{\text{kritisch}}$, wird die Nullhypothese (es gibt keinen Unterschied) verworfen. Demnach wird die Alternativhypothese angenommen, dass es einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den beiden Stichproben gibt.

2.12 Zusammenfassung aller Methoden

Abbildung 18 zeigt die Abfolge der wichtigsten Methoden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Nachdem die Proben aus der Umwelt entnommen wurden, erfolgte die Aufkonzentrierung der Viren via PEG-Fällung, UZ oder GW-Filtration bzw. die Virenelution vom Sediment. Direktproben ohne Virenaufkonzentrierung wurden ebenfalls analysiert und für Phagenuntersuchungen genutzt. Die Proben ohne Aufkonzentrierung sowie PEG-Proben wurden mit PMA behandelt, um die Intaktheit der Viruspartikel zu überprüfen. Nach der Aufkonzentrierung bzw. Elution erfolgte die Extraktion der viralen Nukleinsäuren. Das Eluat der Nukleinsäureextraktion wurde dann für die (RT-)quantitative PCR oder *nested*-RT-PCR mit anschließender Genotypisierung der detektierten HEV-Stämme eingesetzt.

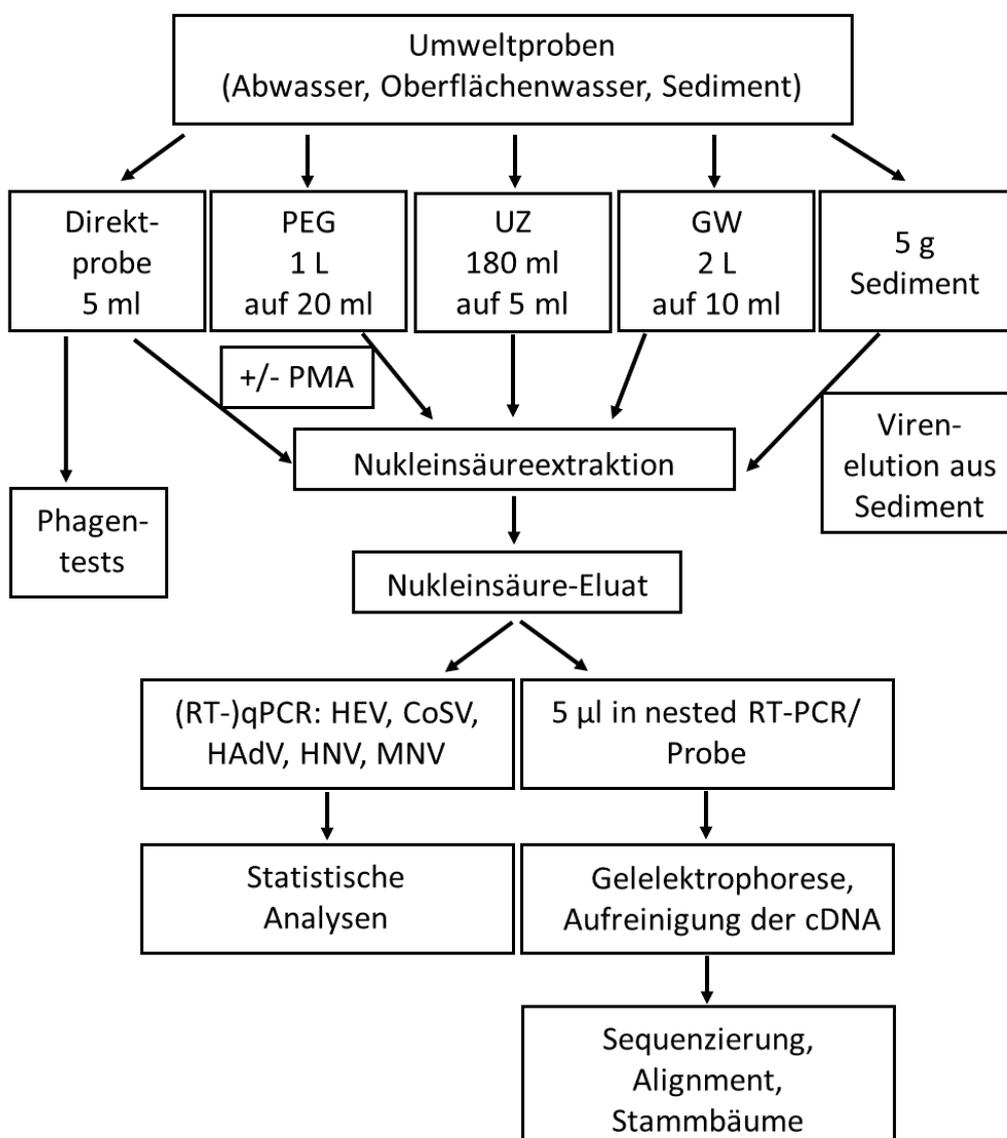


Abbildung 18: Diagramm des Methodenablaufes inklusive Probenahme, Aufkonzentrierungsverfahren, Nukleinsäureextraktion, Detektion und Charakterisierung der Viren.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenvergleiche für den Nachweise von HEV

Um das geeignetste Virusaufkonzentrierungsverfahren für die Detektion von HEV RNA aus Umweltproben zu bestimmen, wurden die Viren aus Abwasserproben mit drei verschiedenen Methoden aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.3). Das für diesen Methodenvergleich verwendete Abwasser stammte aus einem Kläranlagenzulauf vom selben Probenahmetag. Mittels RT-qPCR wurde die Konzentration an HEV in den aufkonzentrierten Proben und in Direktproben ohne Aufkonzentrierung bestimmt und verglichen (qPCR-Verfahren siehe Abschnitt 2.6). Insgesamt wurden 9 Direktproben auf HEV RNA getestet sowie jeweils 7 Abwasserproben, die mittels Ultrazentrifugation (UZ), Polyethylenglykol-Fällung (PEG) oder Glaswollefiltration (GW) aufkonzentriert wurden (Tab. 6). Anhand dieses Experiments konnte außerdem abgeschätzt werden, wie weit die gemessenen HEV-Konzentrationen streuen bzw. wie präzise und reproduzierbar die ermittelten Werte waren.

Tabelle 6: Methodenvergleich: Viren in Abwasserproben wurden mit 3 Methoden (UZ, PEG, GW) aufkonzentriert und via RT-qPCR auf HEV getestet, ebenso wie Direktproben.

Methodenvergleich	HEV-positiv/ insgesamt getestet	Konzentrationsbereich HEV- positiver Proben [Kopien/100 ml]
Direkt	9/9	7×10^3 bis 2×10^4
UZ	7/7	1×10^3 bis 2×10^3
PEG	1/7	8
GW	0/7	-

Die vier verwendeten Methoden (Tab. 6) besitzen verschiedene Nachweisgrenzen (NWG). Direktproben haben aufgrund ihres geringen Probenvolumens eine NWG von 200 Kopien/100 ml, UZ-Proben 6 Kopien/100 ml, PEG-Proben 4 Kopien/100 ml und GW-Proben 1 Kopie/100 ml. In allen 9 getesteten Direktproben der Kläranlagenzulaufe wurden HEV detektiert. Die gemessenen Konzentrationen lagen dabei in einem Bereich von 7×10^3 Kopien/100 ml bis 2×10^4 Kopien/100 ml. Die HEV RNA konnte ebenfalls in allen mit UZ aufkonzentrierten Proben nachgewiesen werden. Die Konzentrationen unterschieden sich hierbei kaum und lagen zwischen 1×10^3 Kopien/100 ml bis 2×10^3 Kopien/100 ml. Direktproben und mit UZ aufkonzentrierte Proben scheinen somit besser zur HEV RNA Detektion geeignet zu sein als mittels PEG-Fällung aufkonzentrierte Proben. Mit dem PEG 6000-Verfahren konnte nur eine Probe positiv auf HEV RNA getestet werden. Die PEG-Fällung kann jedoch nicht per se als ungeeignet angesehen werden. Das in diesem Experiment genutzte Abwasser stammte von einem Probenahmetag. Die Zusammensetzung des Abwassers variiert täglich und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich an diesem Tag Komponenten im Abwasser befanden, die möglicherweise die PEG-Methode beeinflussten. In dieser Arbeit wurde die PEG-Methode neben der UZ daher weiterhin zur Virusaufkonzentrierung angewendet, jedoch nur bei gleichzeitiger Testung mit anderen Methoden. Die erhaltenen Ergebnisse können so besser mit der Literatur verglichen werden, da die PEG-Fällung teilweise auch in anderen Studien verwendet wurde, um HEV in Abwasserproben

zu detektieren. Keine Probe, die mit der GW-Filtration aufkonzentriert wurde, zeigte positive HEV-Ergebnisse. Diese Methode ist damit nicht geeignet, um HEV RNA nachzuweisen. Um die mehrfach bestimmten HEV-Konzentrationen der Direktproben und der mit UZ aufkonzentrierten Abwasserproben (Tab. 6) besser miteinander vergleichen zu können, sind die einzelnen Messdaten in Abbildung 19 dargestellt.

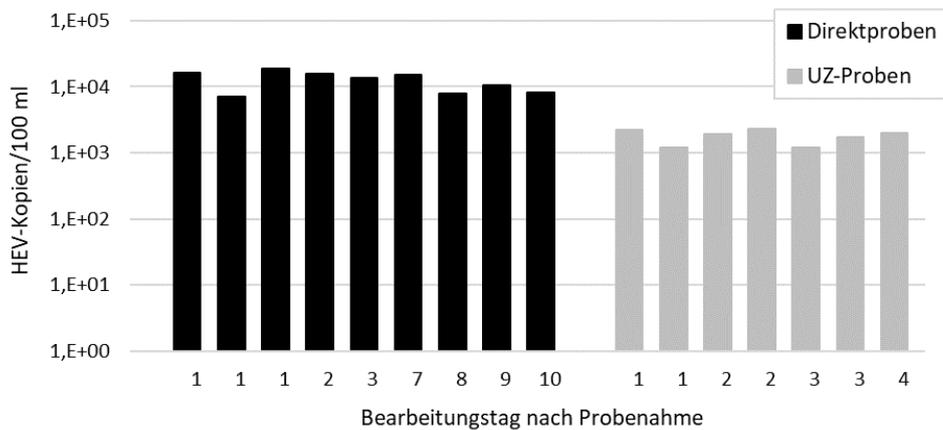


Abbildung 19: Vergleich der HEV-Konzentrationen in Direktproben und mit UZ aufkonzentrierten Abwasserproben mit Kennzeichnung der Bearbeitungstage nach Probenahme.

Die mittels RT-qPCR gemessenen HEV-Konzentrationen der neun Direktproben schwankten in einem verhältnismäßig geringen Bereich von 0,5 Log_{10} -Stufen (Abb. 19). Die Werte der mittels UZ aufkonzentrierten Proben unterschieden sich lediglich um 0,1 Log_{10} -Stufen. Der Mittelwert aller Direktproben lag bei 1×10^4 Kopien/100 ml und war um 0,8 Log_{10} -Stufen höher als jener der UZ-Proben. Dadurch, dass die Abwasserproben bei 4°C gelagert und an verschiedenen Tagen bearbeitet wurden (Bearbeitungstag 1 bis 10 nach Probenahme, Abb. 19), konnte eine interessante Nebenerkenntnis zur Stabilität der HEV bei 4°C gewonnen werden: die detektierbare Konzentration an HEV RNA blieb über mindestens 9 Tage stabil. Für Abwasserproben mit einer hohen Viruslast scheint die RT-qPCR eine präzise Methode zu sein, um HEV direkt oder nach einer UZ-Aufkonzentrierung darin nachzuweisen. In dem folgenden Experiment (Abb. 20) sollte überprüft werden, wie sich verschiedene Ausgangsvolumen der UZ auf das Endergebnis der ermittelten HEV-Konzentration auswirken.

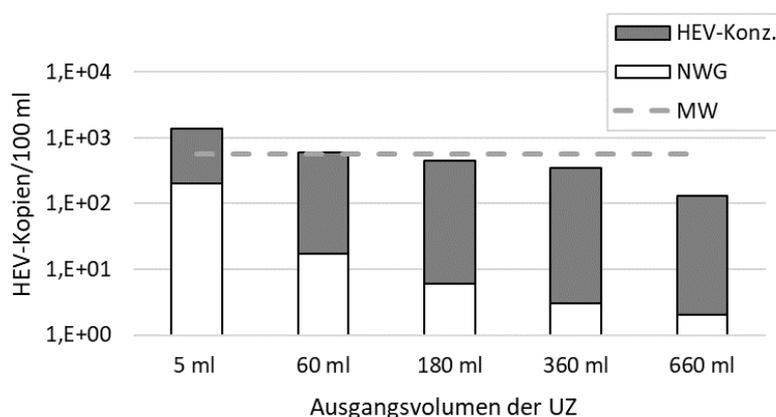


Abbildung 20: Einfluss der Probenvolumen für die Ultrazentrifugation (UZ) im Vergleich zur Direktmessung (5 ml), um HEV RNA in Abwasserproben via RT-qPCR zu quantifizieren.

Um ein geeignetes Ausgangsvolumen für die UZ-Aufkonzentrierung zu bestimmen, wurden vier verschiedene Volumina derselben Probe mittels UZ aufkonzentriert, die Konzentration an HEV gemessen und mit der Direktprobe verglichen (Abb. 20). HEV waren in allen Probenvolumina nachweisbar. Je höher das Ausgangsvolumen war, desto geringer war die Nachweisgrenze (NWG), aber erstaunlicherweise auch die detektierte HEV-Konzentration/100 ml. Der Mittelwert (MW) der gemessenen HEV-Konzentration der Direktprobe und der vier Ausgangsvolumina ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Anhand des MW wurde ein Ausgangsvolumen von 180 ml für die weiteren Untersuchungen gewählt. Die NWG mit 6 HEV-Kopien/100 ml war niedrig und das Volumen ausreichend, um die Konzentration der Viren nicht zu überschätzen, wie es bei der Direktprobe der Fall sein könnte bzw. zu unterschätzen, wie es bei einem Ausgangsvolumen von 360 ml oder 660 ml passieren könnte. Pro Zentrifugationslauf konnten bei einem Ausgangsvolumen von 180 ml zwei Proben gleichzeitig bearbeitet werden.

3.2 Auswahl geeigneter Probenahmestellen

Um das Vorkommen von Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in Deutschland zu untersuchen, wurden Abwasser- und Oberflächenwasserproben in Berlin, Brandenburg und Bayern genommen und beprobt (Probenahme siehe Abschnitt 2.2). Ein Überblick der Probenahmestellen ist in Abbildung 21 gezeigt.

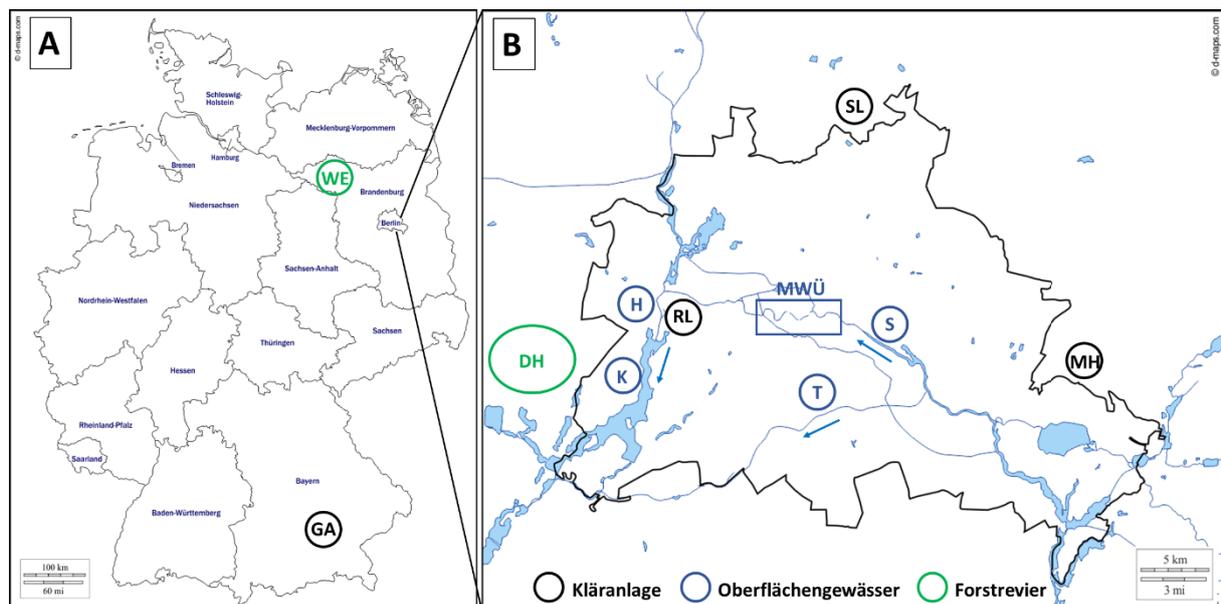


Abbildung 21: Überblick aller Probenahmestellen. A: Umriss von Deutschland mit Kennzeichnung der Kläranlage Garching bei München (GA) und dem Forstrevier Weisen (WE) in Brandenburg. B: Umriss von Berlin und Umland mit Benennung der Oberflächengewässer Spree (S), Havel (H), Teltowkanal (T) und der Badestelle Kleine Badewiese (K). Blaue Pfeile markieren die Fließrichtungen der Flüsse. Die Kläranlagen Ruhleben (RL), Schönerlinde (SL) und Münchehofe (MH) sowie das Forstrevier Döberitzer Heide (DH) sind ebenfalls gekennzeichnet.

Es wurden insgesamt 4 Kläranlagen (KA) in 3 Bundesländern beprobt, die KA Garching (GA) befindet sich im Bundesland Bayern, die KA Ruhleben (RL) in Berlin und die KA Schönerlinde (SL) und

Münchehofe (MH) in Brandenburg (Abb. 21). Das ungereinigte Abwasser in der Kläranlage, nach der Entfernung von groben Bestandteilen in der Rechenanlage (Ablauf Vorklärung), wurde als Kläranlagenzulauf definiert und auf HEV und CoSV untersucht. Das von den KA gereinigte Abwasser, bezeichnet als Kläranlagenablauf, wurde ebenfalls auf Viren untersucht, um die Reinigungsleistung der KA bzw. die Reduktion der Viruskonzentrationen nach der Klärung zu bestimmen. In der KA Ruhleben wurden Ablaufproben ohne und mit zusätzlicher UV-Behandlung (1100 J/m²) beprobt. In dieser KA wird das gereinigte Abwasser in den Wintermonaten ohne UV-Bestrahlung in den Ruhlebener Altarm eingeleitet, der wiederum in die Havel (H) fließt. In den Sommermonaten wird das geklärte Abwasser zusätzlich mit UV-Licht behandelt und zum Teil unterirdisch in den Teltowkanal (T) eingeleitet, sodass die Havel, an der sich die Badestelle Kleine Badewiese (K) befindet, mikrobiologisch weniger belastet wird. In den anderen 3 KA wurden die Ablaufproben ohne zusätzliche UV-Behandlung untersucht. Oberflächengewässer wurden ebenfalls auf HEV und CoSV getestet, um zu überprüfen, ob die Viren auch dort vorkommen, wo sie eine potenzielle Gefahr für den Menschen darstellen könnten. Bei normalen Wetterbedingungen wurden die Berliner Flüsse Spree (S) und Havel (H) untersucht sowie die in der Havel lokalisierte Badestelle Kleine Badewiese (K). In Berlin gibt es viele Mischwasserkanäle für Abwasser und Regenwasser, welche nach starken Regenfällen überlaufen. Ungeklärtes Abwasser gelangt dadurch in die Spree. Dieser Fluss wurde deshalb nach Starkregenereignissen an Stellen beprobt, an denen Mischwasserüberläufe (MWÜ) in die Spree fließen. Um festzustellen, ob Wildschweine auch HEV in die Umwelt einbringen können, wurden Oberflächengewässerproben und Wildschweinleberproben aus den gleichen Gebieten parallel auf HEV getestet. Die Proben für diesen Test wurden aus zwei Brandenburger Forstrevieren, Döberitzer Heide (DH) und Weisen (WE), an verschiedenen Stellen genommen.

3.3 Nachweise von HEV in Abwässern

3.3.1 Vorkommen in Kläranlagenzuläufen und -abläufen

Um das Vorkommen von HEV in der Umwelt zu analysieren, wurden zunächst Abwasserproben untersucht, da diese eine hohe Konzentration an humanpathogenen Viren enthalten. Es wurden Zuläufe und Abläufe vier verschiedener Kläranlagen getestet (Tab. 7).

Tabelle 7: Detektion von HEV RNA in Zu- und Ablaufproben von vier verschiedenen KA mittels RT-qPCR.

KA	Reinigungs- kapazität [m ³ /Tag]	Kläranlage Zulaufproben			Kläranlage Ablaufproben		
		Getestet [n]	HEV positiv [n (%)]	Median positive Proben*	Getestet [n]	HEV positiv [n (%)]	Median positive Proben*
RL	257.000	111	93 (84 %)	3x10 ³	83	26 (31 %)	1x10 ³
GA	5.500	10	9 (90 %)	2x10 ³	2	1 (50 %)	8x10 ²
SL	119.000	7	6 (86 %)	4x10 ³	3	3 (100 %)	4x10 ²
MH	40.000	6	6 (100 %)	1x10 ⁴	n. a.	n. a.	n. a.

RL: Ruhleben, GA: Garching, SL: Schönerlinde, MH: Münchehofe; n. a.: nicht angegeben, * [HEV-Kopien/100 ml]

Unter den vier beprobten KA befanden sich die städtische KA Ruhleben (RL) und die drei vorstädtischen KA Garching (GA), Schönerlinde (SL) und Münchehofe (MH; Tab. 7). Die Lokalisation dieser KA in Deutschland ist in Abbildung 21 gezeigt. Neben Direktproben wurden auch Proben, die mittels UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, mit RT-qPCRs auf HEV RNA geprüft, um einen Überblick über das HEV-Vorkommen zu erhalten. Die vier KA unterscheiden sich in ihren Einzugsgebieten und Reinigungskapazitäten, wobei die KA RL mit einer Reinigungskapazität von 257.000 m³ Abwasser pro Tag die größte ist. Die KA SL besitzt mit 119.000 m³/Tag ca. die Hälfte der Kapazität von RL. Die Kläranlagen MH und GA reinigen deutlich weniger Abwasser pro Tag.

Von 111 getesteten Zulaufproben der KA RL waren 84 % HEV RNA positiv mit einem Median von 3x10³ Kopien/100 ml. Unter den 93 HEV-positiv getesteten Proben waren 50 Direktproben, 24 UZ-Proben und 19 PEG-Proben. HEV RNA wurde außerdem in 26 von 83 Ablaufproben (31 %) der KA RL mit einem Median von 1x10³ Kopien/100 ml der positiven Proben detektiert. In den drei vorstädtischen KA wurden insgesamt weniger Proben getestet. Hepatitisviren wurden hier in 86 % bis 100 % der Zulaufproben nachgewiesen. Der Median der HEV-positiven Zulaufproben lag in diesen drei KA in einem Bereich von 2x10³ Kopien/100 ml bis 1x10⁴ Kopien/100 ml. Die dazugehörigen Ablaufproben waren zu 50 % (GA) und 100 % (SL) positiv für HEV, wobei der Median dieser Proben bei 8x10² Kopien/100 ml bzw. 4x10² Kopien/100 ml lag.

Um das HEV-Vorkommen detaillierter zu analysieren, wurden monatlich Zulaufproben der KA RL über ein Jahr hinweg genommen und auf HEV RNA untersucht (Abb. 22). In die einjährige Überwachung wurden Direktproben und mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentrierte Proben einbezogen. Jeden Monat wurden die HEV-Konzentrationen von mehreren Direktproben vermessen, die dazugehörige Standardabweichung ist in Abbildung 24 gezeigt. In Abbildung 22 sind die Mittelwerte der gemessenen HEV-Konzentrationen monatlich dargestellt.

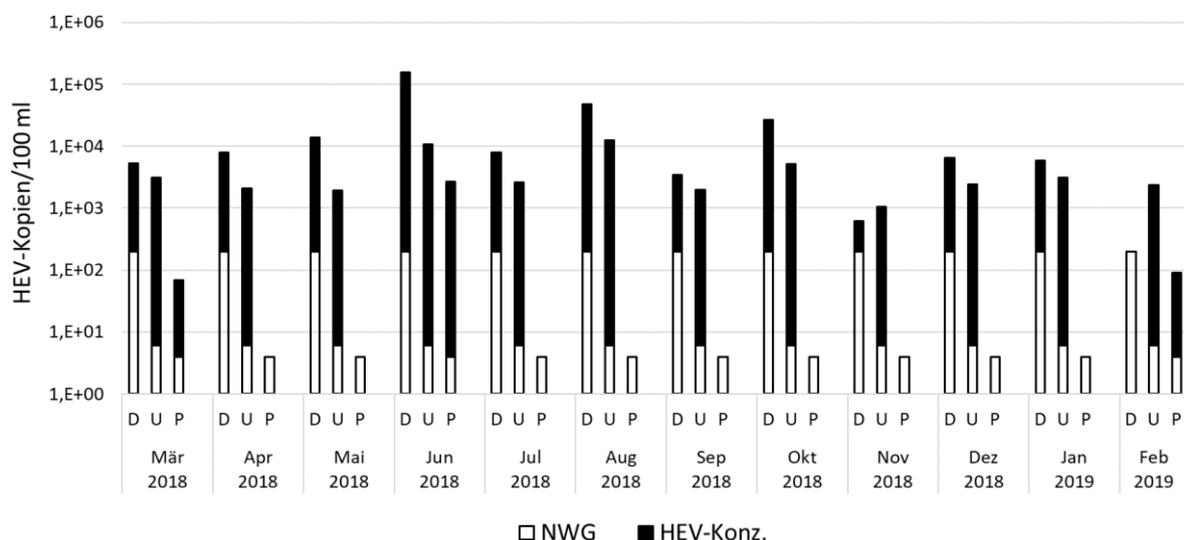


Abbildung 22: HEV-Konzentrationen in monatlichen Zulaufproben der KA RL im Verlauf von einem Jahr. Jeden Monat wurden Direktproben (D) und mit UZ (U)- und PEG-Fällung (P) aufkonzentrierte Proben via RT-qPCR auf HEV RNA untersucht. Schwarze Balken repräsentieren die gemessenen HEV-Konzentrationen über der Nachweisgrenze (NWG, weiße Balken), welche je nach Methode variiert.

Bei der Überwachung des HEV-Vorkommens über ein Jahr wird zunächst deutlich, dass es keinen klaren saisonalen Verlauf gibt (Abb. 22). Hohe Detektionsraten konnten bei Direktproben (HEV RNA positiv in 11 von 12 monatlichen Proben) und mit UZ aufkonzentrierten Proben (HEV RNA in allen Proben detektiert) beobachtet werden. Die Werte lagen in einem ähnlichen Bereich, obwohl die HEV-Konzentration der Direktproben meist etwas höher war als die der UZ-Proben, wie es auch in Abbildung 20 festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu resultierten die PEG-Proben in geringeren HEV RNA Konzentrationen und geringeren Detektionsraten, 3 von 12 monatlichen Proben waren HEV RNA positiv. Die mittels PEG aufkonzentrierten Proben zeigten somit, wie bereits im Vortest (Tab. 6) angedeutet, signifikant unterschiedliche Konzentrationen im Vergleich zu den Direktproben und UZ-Proben (Mann-Whitney U-Test, $p < 0.05$; siehe Abschnitt 2.11). Um die monatlich gemessenen Konzentrationen an HEV (Abb. 22) mit anderen Indikatorviren vergleichen zu können, wurden von jeder monatlichen Probe zusätzlich die Konzentrationen an humanen Adenoviren und Noroviren (siehe Abschnitt 2.6), somatischen Coliphagen und F+-spezifischen RNA-Phagen ermittelt (siehe Abschnitt 2.10). Von Zulaufproben der Kläranlage RL wurden monatlich über einen Zeitraum von einem Jahr Direktmessungen für jedes Virus durchgeführt. Die Ergebnisse davon sind in Abbildung 23 zusammengestellt.

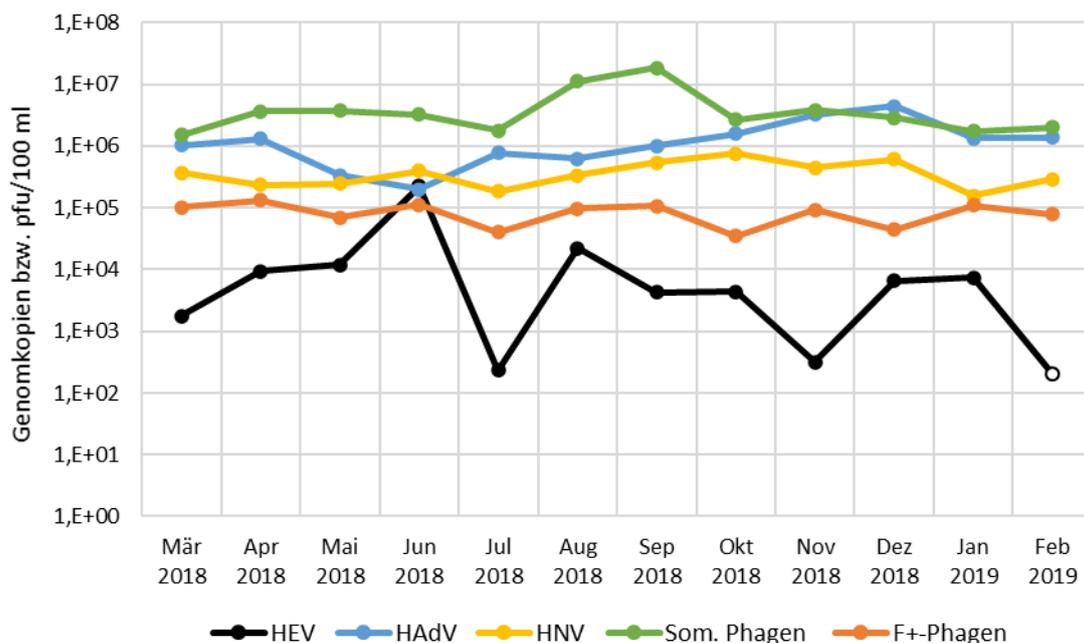


Abbildung 23: Quantifizierte Viruskonzentrationen von HEV, HAdV, HNV, somatischen Phagen und F+-Phagen in Direktproben von monatlichen Kläranlagenzulaufen von März 2018 bis Februar 2019.

In jeder monatlichen KA-Zulaufprobe über ein Jahr hinweg konnten HEV, HAdV, HNV, somatische Phagen und F+-Phagen detektiert werden, mit Ausnahme von Februar 2019. In diesem Monat lag die gemessene Konzentration an HEV unterhalb der Nachweisgrenze (in Abb. 23 wurde die NWG als Wert gesetzt und als unausgefüllter Datenpunkt dargestellt). In Kläranlagenzulaufproben sind die Viruskonzentrationen somit ausreichend hoch, dass die Viren in einem Volumen von 5 ml ohne weitere Aufkonzentrierungen nachgewiesen werden können. Keines der getesteten Viren zeigte eine klare Saisonalität. Somatische Phagen (in grün markiert) wiesen Konzentrationen von durchschnittlich 5×10^6 Plaque-bildenden Einheiten (pfu)/100 ml in dem untersuchten Jahr auf. Ähnliche Konzentrationen

konnten von humanen Adenoviren (blau) und Noroviren (gelb) festgestellt werden, mit Mittelwerten von 1×10^6 Kopien/100 ml bzw. 4×10^5 Kopien/100 ml im Jahresverlauf. F+-spezifische Phagen (orange) zeigten im Durchschnitt Konzentrationen von 9×10^4 pfu/100 ml und HEV (schwarz gekennzeichnet) wiesen einen Mittelwert von 2×10^4 Kopien/100 ml in den untersuchten Proben auf. HEV kamen also in den Kläranlagenzulaufproben außer im Monat Juni 2018 in geringeren Konzentrationen als die parallel beprobten Indikatorviren vor.

Nun sollte auch die Reinigungsleistung der KA in Bezug auf HEV untersucht werden. Der Tabelle 7 war zu entnehmen, dass sich die Anzahl der HEV RNA positiv getesteten Proben in der vorwiegend beprobten KA RL von 84 % in den Zulaufproben auf 31 % in den Ablaufproben verringert hatte. Der Median der positiven Proben unterschied sich jedoch nicht wesentlich mit 3×10^3 Kopien/100 ml in den Zulaufproben und 1×10^3 Kopien/100 ml in den Ablaufproben. Um die Reduktion innerhalb der Kläranlage besser beurteilen zu können, wurden die Zu- und Ablaufproben der KA RL ein Jahr lang auf HEV RNA geprüft. Die Zulauf- und Ablaufproben wurden am gleichen Tag genommen, jedoch ohne die Durchflusszeit während der Abwasserbehandlung zu berücksichtigen. Jeden Monat wurden mehrere 1L-Proben gesammelt und davon Direktproben mittels RT-qPCR untersucht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen HEV-Konzentrationen aller Proben je Monat sind in Abbildung 24 gezeigt.

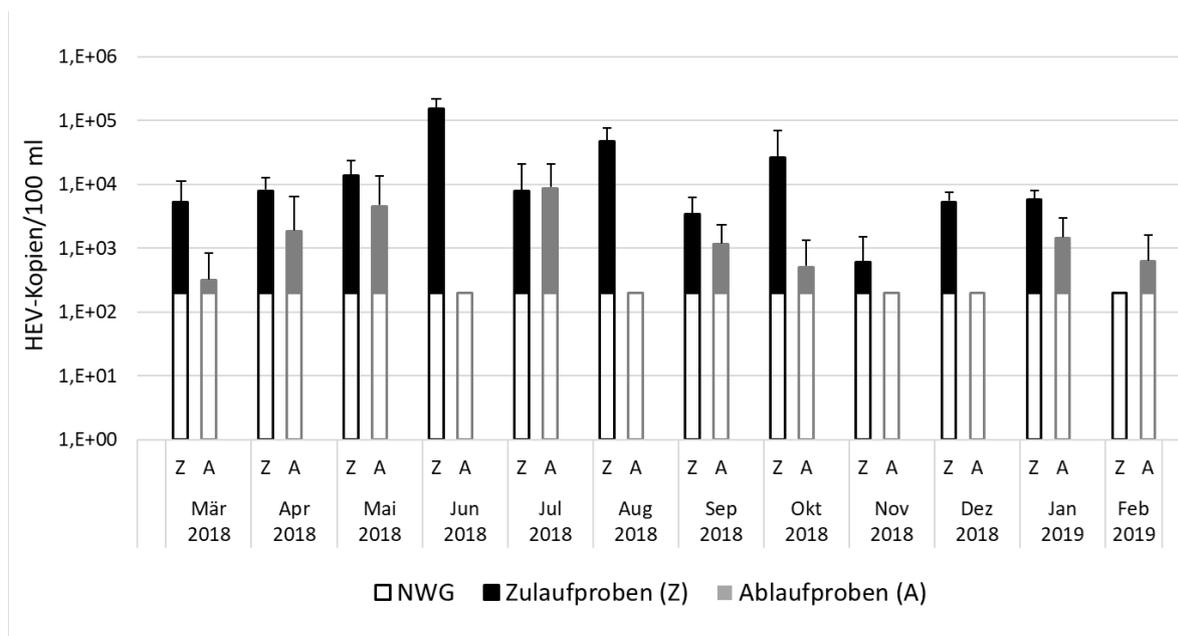


Abbildung 24: Verlauf der HEV RNA-Konzentrationen in monatlichen Zulaufproben (Z) und Ablaufproben (A) der KA RL, analysiert mit der RT-qPCR in Direktproben. Schwarze und graue Balken bilden die HEV-Konzentration über der Nachweisgrenze (weiße Balken, 200 Kopien/100 ml) ab.

Im Jahresverlauf von März 2018 bis Februar 2019 waren, basierend auf der NWG von 200 Kopien/100 ml, 11 der 12 monatlichen Zulaufproben und 8 Proben vom Ablauf der KA RL positiv für HEV RNA. Der errechnete Mittelwert aller 12 monatlichen Zulaufproben lag bei 2×10^4 HEV Kopien/100 ml. Die Ablaufproben dieses Jahres resultierten in einem Mittelwert von 2×10^3 HEV-Kopien/100 ml. Somit war die Konzentration der HEV RNA im Durchschnitt in den Ablaufproben im Vergleich zu den Zulaufproben um ca. 1 Log_{10} -Stufe reduziert. Die HEV-Konzentrationen der Zulaufproben waren dabei signifikant höher als die der Ablaufproben (Mann-Whitney U-Test, $p < 0.05$). Wenn die

Bestimmungsgrenze auf das 10-fache der NWG (2000 Kopien/100 ml) gesetzt wurde, waren 10 von 12 monatliche Zulaufproben und nur 2 Ablaufproben HEV RNA positiv. Dadurch wird deutlich, dass die Reinigungsleistung der KA vor der UV-Behandlung mindestens eine Log_{10} -Stufe beträgt. Die Auswirkungen der UV-Behandlung auf HEV RNA wird im nächsten Abschnitt 3.3.2 untersucht.

3.3.2 Vorkommen in Kläranlagenabläufen nach UV-Behandlung

Die Kläranlage Ruhleben reinigt das Abwasser in den Sommermonaten April bis September zusätzlich mit einer UV-Behandlung. In der Badesaison soll durch die zusätzliche Desinfektion des Kläranlagenablaufs, der in die Oberflächengewässer eingeleitet wird, eine gute Wasserqualität der Badegewässer in der Havel gewährleistet werden (Kreislauf siehe Abb. 1). Ablaufproben der KA RL wurden vor (-) und nach (+) der UV-Behandlung auf HEV RNA untersucht, um den Einfluss dieser zusätzlichen Desinfektionsstufe zu untersuchen. Die Durchflusszeit während der Abwasserbehandlung wurde dabei nicht berücksichtigt, da Zu- und Ablaufproben zum gleichen Zeitpunkt entnommen wurden. Je Monat wurden mehrere Direktproben vor und nach der UV-Behandlung analysiert und der Mittelwert der HEV-Konzentrationen errechnet (Tab. 8). Von den mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben wurde jeweils ein Wert pro Monat ermittelt. Für den Monat Juli sind keine Werte gezeigt, da die UV-Anlage nicht angeschaltet war, als die Proben genommen wurden.

Tabelle 8: HEV RNA-Konzentrationen (Direkt-, UZ-, PEG-Proben) der Kläranlagenabläufe vor (-) und nach (+) UV-Behandlung während der Abwasserreinigung in der KA RL wurden via RT-qPCR ermittelt.

Monat (2018)	Direkt		UZ		PEG	
	- UV	+ UV	- UV	+ UV	- UV	+UV
April	2×10^3	<200	< 6	72	55	n. a.
Mai	5×10^3	5×10^2	< 6	< 6	< 4	< 4
Juni	< 200	4×10^3	2×10^3	3×10^3	< 4	< 4
August	< 200	1×10^3	< 6	< 6	< 4	< 4
September	1×10^3	<200	< 6	< 6	< 4	< 4

n. a.: nicht angegeben; alle Werte beziehen sich auf HEV-Kopien/100 ml

In den Monaten April, Mai und September 2018 konnte eine leichte HEV RNA Reduktion in den mit UV-Licht behandelten, nicht aufkonzentrierten Abwasserproben beobachtet werden (Tab. 8). In den KA-Ablaufproben nach UV-Behandlung konnte jedoch keine allgemeine Reduktion der HEV-Konzentrationen im Vergleich zu den Proben ohne UV-Desinfektion beobachtet werden. In zwei Direktproben (Juni und August) und zwei UZ-Proben (April und Juni) wurden nach der UV-Desinfektion sogar etwas höhere HEV-Konzentrationen detektiert, die jedoch im Schwankungsbereich der Messung liegen. In den übrigen durch UZ- und PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben konnte vor und nach der UV-Behandlung keine HEV RNA nachgewiesen werden. Lediglich im April 2018 wurde eine geringe Konzentration (55 Kopien/100 ml) an HEV RNA in der mittels PEG-Fällung aufkonzentrierten Probe vor UV-Desinfektion detektiert. In diesem Monat stand keine PEG-Probe nach UV-Behandlung zur Verfügung.

Die Methode der qPCR lässt generell keine Aussage über die Lebensfähigkeit der Viren zu, da lediglich getestet wird, ob Nukleinsäure vorhanden ist oder nicht. Phagen werden hingegen mit einem Lebendnachweis anhand von Kulturverfahren nachgewiesen. Ablaufproben der KA RL mit und ohne UV-Behandlung wurden deshalb ebenfalls auf somatische- und F+-spezifische Phagen getestet (Abb. 25). In denselben Proben wurden auch HAdV und HNV mittels qPCR untersucht, um deren Konzentrationen mit den HEV-Werten zu vergleichen. Es wurden mehrere Direktproben vor und nach der UV-Desinfektion je Monat untersucht und der Mittelwert der HEV-Konzentrationen dargestellt (siehe auch Tab. 8). Von den HAdV, HNV, somatischen- und F+-Phagen wurde jeweils eine Konzentration pro Monat bestimmt.

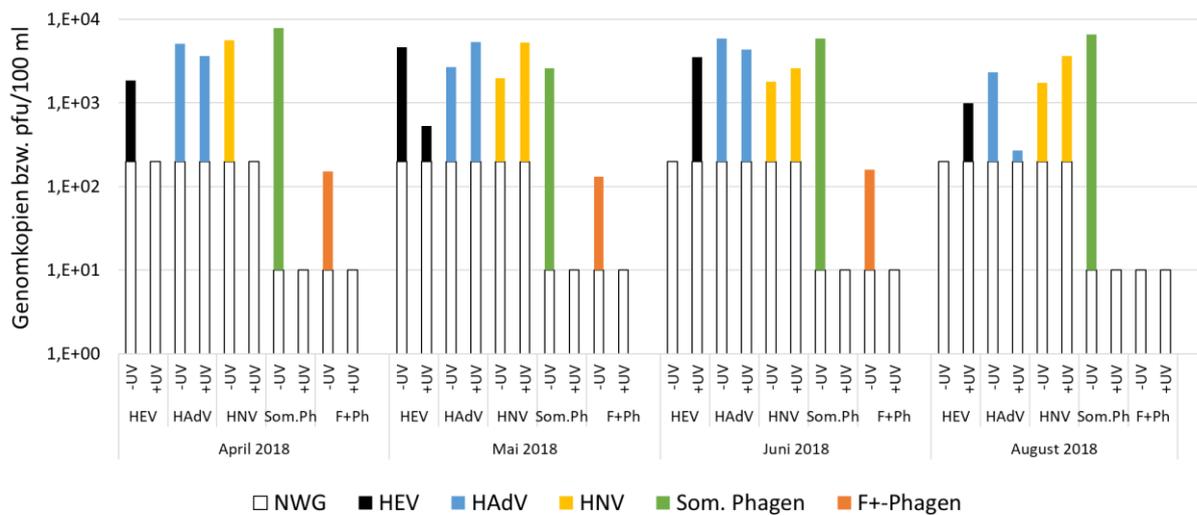


Abbildung 25: Konzentrationen an HEV, HAdV, HNV, somatischen Phagen und F+-Phagen in Direktproben von Kläranlagenabläufen vor (-) und nach (+) UV-Behandlung im April, Mai, Juni und August 2018.

Wie bei den HEV konnte auch bei HAdV und HNV beobachtet werden, dass es nach der UV-Behandlung teils zu deutlichen Reduktionen, aber auch zu leichten Erhöhungen der Konzentrationen im Vergleich zu den Ablaufproben ohne UV-Desinfektion kam (Abb. 25). Die geringfügigen Erhöhungen der HEV Konzentrationen nach UV-Behandlung im Juni und August 2018 könnten auch auf Schwankungen bei niedrigen Konzentrationen aufgrund des geringen Testvolumens der Direktproben beruhen. Bei den Untersuchungen der somatischen- und F+-Phagen, die in einem Lebendnachweis quantifiziert wurden, war jedoch deutlich zu erkennen, dass in Proben, die nach der UV-Anlage entnommen wurden, stets keine Phagen mehr nachweisbar waren. Das Lebendnachweisverfahren der Phagen reflektiert somit deutlich, dass die Nukleinsäuren während der UV-Desinfektion geschädigt wurden und die Organismen nicht mehr lebensfähig waren.

Ein weiterer Ansatz, um die Lebensfähigkeit der HEV abschätzen zu können, ist die PMA-qPCR (Abschnitt 3.3.3.). Mit diesem Verfahren kann prinzipiell zwischen defekten und intakten Viruskapsiden unterschieden werden.

3.3.3 Untersuchung von Abwasserproben mittels PMA-qPCR

Um einen Hinweis auf die Lebensfähigkeit der in den Umweltproben detektierten HEV zu bekommen, wurde das Verfahren der PMA-qPCR getestet (siehe Abschnitt 2.7). PMA dringt in beschädigte Viruskapside ein und verhindert die Amplifikation von Genomabschnitten durch Bindung an die Nukleinsäure. Intakte und somit potenziell infektiöse Kapside sind PMA-unempfindlich und die RNA bzw. DNA kann während der PCR vervielfältigt werden. In einem Spikeversuch mit HAdV-2 wurde die Methode der PMA-qPCR zunächst auf ihre Funktionalität überprüft. Jeder Versuchsansatz bestand aus mindestens vier Kombinationen. Die Proben wurden mit oder ohne Hitze behandelt, um die Viruskapside zu beschädigen und das Eindringen von PMA zu ermöglichen und es wurde jeweils eine Probe mit oder ohne PMA behandelt. In insgesamt sieben Vorversuchen wurden verschiedene Parameter variiert. Es wurden vier verschiedene Ausgangskonzentrationen an HAdV, zwei Temperaturen (60 °C und 80 °C) zur Inaktivierung der Kapside und drei Endkonzentrationen an PMA getestet. Die Abbildung 26 zeigt drei Experimente mit jeweils vier Ansätzen, bei denen zwei verschiedene Ausgangskonzentrationen an HAdV, zwei verschiedene Temperaturen sowie zwei PMA-Endkonzentrationen getestet wurden.

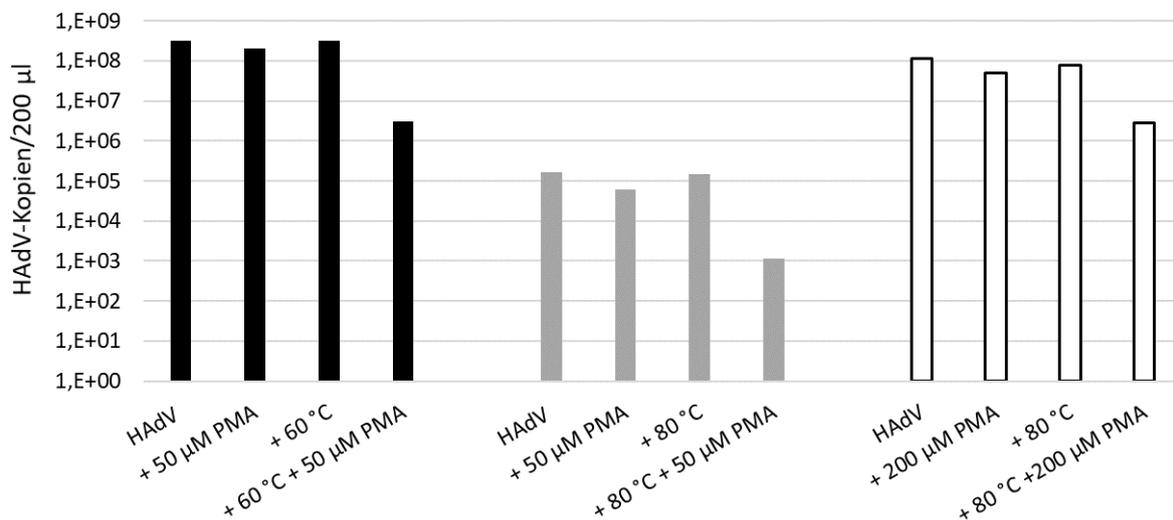


Abbildung 26: Spikeversuch mit HAdV, um die PMA-qPCR in einem Vorversuch zu testen. Dabei wurden die Parameter HAdV- und PMA-Konzentration sowie die Inaktivierungstemperatur variiert. Die Ergebnisse beziehen sich auf 200 µl Probenvolumen je Reaktionsansatz.

Die mittels qPCR detektierte Konzentration an HAdV reduzierte sich nach PMA-Behandlung lediglich um 0,1 Log₁₀-Stufen bis maximal 0,6 Log₁₀-Stufen im Vergleich zur gemessenen Konzentration ohne PMA-Behandlung (Abb. 26, die ersten beiden Balken je Experiment). Der Großteil aller aus der Zellkultur geernteten HAdV-Viruskapside schien demnach unbeschädigt zu sein. Wurden die Viren durch eine zehnmündige Hitzeinkubation inaktiviert, konnte anschließend die gleiche Konzentration an HAdV nachgewiesen werden wie ohne Inaktivierung (jeweils erster und dritter Balken). Dies ist damit zu begründen, dass die Viruskapside zwar denaturiert werden, die Nukleinsäure aber weiterhin vorhanden ist und nachgewiesen werden kann. Wurde nach der Wärmebehandlung jedoch zusätzlich PMA hinzugegeben, reduzierte sich die detektierbare HAdV-Konzentration stets um ca. 2 Log₁₀-Stufen (dritter und vierter Balken je Experiment). Bemerkenswert war dabei, dass keine stärkere Reduktion als eben diese 2 Log₁₀-Stufen erreicht werden konnte, auch wenn die PMA-Konzentration (50 µM oder

200 µM), die Ausgangskonzentration an HAdV (10^5 Kopien/200 µl oder 10^8 Kopien/200µl) oder die Temperatur der Hitzeinaktivierung (60 °C oder 80 °C) variiert wurde. Der Vorversuch bestätigte jedoch die Annahme, dass sich nach einer PMA-Behandlung die detektierbare Konzentration an HAdV reduzierte, wenn die Viruskapside beschädigt waren.

Im nächsten Versuch wurde die Konzentration an HAdV in Umweltproben vor und nach PMA-Inkubationen untersucht. Der Anteil an intakten HAdV konnte dadurch abgeschätzt werden. Es wurden neun verschiedene Kläranlagenzulaufproben vor der Nukleinsäureextraktion mit 50 µM PMA bzw. ohne PMA behandelt und danach mittels qPCR auf HAdV getestet. Nach PMA-Zugabe war die Konzentration an HAdV in den Kläranlagenzulaufproben durchweg geringer als ohne PMA-Behandlung. Im Durchschnitt konnte eine Reduktion von 0,2 Log₁₀-Stufen beobachtet werden. Die meisten der im Abwasser vorhandenen HAdV schienen somit intakte Viruskapside zu besitzen.

In einem weiteren Experiment wurden nun 13 verschiedene Kläranlagenzulaufproben mit und ohne PMA behandelt und mithilfe von RT-qPCRs auf HEV RNA getestet. In der Hälfte der mit PMA inkubierten Proben stieg die Konzentration an detektierbaren HEV und in der anderen Hälfte sank die Konzentration an HEV im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Dies entsprach nicht der Erwartung, dass die Viruskonzentrationen in allen mit PMA behandelten Proben tendenziell sinken sollte. Anschließend wurde deshalb untersucht, ob diese Ergebnisse durch Schwankungen der HEV-Konzentration durch die Detektionsmethode verursacht wurden. Dafür wurden zwei verschiedene Kläranlagenzulaufproben aus den Jahren 2018 und 2019 in einem Mehrfachansatz getestet. Beide Proben wurden in jeweils 6 parallelen Ansätzen mit und ohne PMA inkubiert und die Konzentration an HEV RNA wurde bestimmt. Die 6 unbehandelten Kläranlagenzulaufproben aus dem Jahr 2018 enthielten im Durchschnitt $2,3 \times 10^3$ HEV-Kopien/100 ml. Die mit PMA inkubierten Proben zeigten erstaunlicherweise einen höheren Mittelwert von $2,6 \times 10^3$ HEV-Kopien/100 ml und die Werte schwankten innerhalb des 6-fach Ansatzes. Die 6 unbehandelten Kläranlagenzulaufproben aus 2019 wiesen im Mittel eine HEV-Konzentration von $4,7 \times 10^3$ Kopien/100 ml auf. Die 6 mit PMA behandelten Proben hatten wie erwartet eine geringere Konzentration an HEV von $4,0 \times 10^3$ Kopien/100 ml. Die Werte innerhalb des 6-fach Ansatzes schwankten jedoch ebenfalls. Das Verfahren der PMA-RT-qPCR zur Unterscheidung von beschädigten und intakten HEV funktionierte somit unter Verwendung des durchgeführten Protokolls nicht wie geplant.

Über die Lebensfähigkeit der HEV in den Abwasserproben ließ sich somit keine eindeutige Aussage treffen. Die weiteren Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit beruhen deshalb auf dem molekularbiologischen Nachweis der genomischen RNA der Hepatitisviren.

Ob HEV überhaupt auf dem Wasserweg bis in die Oberflächengewässer gelangen, wo sie eine potenzielle Gefahr für die Bevölkerung darstellen könnten, wurde im nächsten Abschnitt 3.4 untersucht.

3.4 Nachweis von HEV in Oberflächengewässern

Um das Vorkommen von HEV in den Berliner Oberflächengewässern zu untersuchen, wurden verschiedene Stellen der Spree und Havel beprobt. Die genaue Lage der in Abbildung 21 bereits im Überblick dargestellten Probenahmestellen an den Flüssen Havel und Spree ist in der Darstellung des Berliner Gewässernetzes genauer gekennzeichnet (Abb. 27).

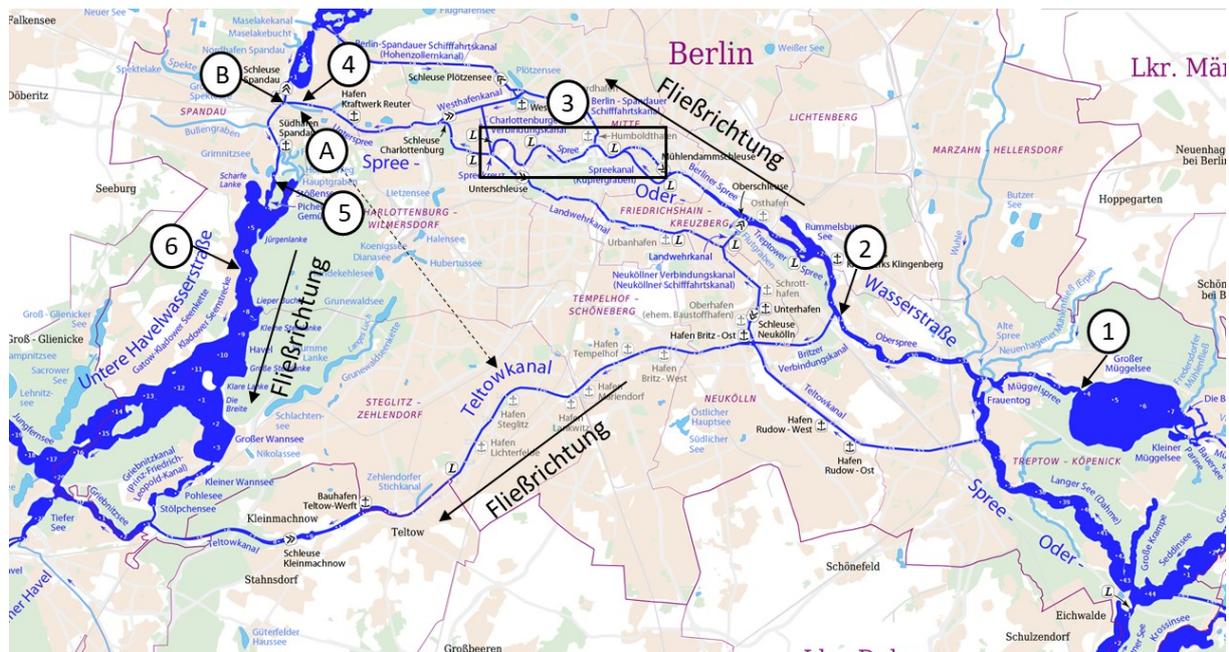


Abbildung 27: Oberflächengewässer in Berlin mit Fließrichtungen sowie der Probenahmestellen 1 bis 6. 1: Spreetunnel, 2: Spree am Baumschulenweg, 3: Mischwasserüberläufe in der Spree, 4: Spree vor Einleitung des Abflusses der KA RL, 5: Havel Heerstraße, 6: Badestelle Kleine Badewiese; A: Einleitung des Abflusses der KA RL in den Ruhlebener Altarm der Spree (Oktober bis März), B: Zusammenfließen der Flüsse Spree und Havel.

Die Spree wurde beprobt, bevor sie in die Stadt Berlin hineinfließt. Dafür wurden 10 Proben vom Spreetunnel nahe dem Müggelsee (Probenahmestelle 1) und 9 Proben vom Baumschulenweg (Probenahmestelle 2) genommen (Abb. 27). Ebenfalls wurden 16 Mischwasserüberlaufproben (Probenahmestelle 3) und 2 Proben der Spree analysiert, nachdem der Fluss die Berliner Innenstadt passierte (Probenahmestelle 4). In den Wintermonaten Oktober bis März fließt das gereinigte Abwasser der Kläranlage in den Ruhlebener Altarm der Spree (Punkt A, durchgängiger Pfeil). In den Sommermonaten April bis September wird das mit UV-Licht behandelte Abwasser teilweise unterirdisch in den Teltowkanal geleitet (Punkt A, gestrichelter Pfeil), um die fäkale Belastung der Havel und der darin gelegenen Badestelle „Kleine Badewiese (KBW) zu minimieren. Nachdem die Flüsse Spree und Havel zusammenfließen (Punkt B), wurde die Havel nahe der Heerstraße (Probenahmestelle 5) und an der Badestelle KBW (Probenahmestelle 6) beprobt.

3.4.1 Virusuntersuchungen im Fluss Spree

Die in der Spree (Spreetunnel (ST)- Stelle 1, Baumschulenweg (BSW)- Stelle 2, vor Einleitung der KA RL- Stelle 4, Abb. 27) ermittelten HEV-Konzentrationen unter normalen Wetterbedingungen sind in Tabelle 9 gezeigt und wurden mit dem Vorkommen von HAdV, HNV und somatischen Phagen verglichen.

Tabelle 9: Direktproben der Spree unter normalen Wetterbedingungen von 2016 bevor (ST und BSW) und nachdem (vor KA RL) der Fluss die Berliner Innenstadt passierte. Die Werte für humane Viren sind in Genomkopien/100 ml, die der Bakteriophagen in pfu/100 ml Probe angegeben.

Probenahme:		HEV	HAdV	HNV	Som. Phagen
Monat/Jahr, Stelle					
04/2016	ST	< 200	< 200	< 200	<10
04/2016	ST	< 200	< 200	< 200	<10
05/2016	ST	< 200	< 200	< 200	<10
05/2016	ST	< 200	< 200	< 200	20
06/2016	ST	< 200	< 200	< 200	<10
06/2016	ST	< 200	< 200	< 200	30
09/2016	ST	5x10 ²	< 200	< 200	<10
10/2016	ST	6x10 ²	8x10 ³	< 200	20
11/2016	ST	< 200	1x10 ³	< 200	<10
12/2016	ST	2x10 ³	3x10 ³	< 200	40
04/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	42
05/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	10
05/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	1x10 ²
06/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	20
07/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	1x10 ²
08/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	2x10 ²
09/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	10
10/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	1x10 ²
11/2016	BSW	< 200	< 200	< 200	<10
04/2016	vor KA RL	6x10 ²	< 200	3x10 ²	1x10 ²
05/2016	vor KA RL	< 200	< 200	< 200	2x10 ²

ST: Spreetunnel, BSW Baumschulenweg

Proben, die nahe des Spreetunnels genommen wurden, zeigten in den Monaten September, Oktober und Dezember 2016 HEV-Konzentrationen zwischen 5x10² Kopien/100 ml bis 2x10³ Kopien/100 ml. Im Oktober und Dezember konnten außerdem HAdV (8x10³ Kopien/100 ml und 3x10³ Kopien/100 ml) und somatische Phagen mit Konzentrationen von 20 pfu/100 ml und 40 pfu/100 ml nachgewiesen werden. Im September hingegen wurde eine geringe Konzentration an HEV, aber keine anderen Indikatorviren detektiert. An der Probenahmestelle Baumschulenweg waren alle Proben HEV RNA negativ. In einer Probe der Spree (April 2016), bevor der KA-Ablauf in den Ruhlebener Altarm eingeleitet wird, konnte eine HEV-Konzentration von 6x10² Kopien/100 ml detektiert werden. In dieser Probe wurden ähnliche Konzentrationen an HNV (3x10² Kopien/100 ml) und somatischen Phagen (1x10² pfu/100 ml) nachgewiesen. Insgesamt war die Spree zur Zeit der Probenahme unter normalen Wetterbedingungen

nicht stark mit Viren belastet. Da bekannt ist, dass sich im Innenstadtbereich der Spree Mischwasserüberlaufkanäle befinden, wurde das Vorkommen von HEV in der Spree auch nach Starkregenereignissen untersucht (Abschnitt 3.4.2).

3.4.2 Nachweise von Viren nach Mischwasserüberläufen in die Spree

In Berlin gibt es mehr als 180 Einleitungsstellen von Mischwasserüberläufen (MWÜ) in die Spree. Bei starken Regenfällen gelangt ungeklärtes Abwasser zusammen mit Regenwasser durch Mischwasserkanäle in die Spree. Während drei Starkregenereignissen im Jahr 2016 wurden mehrere Spreeproben genommen und Direktproben auf HEV RNA untersucht (Tab. 10). Zum Vergleich wurden ebenfalls die Konzentrationen an HAdV, HNV und somatischen Phagen bestimmt.

Tabelle 10: Die Virusbelastung nach MWÜ in die Spree wurde bei drei Starkregenereignissen untersucht. Die Konzentration an HEV, HAdV, HNV (in Genomkopien/100 ml) und somatischen Phagen (in pfu/100 ml) wurde in mehreren Direktproben je Regenereignis bestimmt.

MWÜ-Ereignis	HEV	HAdV	HNV	Som. Phagen
Starkregenereignis Juni 2016	< 200	1×10^3	7×10^3	4×10^3
	5×10^3	6×10^3	< 200	5×10^3
	5×10^2	2×10^3	2×10^4	2×10^3
	3×10^4	2×10^5	9×10^3	4×10^3
1. Starkregenereignis Juli 2016	1×10^3	9×10^4	6×10^4	6×10^4
	9×10^2	7×10^4	2×10^4	4×10^4
	< 200	3×10^4	1×10^4	2×10^4
	2×10^3	4×10^4	6×10^3	1×10^4
	2×10^3	9×10^4	4×10^3	3×10^4
	2×10^3	1×10^5	< 200	1×10^4
2. Starkregenereignis Juli 2016	< 200	4×10^4	< 200	6×10^3
	3×10^2	3×10^4	2×10^4	1×10^4
	< 200	3×10^4	< 200	2×10^4
	5×10^3	1×10^4	2×10^4	3×10^4
	6×10^3	4×10^4	6×10^3	2×10^4
	6×10^2	1×10^4	6×10^3	6×10^3
Mittelwert	3×10^3	5×10^4	1×10^4	2×10^4

Je Starkregenereignis wurden mehrere Proben von verschiedenen Stellen der Spree beprobt und auf HEV und drei andere Indikatorviren getestet (Tab. 10). Von 16 MWÜ-Proben wurden 12 Proben positiv auf HEV RNA getestet, was einer Detektionsrate von 75 % entspricht. Der Mittelwert der HEV-Konzentrationen aller 16 MWÜ-Proben betrug 3×10^3 Kopien/100 ml. In 75 % der MWÜ-Proben konnten ebenfalls HNV mit einer durchschnittlichen Konzentration von 1×10^4 Kopien/100 ml nachgewiesen werden. In allen getesteten Proben konnten HAdV und somatische Phagen detektiert werden mit Mittelwerten von 5×10^4 Kopien/100 ml bzw. 2×10^4 pfu/100 ml. Die Mittelwerte der Konzentrationen an HAdV, HNV und somatischen Phagen waren somit ca. 1 Log₁₀-Stufe höher als die durchschnittliche Konzentration an HEV. Nach Starkregenereignissen waren die Detektionsrate und die HEV-Konzentrationen im Vergleich zu den Spreeproben unter normalen Wetterbedingungen

(Tab. 9) deutlich erhöht. Auch die anderen Indikatorviren wurden häufiger und in höheren Konzentrationen als unter normalen Wetterbedingungen detektiert.

In Berlin wurde neben der Spree noch ein zweiter Fluss, die Havel, unter normalen Wetterbedingungen beprobt (Abschnitt 3.4.3)

3.4.3 Virusuntersuchungen im Fluss Havel

Nachdem das Wasser der Havel, der Spree und die Abläufe der Kläranlage Ruhleben unter normalen Wetterbedingungen zusammenflossen sind, wurde die Havel 4 km stromabwärts vom Punkt B beprobt (Stelle 5, Abb. 27). Die HEV-Konzentrationen in den Direktproben der Havel sind in Abbildung 28 gezeigt. In den Monaten von April 2018 bis Februar 2019 wurde die Konzentration an HEV mit den Konzentrationen an HAdV und somatischen Phagen verglichen. Aus derselben Havelprobe wurde jeden Monat ein Wert für HEV sowie die anderen Indikatorviren ermittelt.

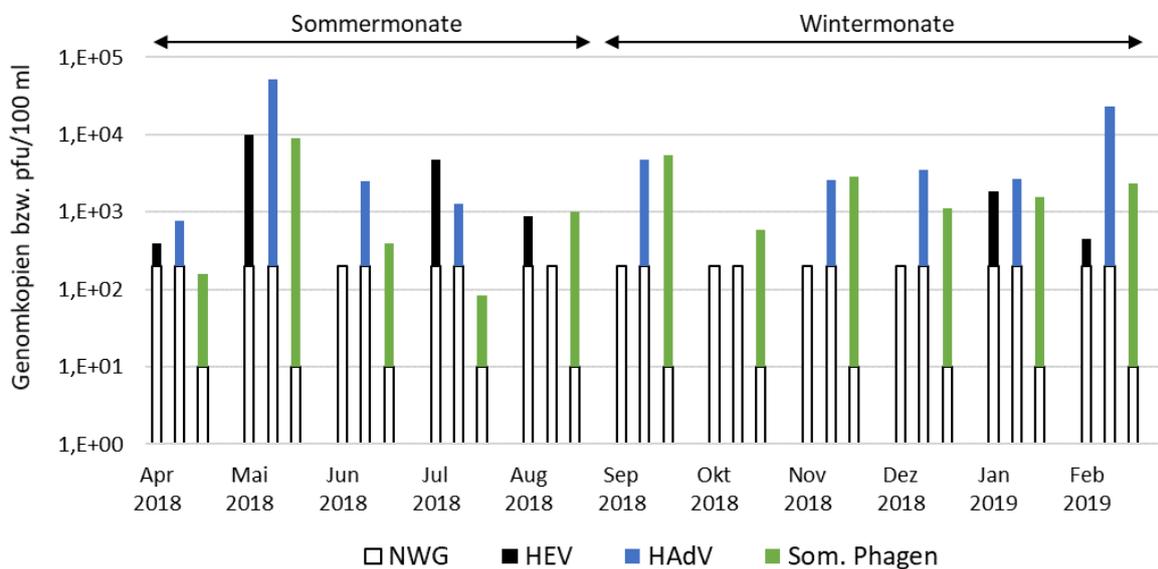


Abbildung 28: Direktproben der Havel an der Heerstraße von 2018/2019 wurden auf HEV, HAdV und somatische Phagen getestet. Die Ergebnisse beziehen sich auf Genomkopien/100 ml bzw. pfu/100 ml.

In den Sommermonaten von April 2018 bis August 2018 waren 4 von 5 Havel-Proben HEV RNA positiv im Bereich von 4×10^2 Kopien/100 ml bis 1×10^4 Kopien/100 ml (Abb. 28). In 2 von 6 monatlichen Proben, die im Winter genommen wurden, konnten HEV-Konzentrationen von 5×10^2 Kopien/100 ml und 2×10^3 Kopien/100 ml detektiert werden. Die insgesamt 6 HEV RNA positiven Proben der Havel besitzen einen Mittelwert von 3×10^3 Kopien/100 ml. Fünfmal korrelierte das HEV-Vorkommen mit dem Vorhandensein an HAdV, die durchschnittlich in Konzentrationen von 9×10^3 Kopien/100 ml vorkamen. In allen 11 untersuchten monatlichen Proben waren somatische Phagen mit einem Mittelwert von 2×10^3 pfu/100 ml quantifizierbar. Insgesamt wurden in der Havel in den 5 Sommermonaten keine niedrigeren Viruskonzentrationen als in den 6 Winterproben detektiert.

3.4.4 Virusuntersuchungen von Gewässerproben einer Badestelle an der Havel

Die Havel fließt von der Probenahmestelle an der Heerstraße durch die Untere Havelwasserstraße weiter Richtung Potsdam. An dieser Wasserstraße befindet sich die Badestelle „Kleine Badewiese“ (Probenahmestelle 6, Abb. 27), die an drei Stellen beprobt und auf HEV und andere Indikatorviren getestet wurde (Tab. 11). Aus jeder monatlichen Probe wurde jeweils ein Wert für HEV aus einer Direktprobe und aus einer mittels UZ oder PEG-Fällung aufkonzentrierten Probe ermittelt. Die Direktproben wurden ebenfalls auf HAdV, HNV, somatische- und F+-Phagen getestet. Die Ergebnisse sind in Genomkopien/100 ml bzw. pfu/100 ml angegeben.

Tabelle 11: Quantifizierung von HEV und andere Indikatorviren in Wasserproben der Badestelle „Kleine Badewiese“ (2018/2019) in Direktproben und mit UZ- oder PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben.

Monat/ Jahr/ Stelle	HEV			HAdV	HNV	Som. Phagen	F+- Phagen
	Direkt	UZ	PEG	Direktproben			
08/18/1	5x10 ²	< 6	n. a.	< 200	< 200	<10	<10
08/18/2	< 200	< 6	n. a.	< 200	< 200	<10	<10
08/18/3	< 200	2x10 ²	n. a.	< 200	< 200	10	<10
09/18/1	< 200	< 6	n. a.	< 200	< 200	10	<10
09/18/2	< 200	< 6	n. a.	< 200	< 200	<10	<10
09/18/3	< 200	< 6	n. a.	< 200	< 200	<10	<10
10/18/3	< 200	< 6	< 4	< 200	< 200	1x10 ²	<10
11/18/3	< 200	< 6	< 4	< 200	< 200	7x10 ²	10
12/18/1	< 200	< 6	< 4	1x10 ³	< 200	2x10 ³	20
01/19/1	< 200	8	37	6x10 ³	< 200	1x10 ³	20
02/19/1	2x10 ³	16	< 4	1x10 ³	7x10 ²	2x10 ³	40

In den Sommermonaten August und Anfang September 2018 wurden jeweils 3 Direktproben und 3 UZ-Proben der KBW auf HEV RNA getestet (Tab. 11). Die Viren konnten in einer Direktprobe und einer UZ-Probe im Monat August nachgewiesen werden. Die HEV-Konzentration lag jeweils knapp über der NWG. Die Indikatorviren HAdV, HNV, somatische und F+-Phagen konnten in diesem Monat nicht detektiert werden. Von Oktober 2018 bis Februar 2019 wurde jeweils eine Direktprobe, UZ-Probe und PEG-Probe auf HEV RNA untersucht. Im Januar wurde in beiden aufkonzentrierten Proben HEV RNA knapp über der NWG detektiert. Die höchste an der KBW gemessene HEV-Konzentration lag bei 2x10³ Kopien/100 ml im Wintermonat Februar. Das HEV-Vorkommen wurde durch die UZ-Probe vom Februar bestätigt. In diesem Monat wurden auch einmalig HNV nachgewiesen und die höchsten Konzentrationen an somatischen- und F+-Phagen gemessen.

Insgesamt ist auffällig, dass in den Sommermonaten keine HAdV, HNV, somatischen- und F+-Phagen nachgewiesen wurden. In den Wintermonaten hingegen wurden diese Indikatorviren in Proben der KBW häufiger detektiert. Vor allem in den Monaten von Dezember 2018 bis Februar 2019 wurden erhöhte Konzentrationen an HAdV und somatischen Phagen gemessen.

3.4.5 Virusuntersuchungen von Sedimentproben der Badestelle

Von der Badestelle Kleine Badewiese wurden neben den Wasserproben (Abschnitt 3.4.4) zusätzlich Sedimentproben auf HEV RNA untersucht. Vor der eigentlichen Beprobung wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Virenelution aus Sedimentproben zu testen (Elution siehe Abschnitt 2.4). Dafür wurden murine Noroviren 1 (MNV-1) in Dreifachansätzen zu Sedimentproben der KBW zugegeben (gespikt) und deren Wiederfindung bestimmt. Die Ergebnisse der Spikeversuche mit drei unterschiedlichen MNV-1-Konzentrationen sind in Abbildung 29 dargestellt.

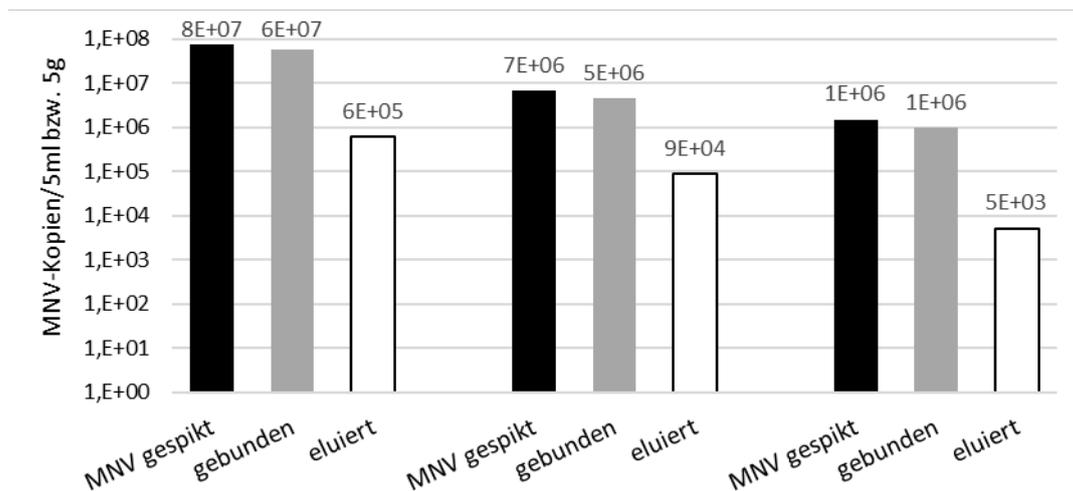


Abbildung 29: Spikeversuch mit MNV, um die Virenelution aus Sedimentproben auszutesten. Gezeigt ist jeweils die gespikte Konzentration in MNV-Kopien/5 ml (schwarz), die an das Sediment gebundenen Viren in MNV-Kopien/5 g (grau) und die wieder eluierten MNV in Kopien/5 g (weiß).

Die jeweils gespikte Konzentration an MNV wurde via RT-qPCR ermittelt (schwarze Balken, Abb. 29). Zu den Sedimenten der KBW wurden in drei parallelen Ansätzen MNV gespikt und über Nacht inkubiert. Die danach noch im Überstand befindlichen Viren, die nicht an Sediment gebunden hatten, wurden quantifiziert. Dadurch konnte wiederum die theoretische Konzentration an MNV, die an das Sediment gebunden hatten, bestimmen werden (graue Balken). Die MNV wurden anschließend vom Sediment eluiert, ähnlich wie bei der PEG-Fällung aufkonzentriert und deren Konzentration gemessen (weiße Balken). Die Konzentration an gebundenen und wieder eluierten MNV ist jeweils ein Mittelwert aus den im Dreifachansatz bestimmten Konzentrationen. Die höchste gespikte MNV-Konzentration war 8×10^7 Kopien/5 ml, wovon 6×10^5 MNV (eluiert aus 5 g Sediment) wiedergefunden werden konnten, dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 1,1 %. Ähnliche Raten werden auch bei den beiden anderen Spikekonzentrationen erzielt. Als 7×10^6 MNV/5 ml gespikt wurden, lag die Wiederfindung bei 1,9 %. Bei der gespikten Konzentration von 1×10^6 MNV/5 ml fanden sich 5×10^3 MNV nach der Elution wieder, was einer Wiederfindungsrate von 0,6 % gleichkommt. Diese Wiederfindungsraten sind nicht untypisch für Umweltproben, da auch stets PCR-Inhibitoren enthalten sind. Die Wiederfindung ist ebenfalls abhängig von der vorhandenen Viruskonzentration, den Eigenschaften und dem Adsorptionsverhalten der Viren. Die niedrigen Wiederfindungsraten können nicht damit begründet werden, dass die MNV nicht an das Sediment gebunden haben, da sie sich dann im Überstand befunden hätten und dort detektiert worden wären (siehe oben Berechnung der gebundenen MNV, grauen Balken). Nach dem Vorversuch wurden die natürlich gebundenen Viren aus Sedimentproben der KBW eluiert und auf HEV RNA getestet. Abhängig von den jeweiligen Strukturen und Oberflächeneigenschaften der Viren können diese unterschiedlich gut an Partikel adsorbieren,

akkumulieren und eluiert werden und die Dauer der Lebensfähigkeit in der Umwelt variiert. Fünf von 17 getesteten Sedimentproben aus den Monaten September und Oktober 2018 waren HEV RNA positiv mit einem Median von 7×10^2 HEV-Kopien/5 g Sediment.

3.4.6 Übersicht der HEV Nachweise in Oberflächengewässern

Eine Zusammenstellung des HEV-Vorkommens in den untersuchten Berliner Oberflächengewässerproben ist in Tabelle 12 dargestellt. Beprobt wurden zwei Berliner Flüsse, Mischwasserüberläufe und eine Badestelle. Sedimentproben der Badestelle sind ebenfalls mit in die Übersicht aufgenommen. Die Tabelle stellt dar, wie viele Proben jeweils getestet wurden und wie viele und in welchem prozentualen Anteil davon HEV RNA positiv waren. Der Median der HEV positiven Proben der jeweiligen Probenahmestelle wurde ebenfalls berechnet.

Tabelle 12: Übersicht des HEV-Vorkommens in den untersuchten Oberflächengewässerproben aus Berlin. Die Viren wurden mittels RT-qPCR detektiert.

	Oberflächengewässerproben		
	Insgesamt getestet [n]	HEV RNA positiv [n (%)]	Median positive Proben [Kopien/100 ml]
Spree	21	4 (19 %)	6×10^2
Spree/MWÜ	16	12 (75%)	2×10^3
Havel	70	21 (30 %)	9×10^2
Havel/KBW	55	8 (15 %)	3×10^2
Sediment KBW	17	5 (29 %)	7×10^2

MWÜ: Mischwasserüberläufe; KBW: Kleine Badewiese

Es wurden mehr Wasserproben der Havel und der KBW untersucht, als in Abb. 28 und Tabelle 11 gezeigt sind, da die Viren in diesen Proben ebenso mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentriert und auf HEV RNA getestet wurden. Von einem Probenahmetag wurden außerdem teilweise mehrere Proben genommen und untersucht. Von 91 getesteten Proben der beiden Flüsse Spree und Havel unter normalen Wetterbedingungen waren 19 % bzw. 30 % HEV RNA positiv mit Median-Konzentrationen von 6×10^2 Kopien/100 ml bzw. 9×10^2 Kopien/100 ml (Tab. 12). Nach Starkregenereignissen, bei denen ungeklärtes Abwasser durch MWÜ in die Spree gelangt, stieg die HEV-Detektionsrate der Spreeproben auf 75 % mit einem Median von 2×10^3 Kopien/100 ml. An der Badestelle KBW, die stromabwärts von der Probenahmestelle der Havel liegt, waren 8 von 55 getesteten Proben HEV RNA positiv (15 %) mit einem Median von 3×10^2 Kopien/100 ml und somit knapp über der NWG. Es wurden ebenfalls Sedimentproben von der Badestelle entnommen, wovon 29 % positiv auf HEV RNA mit einem Median von 7×10^2 Kopien/100 ml getestet wurden.

3.5 Genotypisierung der in Abwasserproben nachgewiesenen HEV

Um die in Umweltproben nachgewiesenen HEV genauer zu charakterisieren, wurden die Genotypen der Viren identifiziert. Dafür wurde die RNA der Viren zunächst mittels *nested*-RT-PCR vervielfältigt, auf ein Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt und anschließend sequenziert (siehe Abschnitt 2.8 und 2.9). Zu Beginn wurde ein geeignetes *nested*-PCR-Primersystem gesucht. Hierfür wurden zwei verschiedene *nested*-PCR-Primersysteme, etabliert von Smith *et al.* (2013) und Johne *et al.* (2010), auf ihre Funktionalität getestet. Als HEV-Positivkontrolle (+) diente RNA vom HEV-Isolat 47832c, das von Johne *et al.* (2014) publiziert und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde. Wasser wurde als Negativkontrolle (-) verwendet. Die RT-PCR (äußere Primeramplifikation) und *nested*-PCR (innere Primeramplifikation) wurden mit beiden Primersystemen durchgeführt, die PCR-Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem Detektionsgerät sichtbar gemacht (Abb. 30).

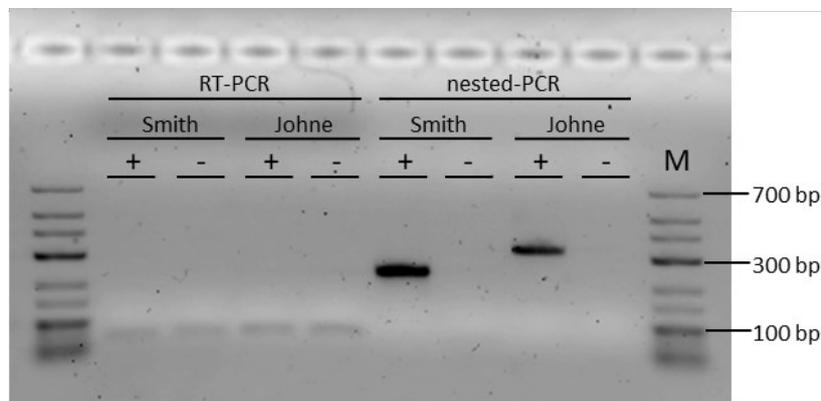


Abbildung 30: Vergleich der beiden *nested*-PCR-Primersysteme von Smith *et al.* (2013) und Johne *et al.* (2010). Getestet wurden jeweils eine HEV-Positivkontrolle (+) und eine Negativkontrolle (-).

Die PCR-Produkte der RT-PCRs waren auf dem Agarosegel nicht erkennbar (Abb. 30). Nach der *nested*-PCR können die amplifizierten Fragmente jedoch als Banden im Gel nachgewiesen werden. Die RNA der HEV-Positivkontrolle konnte demnach mit beiden Primersystemen amplifiziert werden. Mit den Smith-Primern wurden in der *nested*-PCR 242 bp lange Amplifikate erzeugt. Bei der PCR mit Primern von Johne resultierten HEV-Fragmente einer Größe von 332 bp. In den Negativkontrollen wurden keine Amplifikate erzeugt.

Nach diesem Versuch wurde die Amplifikation von HEV RNA aus Umweltproben mit beiden Sets an Primern getestet. In *nested*-PCRs wurden mehrere Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben vom März 2018 mit Smith- (A) und Johne-Primern (B) auf HEV untersucht. Es wurden je 6 Direktproben vom Zulauf und 7 Direktproben vom Ablauf sowie jeweils eine mit UZ und eine mit PEG-Fällung aufkonzentrierte Probe getestet (Abb. 31).

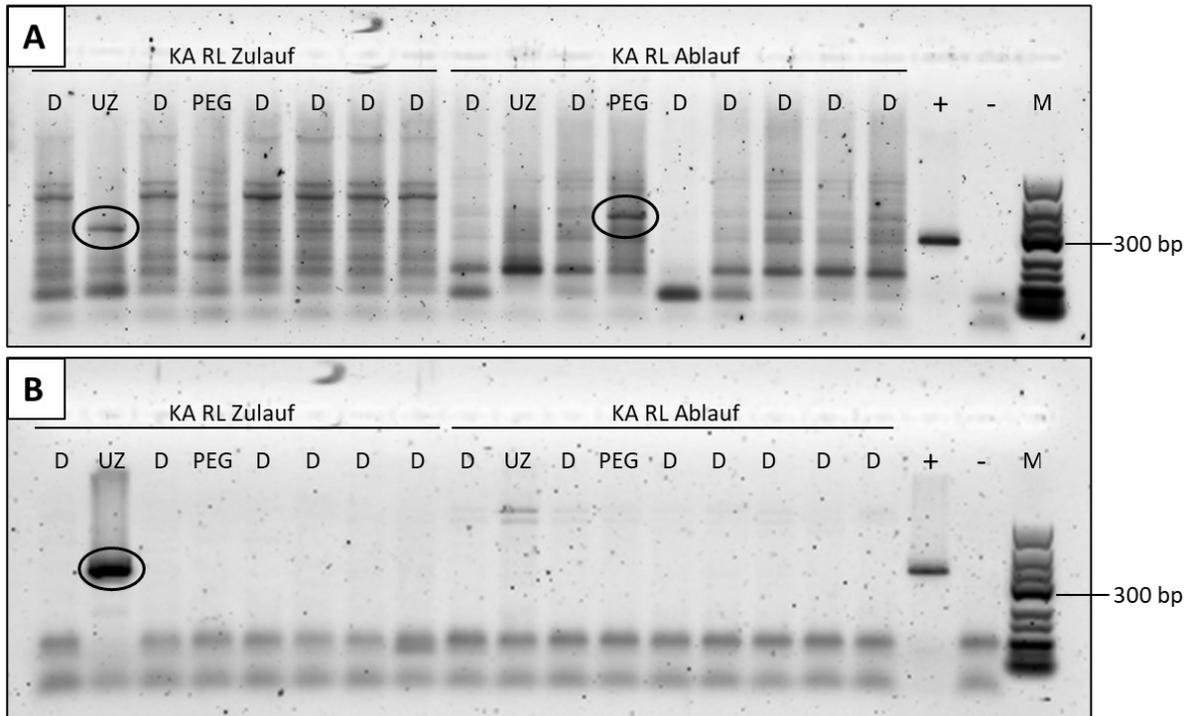


Abbildung 31: Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben (März 2018) wurden auf HEV RNA mittels *nested*-RT-PCRs mit den Primern von Smith *et al.* (A) und Johne *et al.* (B) getestet. Mehrere Direktproben sowie mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentrierte Proben desselben Probenahmetags wurden untersucht.

Dieselben Nukleinsäureeluate der Abwasserproben wurden parallel mit beiden Primersystemen getestet und die Amplifikate auf zwei Agarosegele aufgetragen (Abb. 31). Die Primer von Smith schienen unspezifisch zu binden, da auf dem Agarosegel viele unterschiedlich große PCR-Fragmente erkennbar waren (Abb. 31 A). Die beiden schwarz umkreisten Banden aus der UZ-Zulaufprobe und der PEG-Ablaufprobe wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt. In beiden Proben konnte keine auswertbare HEV-Sequenz ermittelt werden. Die *nested*-PCR-Primer von Johne hingegen haben spezifisch gebunden (Abb. 31 B). Die mit UZ aufkonzentrierte Zulaufprobe wies eine 332 bp große, eindeutige Bande auf. Dieses PCR-Produkt wurde ausgeschnitten und die Sequenz konnte einem HEV-Subgenotyp zugeordnet werden (benannt als 03/2018 UZ_1 in Abb. 33 und 34). Obwohl in der UZ-Zulaufprobe HEV nachgewiesen werden konnten, waren in den Direktproben und der PEG-Zulaufprobe keine HEV-Fragmente erkennbar. In den Ablaufproben waren ebenfalls keine HEV-Amplifikate sichtbar (Abb. 31 B). In diesem Experiment war die via UZ aufkonzentrierte Zulaufprobe somit geeignet, um HEV RNA mittels *nested*-RT-PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden aufgrund dieser Ergebnisse (Abb. 31) nur noch die von Johne *et al.* (2010) publizierten *nested*-PCR-Primer verwendet. Die extrahierte Nukleinsäure von weiteren Zu- und Ablaufproben, Havelproben und Gewässerproben der Badestelle KBW wurde so auf HEV RNA getestet. In der Abbildung 32 sind exemplarisch fünf Agarosegele mit neun 332 bp großen Banden gezeigt, welche in *nested*-PCRs mit Johne-Primern amplifiziert, ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend sequenziert wurden.

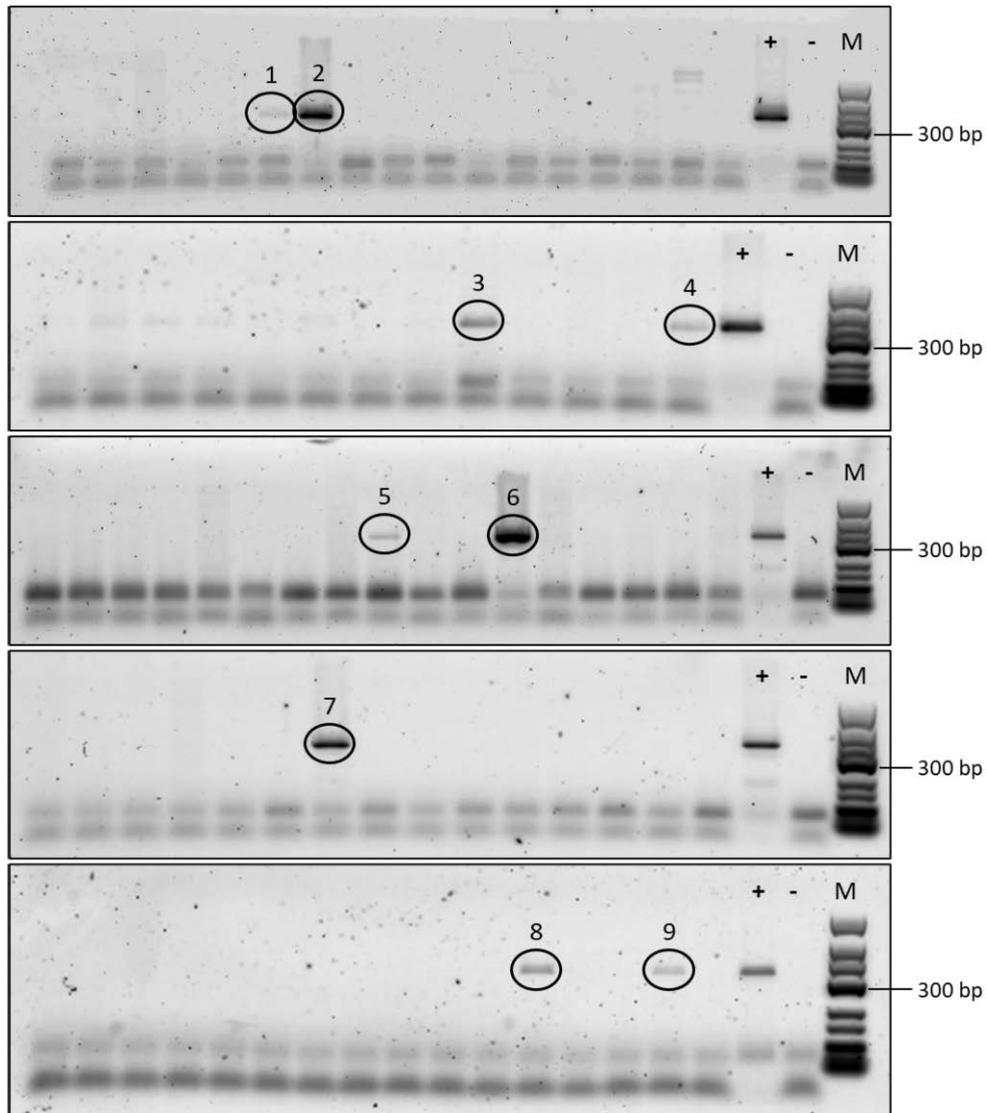
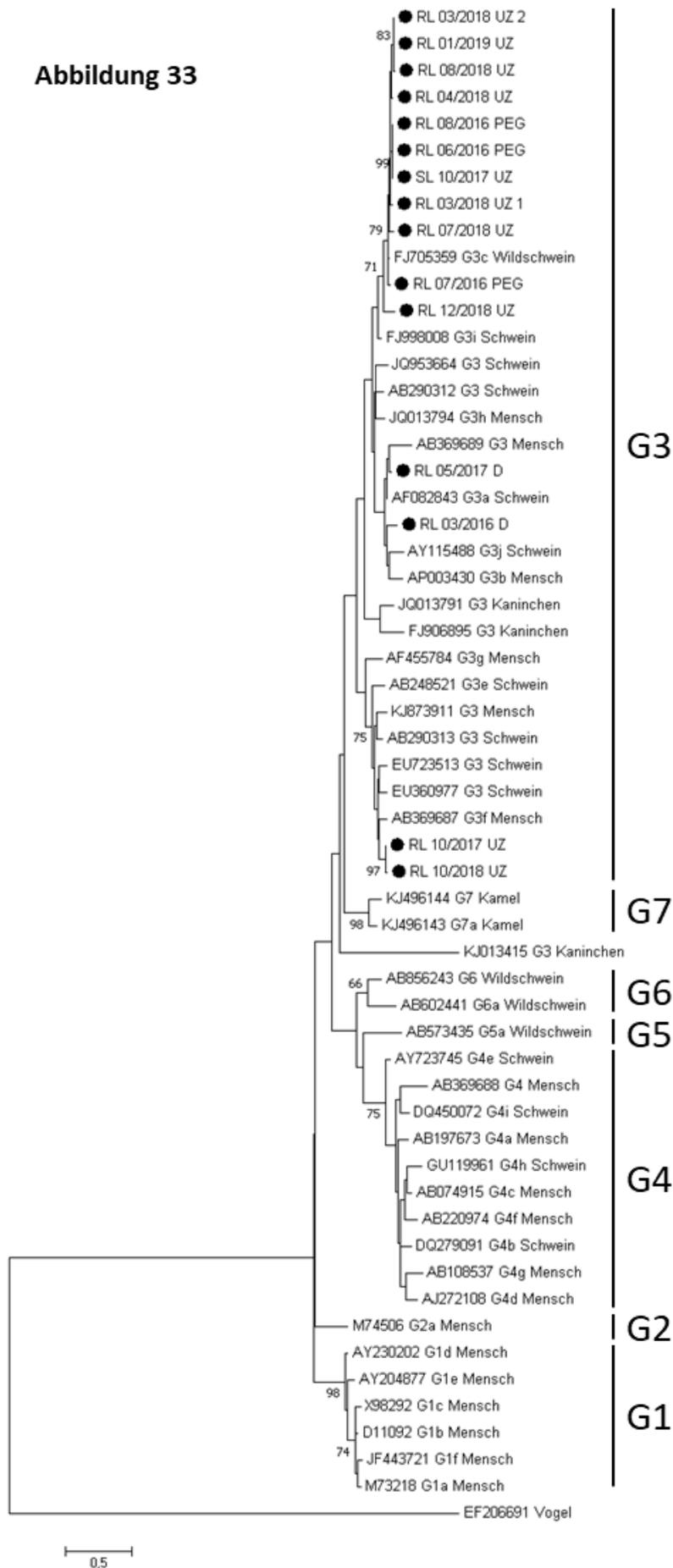


Abbildung 32: Fünf Agarosegele mit neun markierten Banden, die 332 bp große HEV-Amplifikate sichtbar machen. Diese PCR-Produkte wurden in *nested*-PCRs mit den Primern von Johne *et al.* (2010) erzeugt. Alle HEV-Fragmente wurden aus Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben amplifiziert, mit Ausnahme einer Probe aus dem Klärwerk Schönerlinde vom Oktober 2017. Markierungen der Proben mit Monat und Jahr der Probenahme sowie der Aufkonzentrierungsmethode: 1: 07/2016 PEG, 2: 08/2016 PEG, 3: 10/2017 UZ Schönerlinde, 4: 06/2016 PEG, 5: 03/2018 UZ_2, 6: 10/2017 UZ Ruhleben, 7: 07/2018 UZ, 8: 10/2018 UZ, 9: 01/2019 UZ.

Insgesamt wurden 173 Zulaufproben von Kläranlagen getestet, davon zeigten 15 Proben (entspricht 9 %) spezifische 332 bp große Banden mit HEV-Sequenzen, die ausgewertet werden konnten. In der Abbildung 32 sind exemplarisch fünf Agarosegele mit 9 der 15 auswertbaren PCR-Produkte dargestellt. Die Amplifikate resultierten in unterschiedlich intensiven Banden, was jedoch keinen Einfluss auf die Auswertbarkeit der Sequenzen hatte. Es wurden außerdem 94 Ablaufproben von Kläranlagen, 48 Havelproben und 9 Proben der KBW getestet. In keiner dieser Proben konnte HEV RNA amplifiziert werden, die sich in sichtbaren Gelbanden zeigte (Daten nicht dargestellt). Um die in Berlin zirkulierenden HEV-Stämme genauer zu charakterisieren, wurden die 15 erhaltenen Sequenzen aus den Zulaufproben der Kläranlagen Ruhleben (RL) und Schönerlinde (SL) mit 41 HEV-Referenzsequenzen verglichen, die von Smith *et al.* (2016) empfohlen wurden (Abb. 33).

Abbildung 33



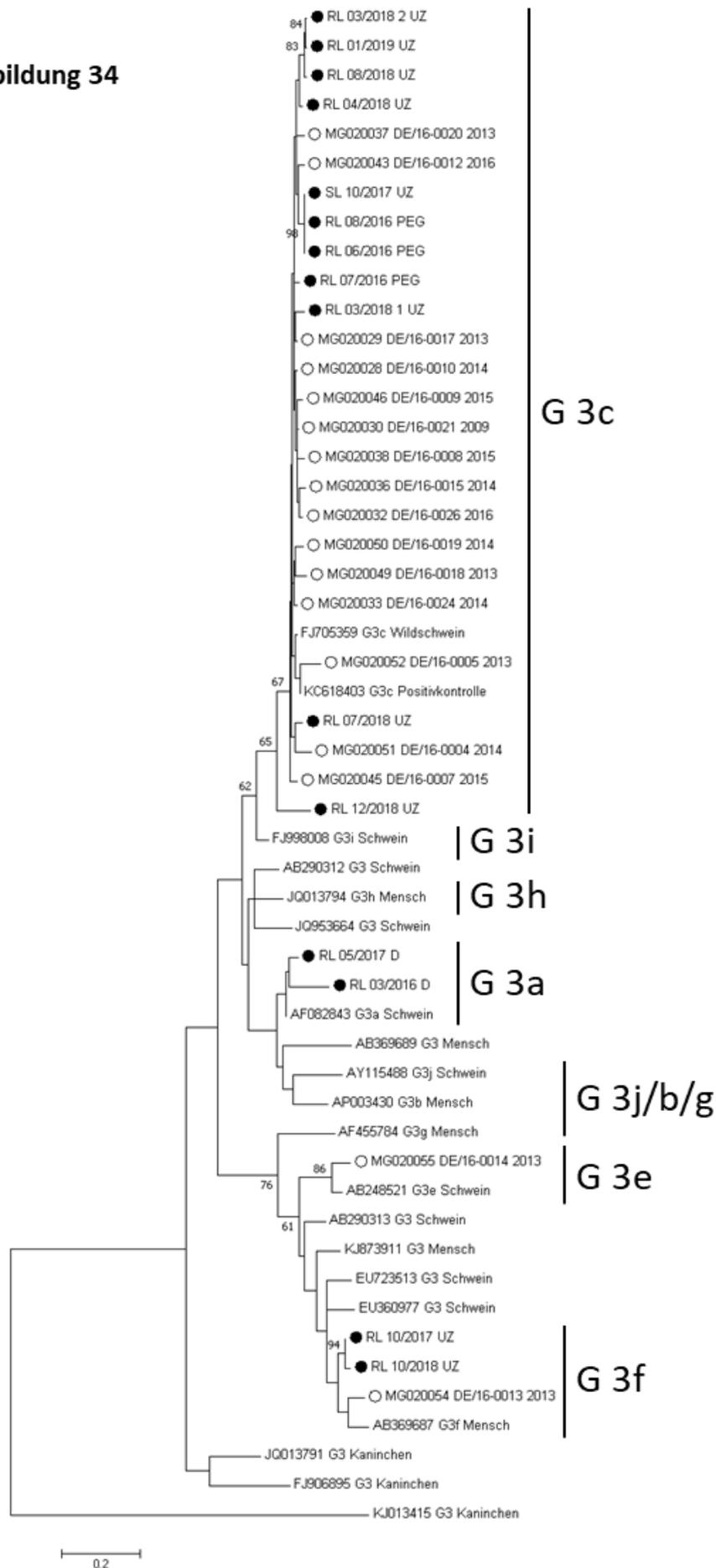
◀ **Abbildung 33** (vorherige Seite): Phylogenetischer Stammbaum zur Genotypisierung der 15 HEV-Sequenzen, die in Berliner Kläranlagenzulaufproben identifiziert wurden (schwarze Punkte). Die Sequenzen, benannt mit Ort, Monat/Jahr der Probenahme und Aufkonzentrierungsmethode, wurden mit 41 HEV-Referenzsequenzen der Genotypen 1 bis 7 (bezeichnet mit Zugangsnummer, Subgenotyp und Wirt der ersten Detektion) verglichen. Die Zahlen an den Knotenpunkten repräsentieren Bootstrapwerte >60. Der Maßstabsbalken gibt die genetische Distanz (Nukleotidaustausch pro Stelle) an. Als Outgroup wurde eine Vogel-HEV-Sequenz (EF206691) verwendet.

Die Abbildung 33 zeigt die 15 HEV-Sequenzen, die aus Kläranlagenzulaufproben isoliert wurden und vergleicht diese mit 41 Referenzsequenzen der Genotypen HEV-1 bis HEV-7 (G1 bis G7). Dabei wurden die ORF1-Sequenzen miteinander verglichen, da die verwendeten Primer (Johns *et al.*, 2010) ein Fragment aus diesem Bereich amplifizierten. Die Subgenotypen HEV-2b und HEV-3d wurden nicht in die Analysen einbezogen, da von diesen Genotypen keine HEV-Sequenzen im ORF1 verfügbar waren. Aus dem phylogenetischen Stammbaum mit 41 Referenzsequenzen von 7 verschiedenen Genotypen wird deutlich, dass alle 15 aus den Abwasserproben isolierten HEV-Stämme dem Genotyp 3 zugeordnet werden können. Von den 15 Sequenzen stammten 13 aus Kläranlagenzulaufproben, die vor der Nukleinsäureextraktion aufkonzentriert wurden. In 10 der Proben wurden die Viren mittels UZ aufkonzentriert und in 3 Proben mit der PEG-Fällung. Von zwei Direktproben konnten ebenfalls HEV-Sequenzen identifiziert werden.

Die in der Umwelt zirkulierenden HEV-Stämme sollten nun mit den in Menschen vorkommenden HEV-Genotypen verglichen werden. Dafür wurden die 15 im Abwasser detektierten HEV-Sequenzen mit 17 publizierten Sequenzen von HEV-infizierten Patienten aus dem Krankenhaus Charité in Berlin (Wang *et al.*, 2018) verglichen. Da alle aus dem Abwasser gewonnenen Sequenzen innerhalb des HEV-Genotyps 3 (G3) clusterten, wurden in der nächsten phylogenetischen Untersuchung nur noch Referenzsequenzen dieses Genotyps einbezogen (Abb. 34). Der Sequenzvergleich innerhalb des HEV-Genotyps 3 erlaubte ebenfalls eine genauere Bestimmung der HEV-Subgenotypen, die aus den Abwasserproben isoliert wurden. Die während der *nested*-PCR gebrauchte Positivkontrolle (KC618403) ist ebenfalls im Stammbaum enthalten.

▶ **Abbildung 34** (nächste Seite): Phylogenetischer Stammbaum zum Vergleich der in Berliner Kläranlagenzulaufproben detektierten HEV-3 Stämme (schwarze Punkte) mit Sequenzen aus HEV-infizierten Patienten aus Berlin (weiße Punkte). Sequenzen aus dem Abwasser sind mit Ort, Monat/Jahr der Probenahme sowie der Aufkonzentrierungsmethode benannt. Die Patientensequenzen wurden mit Zugangsnummer, Isolatnummer und dem Jahr der Probenahme bezeichnet. Die Zahlen an den Knotenpunkten repräsentieren Bootstrapwerte >60. Der Maßstabsbalken gibt die genetische Distanz (Nukleotidaustausch pro Stelle) an. Drei Kaninchen HEV-3-Sequenzen wurden als Outgroup verwendet.

Abbildung 34



Der auf der vorherigen Seite abgebildete phylogenetische Stammbaum offenbart, dass im Abwasser der Subgenotyp HEV-3c (G 3c) vorherrschte: 10 der 15 Sequenzen waren eindeutig diesem Subtyp zuzuordnen (Abb. 34).

Zwei weitere Sequenzen konnten deutlich als HEV-3f klassifiziert werden. Es kann dabei nicht unterschieden werden, ob die identifizierten Subgenotypen menschlichen oder tierischen Ursprungs sind. Da die *nested*-PCR-Primer relativ kurze Sequenzen von 332 bp amplifiziert haben, sind teilweise geringe Bootstrapwerte an den Knotenpunkten des Stammbaums vorhanden und drei der HEV-Sequenzen konnten nicht eindeutig charakterisiert werden. Sie waren jedoch in zwei Fällen vermutlich dem Genotyp HEV-3a (RL 03/2016 und RL 05/2017, beides Direktproben) und in einem Fall dem Subtyp HEV-3c oder HEV-3i (RL 12/2018 UZ) zuzuordnen. Die veröffentlichten HEV-Sequenzen von infizierten Patienten aus Berlin wurden neben jeweils einer Sequenz von HEV-3e und HEV-3f größtenteils als Subgenotyp HEV-3c identifiziert (Wang *et al.*, 2018). Diese Genotypen konnten in dem erstellten Stammbaum bestätigt werden (Abb. 34). Des Weiteren clusterten die meisten Abwasser- und Patientensequenzen innerhalb der Subtypen HEV-3c und HEV-3f.

Wie Abbildung 34 zeigt, konnten anhand des phylogenetischen Stammbaums, der mit dem Programm MEGA 7 erstellt wurde, die HEV-Subgenotypen bestimmt werden. Zur Überprüfung dieser Genotypen wurde das Onlinetool HEVnet genutzt, bei dem die Sequenzen online hochgeladen und genotypisiert wurden. Die Ergebnisse der Subgenotypisierung sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Aufgeführt sind darin der Ort, Monat und Jahr der Probenahme, die Aufkonzentrierungsmethode bzw. ob es sich um eine Direktprobe handelte sowie die identifizierten HEV-Genotypen.

Tabelle 13: Überblick der HEV-Sequenzen, die aus Kläranlagenzulaufproben isoliert wurden und deren HEV-Subgenotypen mit MEGA 7 bestimmt und mit HEVnet überprüft wurden. Die NCBI-Zugangsnummern der Sequenzen sind ebenfalls angegeben.

Ort, Monat/Jahr Probenahme	Direktprobe/ Aufkonzentrie- rungsmethode	Genotyp mit MEGA 7 bestimmt	Genotyp mit HEVnet überprüft	Zugangs- nummer (NCBI)
RL, 03/2016	Direkt	(3a)	3	MT087290
RL, 06/2016	PEG	3c	3	MT087291
RL, 07/2016	PEG	3c	3c	MT087292
RL, 08/2016	PEG	3c	3	MT087293
RL, 05/2017	Direkt	(3a)	3	MT087294
SL, 10/2017	UZ	3c	3c	MT087295
RL, 10/2017	UZ	3f	3f	MT087296
RL, 03/2018	UZ_1	3c	3c	MT087297
RL, 03/2018	UZ_2	3c	3c	MT087298
RL, 04/2018	UZ	3c	3	MT087299
RL, 07/2018	UZ	3c	3c	MT087300
RL, 08/2018	UZ	3c	3c	MT087301
RL, 10/2018	UZ	3f	3f	MT087302
RL, 12/2018	UZ	(3c oder 3i)	3	MT087303
RL, 01/2019	UZ	3c	3c	MT087304

Aus Proben der Kläranlage Ruhleben in Berlin wurden 14 der insgesamt 15 HEV-Sequenzen isoliert (Tab. 13). Zwei Drittel aller auswertbaren Sequenzen stammten außerdem aus Proben, die via UZ aufkonzentriert wurden. Alle aus den Abwasserproben identifizierten HEV-Sequenzen konnten zweifelsfrei dem zoonotischen Genotyp HEV-3 zugeordnet werden, sowohl durch den phylogenetischen Stammbaum als auch mit dem Onlinetool HEVnet.

Von 7 Proben konnte der Subgenotyp HEV-3c und von zwei Proben HEV-3f durch das HEVnet-Tool bestätigt werden.

Drei HEV- Sequenzen konnten nicht eindeutig charakterisiert werden. Die mit Hilfe des MEGA-7 Programms identifizierten Subgenotypen sind hier nur in Klammern angegeben, da auch im Bestätigungstest mit dem HEVnet Onlinetool lediglich der Genotyp HEV-3 verifiziert werden konnte. Alle 15 in dieser Arbeit ermittelten HEV-Sequenzen wurden in die NCBI GenBank mit entsprechenden Zugangsnummern von MT087290 bis MT087304 eingepflegt. Die 15 identifizierten RNA-Sequenzen mit den dazu gehörenden Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 18 (Anhang) aufgelistet.

Da die Hepatitisviren in Abwässern und Oberflächengewässern nachgewiesen werden konnten, stellt die Umwelt einen potenziellen Übertragungsweg der HEV auf den Menschen dar. Der direkte oder indirekte Kontakt zu HEV-infizierten Tieren gilt ebenfalls als Infektionsrisiko. Um zu überprüfen, ob auch infizierte Wildtiere HEV in die Umwelt eintragen, wurden Oberflächengewässerproben aus zwei Forstrevieren parallel zu Wildschweinleberproben auf HEV untersucht (Abschnitt 3.6).

3.6 HEV-Untersuchungen von Oberflächengewässern zweier Forstreviere

In Zusammenarbeit mit dem BfR wurden die Forstreviere Döberitzer Heide (DH) und Weisen untersucht. Es wurde überprüft, ob die dort lebenden Wildschweine HEV-infiziert sind und Hepatitisviren in die Umwelt einbringen können und somit zu einer möglichen Infektionsgefahr für Menschen führen könnten. Die beiden Forstreviere wurden für die Beprobung ausgewählt, da bekannt war, dass sich darin Wildschweine endemisch aufhalten. In diesen Revieren wurden in früheren Jahren außerdem bereits HEV-positive Wildschweine identifiziert.

Im Dezember 2018 wurden die Döberitzer Heide, ein Naturschutzgebiet in Brandenburg bei Potsdam, und das Forstrevier Weisen in Westbrandenburg an der Grenze zu Sachsen-Anhalt (Koordinaten Tab. 1, Lokalisation Abb. 21) beprobt. In dem Forstrevier DH wurden 9 verschiedene Oberflächengewässer und in dem Forstrevier Weisen 3 Gewässer mittels *nested*-PCR (Daten nicht dargestellt) und RT-qPCR (Tab. 14) auf HEV RNA untersucht.

Tabelle 14: Oberflächengewässerproben von mehreren Stellen aus zwei Forstrevieren, die auf HEV RNA getestet wurden in Direktproben, UZ-Proben und PEG-Proben.

Forstrevier Döberitzer Heide				Forstrevier Weisen			
Stelle	Direkt [positiv/ getestet (Kopien/100 ml)]	UZ	PEG	Stelle	Direkt [positiv/getestet (Kopien/100 ml)]	UZ	PEG
1 (Bruch)	1/7 (5×10^2)	0/2	0/2	1 (Suhle)	0/4	0/2	0/2
2 (Heide)	1/7 (4×10^2)	0/2	0/2	2 (Suhle)	0/4	0/2	0/2
3 (Graben)	1/6 (3×10^2)	0/2	0/2	3 (Graben)	0/4	1/2 (75)	0/2
4 (Graben)	0/7	0/2	0/2				
5 (Bruch)	0/6	0/2	0/2				
6 (See)	0/7	0/2	0/2				
7 (Graben)	0/6	0/2	0/2				
8 (Pfuhl)	1/7 (3×10^2)	0/2	0/2				
9 (Torfstich)	0/7	0/2	0/2				

Von den 12 Probenahmestellen in den Forstrevieren wurde das Oberflächenwasser jeweils mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentriert sowie zwei Direktproben abgenommen und in wiederholten RT-qPCRs auf HEV RNA untersucht (Tab. 14). Je Probenahmestelle wurden von den Oberflächengewässern der Döberitzer Heide zwei Direktproben insgesamt bis zu siebenmal getestet. Bei 4 der 9 Stellen wurde jeweils einmal ein HEV-positives Signal detektiert mit Konzentrationen von 3×10^2 Kopien/100 ml bis 5×10^2 Kopien/100 ml. Im Forstrevier Weisen wurden in einer UZ-Probe HEV RNA mit einer Konzentration von 75 Kopien/100 ml nachgewiesen. Insgesamt ergaben sich sehr geringe HEV-Detektionsraten in den Umweltproben der beiden Reviere. Die HEV-Konzentrationen lagen knapp über der NWG und mit Ausnahme der UZ-Probe unterhalb der Bestimmungsgrenze ($10 \times$ NWG). Alle Proben beider Forstreviere wurden ebenfalls via *nested*-PCR mit den Primern von Johne *et al.* (2010) auf HEV getestet. Dabei wurde kein Amplifikat generiert, dass sequenziert werden konnte.

Die ebenfalls im Dezember 2018 parallel genommen Leberproben von Wildschweinen aus den Revieren, in denen die Umweltuntersuchungen durchgeführt wurden, wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Prof. Reimar Johne) via RT-qPCR auf HEV untersucht. Es wurden 26 Leberproben von Wildschweinen aus der Döberitzer Heide entnommen und 15 Leberproben stammten von Tieren aus dem Revier Weisen. Keine der Wildschweinleberproben war HEV RNA-positiv. Dies korreliert mit den Umweltuntersuchungen, in denen in den insgesamt 120 Tests (Tab. 14) lediglich 5 positive Proben mit sehr geringen HEV-Konzentrationen bestimmt wurden.

Nicht nur in den Forstrevieren, sondern auch in Berlin gibt es große Population an Wildschweinen, die vor allem in Parks anzutreffen sind (Abb. 35).

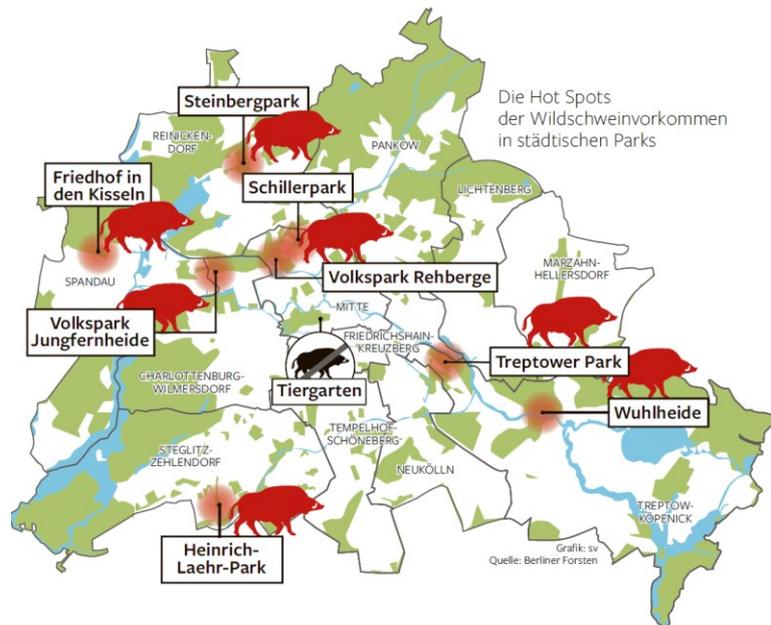


Abbildung 35: Das Vorkommen (rot markierte Tiere) von Wildschweinen auf Berliner Grünflächen. Im Tiergarten in Berlin befinden sich keine lokalen Wildschweinpopulationen. Quelle: Berliner Forsten.

In den meisten Berliner Bezirken kommen Wildschweine in Parks vor (Abb. 35). Die Wuhlheide und der Treptower Park liegen direkt an der Spree. Durch das große Wildschweinvorkommen kann vermutet werden, dass die in Berliner Abwässern und Oberflächengewässern detektierten HEV auch von dem Kot infizierter Wildtiere stammen könnten.

Menschen und Schweine sind auch die Hauptwirte von anderen Viren, wie z. B. Cosa (*common stool-associated*)-Viren. Cosaviren sind wie HEV zoonotische, unbehüllte RNA-Viren, über deren Auftreten in Deutschland bislang sehr wenig bekannt ist. Um das Vorkommen von Cosaviren in Umweltproben zu untersuchen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Abwässer und Oberflächengewässer auf Cosaviren untersucht. Das Vorhandensein von HEV und Cosaviren in der Umwelt sollte anschließend mit dem Vorkommen an humanen Adenoviren und Noroviren verglichen werden.

3.7 Methodenvergleiche für den Nachweis von Cosaviren

Um die beste Virusaufkonzentrierungsmethode zur Detektion von Cosaviren (CoSV) aus Umweltproben zu identifizieren, wurden die Viren aus Kläranlagenzulaufproben von einem Probenahmetag mit drei verschiedenen Verfahren aufkonzentriert (UZ, PEG, GW; siehe Abschnitt 2.3). Mittels RT-qPCRs (siehe Abschnitt 2.6) wurden danach die Konzentrationen an Cosaviren in den aufkonzentrierten Proben und Direktproben bestimmt (Tab. 15).

Tabelle 15: Methodenvergleich: Viren in Kläranlagenzulaufproben wurden mit 3 Methoden (UZ, PEG, GW) aufkonzentriert und via RT-qPCR auf CoSV untersucht. Direktproben wurden ebenfalls getestet.

Methode	CoSV-positiv/ insgesamt getestet	Konzentrationsbereich CoSV- positiver Proben [Kopien/100 ml]
Direkt	0/4	-
UZ	4/4	1×10^2 bis 1×10^3
PEG	4/4	1×10^3 bis 2×10^3
GW	0/4	-

Es wurden 4 Direktproben und für jede der Aufkonzentrierungsmethoden (UZ, PEG, GW) jeweils 4 Proben auf Cosaviren geprüft (Tab. 15). Im Gegensatz zu den HEV-Untersuchungen, bei denen die Viren auch in Direktproben nachweisbar waren, konnten in den Direktproben keine CoSV nachgewiesen werden. Dies beruht darauf, dass CoSV in den untersuchten Abwasserproben in geringeren Konzentrationen vorkamen als HEV.

Cosaviren konnten in allen Abwasserproben, in denen die Viren via UZ aufkonzentriert wurden, in Konzentrationen von 1×10^2 Kopien/100 ml bis 1×10^3 Kopien/100 ml quantifiziert werden. In allen vier mit PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben wurden ebenfalls Cosaviren detektiert. Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich nur gering und lagen im Bereich von 1×10^3 Kopien/100 ml bis 2×10^3 Kopien/100 ml. In Proben, die mittels GW-Filtration aufkonzentriert wurden, konnten dagegen keine CoSV nachgewiesen werden.

Um die mehrfach bestimmten Konzentrationen der mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentrierten Kläranlagenzulaufproben (Tab. 15) genauer miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Werte graphisch dargestellt (Abb. 36).

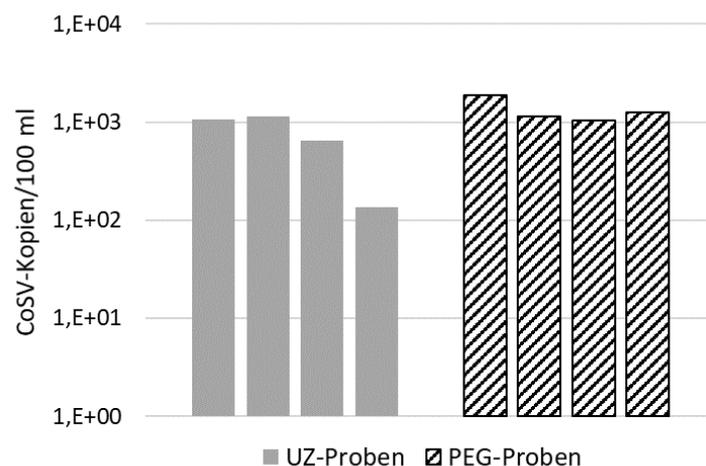


Abbildung 36: Vergleich der mittels RT-qPCR ermittelten CoSV-Konzentrationen von je vier Kläranlagenzulaufproben, die mit UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden.

Die via RT-qPCR gemessenen CoSV-Konzentrationen in den vier UZ-Proben schwankten in einem Bereich von etwa 1 Log₁₀-Stufe. Der Mittelwert dieser Proben lag bei $7,5 \times 10^2$ Kopien/100 ml (Abb. 36). Die PEG-Proben hingegen besaßen einen um ca. 0,4 Log₁₀-Stufen höheren Mittelwert von $1,3 \times 10^3$ Kopien/100 ml. Die ermittelten Konzentrationen der 4 PEG-Proben schwankten nur innerhalb einer Spanne von 0,1 Log₁₀-Stufen. Es ist bemerkenswert, dass die PEG-Methode zur Detektion der HEV weniger geeignet war (Tab. 6), sie aber ein gut geeignetes Aufkonzentrierungsverfahren zum Nachweis von CoSV aus dem Abwasser via RT-qPCR darstellt. Um CoSV zu detektieren, kann neben der PEG-Fällung auch die UZ-Methode, wenn auch mit einem etwas größeren Schwankungsbereich der Ergebnisse, verwendet werden.

Bei den Untersuchungen für HEV wurde in Abb. 20 festgestellt, dass das Ausgangsvolumen nicht nur die Nachweisgrenze bestimmte, sondern auch einen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen der Viren hatte. Daher wurde auch für CoSV getestet, wie sich verschiedene Ausgangsvolumen der UZ-Methode auf das Endergebnis der CoSV-Konzentration auswirken können (Abb. 37).

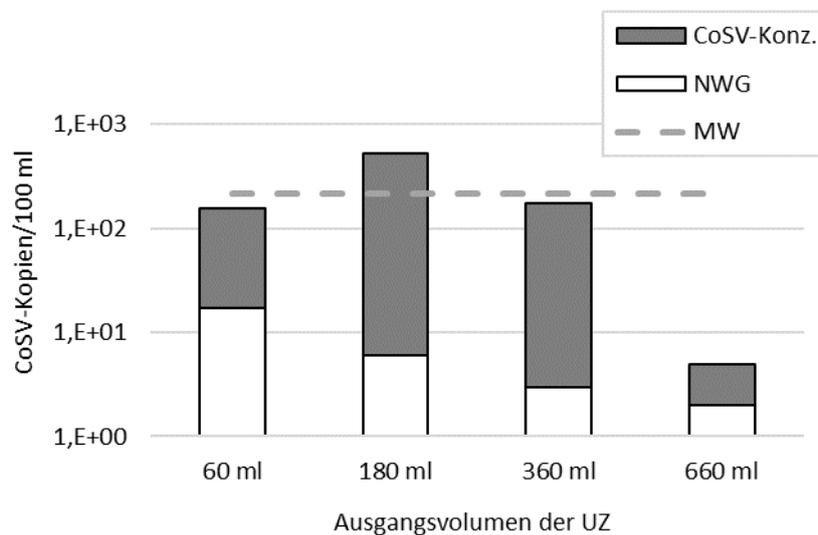


Abbildung 37: Quantifizierung von Cosaviren via RT-qPCR aus Abwasserproben, wobei verschiedene Probenvolumen für die Virusaufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation getestet wurden.

Aus derselben Kläranlagenzulaufprobe, die auch auf HEV getestet wurde (Abb. 20), wurden vier verschiedene Ausgangsvolumen für die Aufkonzentrierung von CoSV mittels UZ verglichen, um einen Hinweis zu erhalten, welches Volumen für die Detektion von CoSV am besten geeignet ist (Abb. 37). Der Mittelwert (MW) der Konzentrationen der vier Ansätze wurde mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Cosaviren waren in allen untersuchten Proben nachweisbar. Die höchste CoSV-Konzentration wurde in der Probe mit einem Ausgangsvolumen von 180 ml gemessen. Ein höheres oder geringeres Ausgangsvolumen als die 180 ml resultierte in geringeren CoSV-Konzentrationen je 100 ml Abwasserprobe. Die CoSV-Ergebnisse mit verschiedenen Ausgangsvolumen (Abb. 37) fielen jedoch nicht so regelmäßig aus wie bei dem gleichartigen HEV-Test, bei dem die Konzentration an HEV mit steigendem Ausgangsvolumen stets sank (Abb. 20). Das könnte jedoch damit erklärt werden, dass die gemessenen CoSV-Konzentrationen in mit UZ aufkonzentrierten Proben einen etwas größeren Schwankungsbereich zeigten (Abb. 36). Für die weiteren CoSV-Versuche wurde ein mittleres UZ-

Volumen von 180 ml verwendet, um die Konzentrationen der CoSV mit den der HEV gut vergleichen zu können.

Da es bislang in Deutschland kaum Informationen über das Vorkommen von Cosaviren in der Umwelt gibt, wurden Abwässer und Oberflächengewässer auf diese Viren untersucht. Die Proben wurden mit den als geeignet identifizierten Methoden UZ und PEG-Fällung aufkonzentriert und mittels RT-qPCR auf CoSV getestet (Abschnitt 3.8).

3.8 Nachweis von Cosaviren in Umweltproben

Um das Vorkommen von Cosaviren in Umweltproben zu untersuchen, wurden monatliche Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben getestet. Es wurde je eine mit UZ und PEG-Fällung aufkonzentrierte Probe im Jahresverlauf von März 2018 bis Februar 2019 mittels RT-qPCR auf Cosaviren untersucht (Abb. 38).

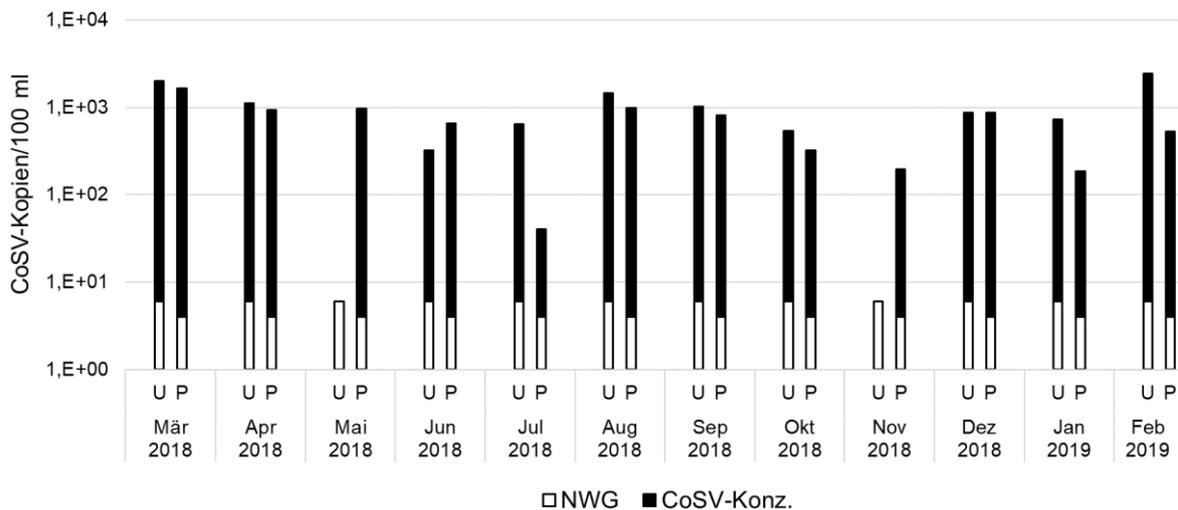


Abbildung 38: Konzentrationen an Cosaviren in monatlichen Zulaufproben der KA RL im Jahresverlauf. Es wurden mit UZ (U) und PEG-Fällung (P) bearbeitete Proben via RT-qPCR auf CoSV getestet. Schwarze Balken stellen gemessenen CoSV-Konzentrationen über der Nachweisgrenze (NWG, weiße Balken) dar.

In der einjährigen CoSV-Überwachung der Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben wurden hohe Detektionsraten erreicht (Abb. 38). In 10 der 12 monatlichen Proben, die mit UZ aufkonzentriert wurden, konnten CoSV nachgewiesen werden. Bei den mit PEG-Fällung bearbeiteten Proben konnte sogar eine Detektionsrate von 100 % erzielt werden. Der Mittelwert aller 12 UZ-Proben lag mit 9×10^2 Kopien/100 ml etwas über dem der PEG-Proben mit 7×10^2 Kopien/100 ml. Die CoSV-Konzentrationen in den Proben, die mittels UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney U-Test, $p < 0.05$; siehe Abschnitt 2.11). Im Jahresverlauf des CoSV-Vorkommens ist kein eindeutiger saisonaler Verlauf erkennbar. Die Ergebnisse des einjährigen Screenings bestätigen erneut, dass die PEG-Fällung die geeignetste Methode zur Aufkonzentrierung der Cosaviren aus ungeklärtem Abwasser darstellt.

Um die gemessenen Konzentrationen der Cosaviren mit anderen Indikatorviren zu vergleichen, wurden von jeder monatlichen Probe auch die Konzentrationen an humanen Adenoviren und Noroviren ermittelt. Für diesen Vergleich wurden Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben, in denen die Viren mittels PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, verwendet. Monatlich wurde aus denselben Proben jeweils die Konzentration an CoSV, HAdV und HNV gemessen und im Jahresverlauf dargestellt (Abb. 39).

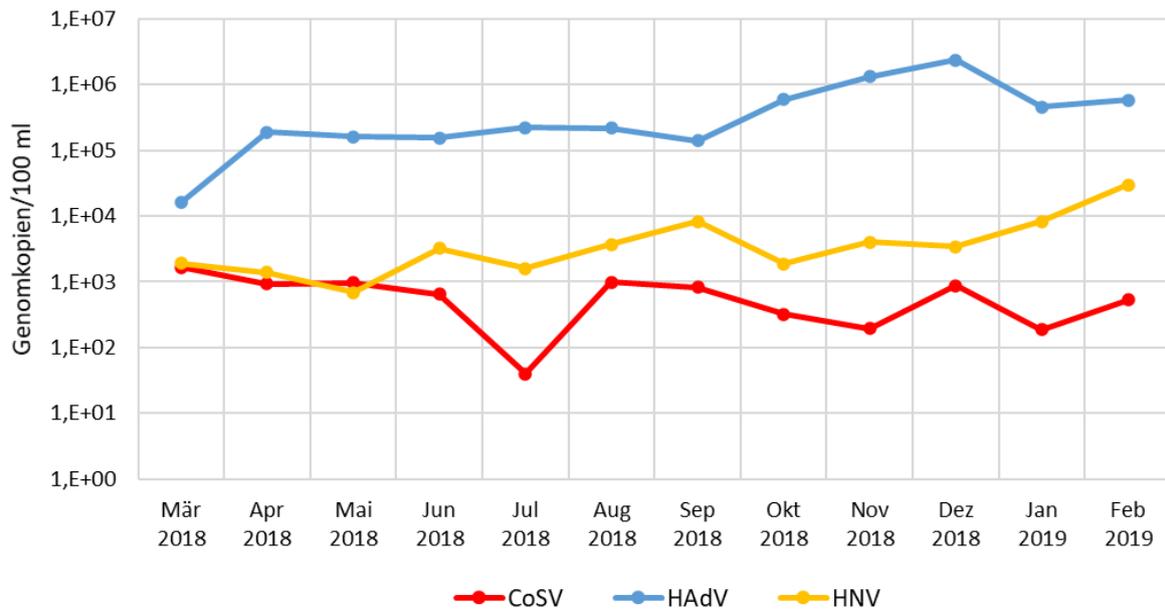


Abbildung 39: Monatlich gemessene Konzentration an CoSV, HAdV und HNV in Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben, die mittels PEG-Fällungen aufkonzentriert wurden, von März 2018 bis Februar 2019.

Die Detektionsraten der CoSV, HAdV und HNV in den untersuchten Kläranlagenzulaufproben lagen bei 100 % (Abb. 39). In allen 12 monatlichen Kläranlagenzulaufproben, die mittels PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, konnten die Viren nachgewiesen werden. Der MW der CoSV-Konzentrationen im Jahresverlauf entspricht 7×10^2 Kopien/100 ml. Im Vergleich dazu waren die Konzentrationen an HNV um ca. 1 Log_{10} -Stufe erhöht und besaßen einen MW von 6×10^3 Kopien/100 ml. Die detektierten Konzentrationen an CoSV und HNV waren im März, April und Mai 2018 sehr ähnlich. Die durchschnittliche Konzentration der HAdV betrug 5×10^5 Kopien/100 ml und war somit 3 Log_{10} -Stufen höher als die der CoSV bzw. 2 Log_{10} -Stufen höher als die der HNV.

Nicht nur das Vorhandensein der Viren in der Umwelt, auch deren Lebensfähigkeit spielt eine entscheidende Rolle. Die PMA-PCR-Methode, die theoretisch eine Unterscheidung von beschädigten und intakten Viren ermöglicht, hatte in Direktproben von Kläranlagenzulaufen für HEV nicht funktioniert (siehe Abschnitt 3.3.3). Genauso wie in Abschnitt 3.3.3 für HEV beschrieben, wurde nun getestet, ob defekte und intakte Viruskapside der Cosaviren aus Abwasserproben mittels PMA-RT-qPCR voneinander unterschieden werden können. Anstelle von Direktproben wurden für die CoSV-PMA-Untersuchungen jedoch Proben, die mittels PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, verwendet.

Ähnlich wie bei den HEV-Untersuchungen konnte die PMA-RT-qPCR nicht zur Unterscheidung von beschädigten und intakten CoSV-Kapsiden verwendet werden (Daten nicht dargestellt).

Neben Kläranlagenzulaufproben, die üblicherweise hohe Konzentration an humanpathogenen Viren enthalten, wurden in dieser Arbeit auch Proben von Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern auf CoSV untersucht. Von den 12 monatlichen Zulaufproben (Abb. 38) wurden ebenfalls die korrespondierenden Ablaufproben, die mit UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, auf CoSV getestet. Im Gegensatz zu den Kläranlagenzulaufproben konnten in keiner der untersuchten Ablaufproben CoSV nachgewiesen werden. Die Konzentrationen an Cosaviren wurden daher in der Kläranlage Ruhleben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Das Vorkommen von CoSV in Flüssen mit Mischwasserüberläufen (MWÜ) konnte nicht untersucht werden, da nur Direktproben und Proben, die mit der (später als nicht geeignet identifizierten) GW-Methode aufkonzentriert wurden, zur Verfügung standen. In zwei Zulaufproben der Kläranlage Schönerlinde von Oktober 2017 konnten ebenfalls CoSV mit einer Konzentration von 2×10^2 Kopien/100 ml quantifiziert werden. Das Vorhandensein der CoSV in unterschiedlichen Kläranlagen verdeutlicht, dass es sich nicht um ein zeitlich oder räumlich begrenztes Auftreten dieser Viren handelte und die gemessenen Konzentrationen an CoSV im Abwasser durchaus repräsentativ sind.

Weiterhin wurden aus dem Fluss Havel in Berlin 9 aufkonzentrierte Proben (5x PEG, 4 UZ) untersucht, aber es konnte keine CoSV RNA nachgewiesen werden. Auch Sediment- und Wasserproben einer Badestelle an der Havel (KBW) wurden auf Cosaviren untersucht. Es wurden jeweils 6 Sedimentproben und 6 Wasserproben (4x PEG, 2x UZ) auf CoSV getestet, diese zeigten jedoch alle ein negatives Ergebnis.

Cosaviren konnten also in Kläranlagenzulaufproben detektiert werden, in den entsprechenden Kläranlagenabläufen jedoch nicht mehr. Aufgrund der effizienten Reduktion der CoSV-Konzentrationen in der Kläranlage Ruhleben konnten daher auch, wie erwartet, keine CoSV in Berliner Oberflächengewässerproben nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den untersuchten Berliner Flüssen wurde auch eine im Umweltbundesamt eingefroren gelagerte Probe des verschmutzten indischen Flusses Yamuna aus dem Jahr 2007 auf CoSV getestet. In dieser Probe wurden bereits erhöhte Konzentrationen an HAdV und HNV sowie positive Nachweise für Hepatitis-A-Viren und HEV detektiert (Sprenger *et al.*, 2014). Diese Probe wurde nach der Langzeitlagerung nochmals auf HAdV und HNV untersucht und die Konzentrationen an HEV und CoSV bestimmt (Tab. 16).

Tabelle 16: Konzentrationen an CoSV, HEV, HAdV und HNV in einer Probe des indischen Yamuna Flusses in der Umgebung von Neu-Delhi, angegeben in Kopien/100 ml.

Fluss Yamuna	CoSV	HEV	HAdV	HNV
Direktprobe	n. a.	3×10^4	3×10^5	8×10^3
UZ-Proben	6×10^2	1×10^3	5×10^3	46

Von der Probe aus dem Fluss Yamuna wurden 5 ml für die direkte Analyse abgenommen und auf CoSV, HEV, HAdV und HNV getestet (Tab. 16). Das Flusswasser wurde zweimal parallel mittels UZ aufkonzentriert und beide Proben untersucht. Es ist jeweils der Mittelwert der Viruskonzentrationen

angegeben, die in beiden UZ-Proben bestimmt wurden. Cosaviren wurden mit einer Konzentration von 6×10^2 Kopien/100 ml in der indischen Flussprobe, die mit UZ aufkonzentriert wurde, detektiert. Die Konzentration an HEV lag mit 1×10^3 Kopien/100 ml in den UZ-Proben und 3×10^4 Kopien/100 ml in der Direktprobe etwas höher. Auch HAdV und HNV wurden in der Direktprobe und beiden UZ-Proben nachgewiesen, wobei die HAdV die höchsten Konzentrationen von den hier gemessenen Viren aufwies. Es wurden 3×10^5 HAdV-Kopien/100 ml bei der direkten Analyse und 5×10^3 HAdV-Kopien/100 ml in den UZ-Proben detektiert. Im Vergleich dazu lag die Konzentration an HNV mit 8×10^3 Kopien/100 ml in der Direktprobe und 46 Kopien/100 ml in den UZ-Proben unter den gemessenen Konzentrationen an CoSV und HEV. Die gemessene Konzentration an HAdV in der Direktprobe war ca. 1 Log_{10} -Stufe höher als in der Studie von Sprenger *et al.* (2014). Die Konzentration an HNV korrelierte hingegen mit der früheren Messung. Die in der indischen Flussprobe quantifizierten Konzentrationen an CoSV und HEV in den UZ-Proben waren vergleichbar mit den Konzentrationen dieser Viren in den Berliner Kläranlagenzulaufproben (Abb. 22 und Abb. 38). Es ist mit diesen Methoden also möglich, CoSV und HEV auch in Oberflächengewässern nachzuweisen, wenn die Viren dort in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden sind.

3.9 Vorkommen von HEV und CoSV im Vergleich zu HAdV und HNV im Abwasser

Das in dieser Arbeit untersuchte Vorkommen von HEV und CoSV sollte nun miteinander und mit anderen Indikatorviren für fäkale Verunreinigungen verglichen werden (Abb. 40). Dafür wurden Kläranlagenzulaufproben, die via UZ aufkonzentriert wurden, verwendet. Diese Methode war zur Aufkonzentrierung von HEV sowie CoSV aus Abwasserproben geeignet und die Viren konnten monatlich über ein Jahr untersucht werden.

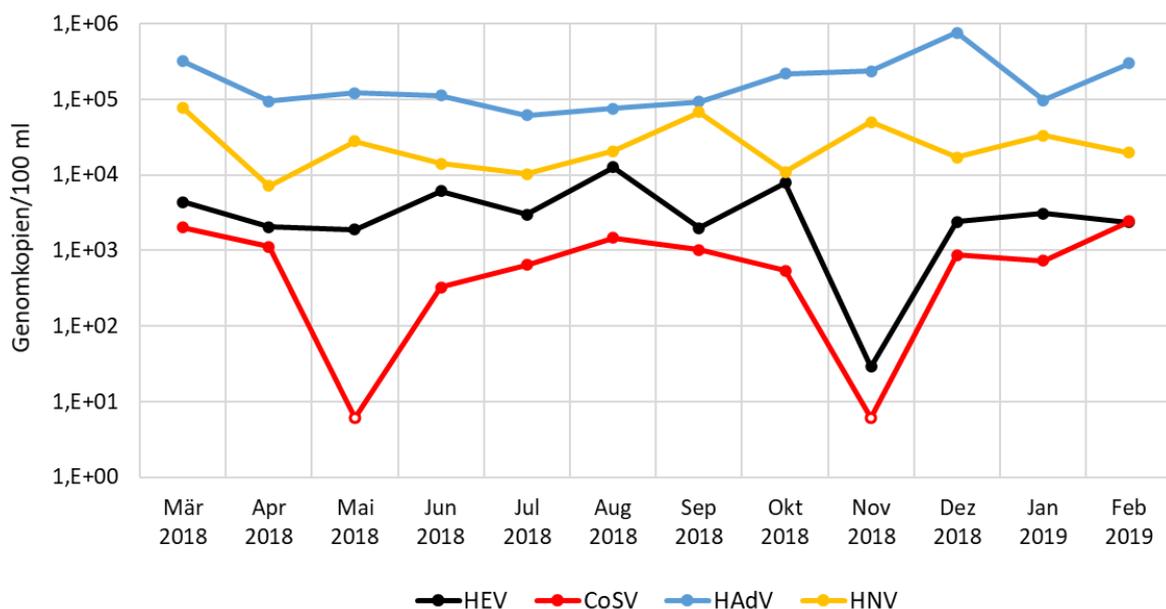


Abbildung 40: Monatliche Kläranlagenzulaufproben, die mit UZ aufkonzentriert wurden. Im Verlauf eines Jahres wurden die Konzentrationen an HEV, CoSV, HAdV und HNV ermittelt.

Aus denselben monatlichen Abwasserproben der Kläranlage Ruhleben wurden jeweils die Konzentrationen an HEV, CoSV, HAdV und HNV gemessen und dargestellt (Abb. 40). Die vier humanpathogenen Viren wurden in jeder monatlichen Abwasserprobe nachgewiesen. Lediglich im Mai und November 2018 lag die Konzentration an CoSV unterhalb der NWG von 6 Kopien/100 ml (unausgefüllte Datenpunkte). Der MW der 12 monatlich gemessenen HAdV-Konzentrationen lag bei ca. 2×10^5 Kopien/100 ml. HNV kamen durchschnittlich in Konzentrationen von 3×10^4 Kopien/100 ml vor. Der MW der HEV-Konzentrationen im Jahresverlauf entsprach 4×10^3 Kopien/100 ml. Die durchschnittliche Konzentration an CoSV lag bei 9×10^2 Kopien/100 ml. Ein deutlicher Saisoneffekt konnte für keines der vier untersuchten Viren in den Kläranlagenzulaufproben beobachtet werden.

Saisonale Unterschiede des Virusvorkommens werden eher in den Kläranlagenabläufen vermutet, da einige Reinigungsschritte der Kläranlage in Außenbereich Becken stattfinden. Vor allem in den wärmeren Monaten sind die Viren dort UV-Strahlung der Sonne und Hitze ausgesetzt. Einige Viren sind im Sommer möglicherweise stabiler gegen diese Einflüsse als andere Viren, was sich in den Viruskonzentrationen der Kläranlagenabläufe äußern könnte.

In der Abbildung 41 sind deshalb die Konzentrationen von HEV, CoSV, HAdV und HNV in den Kläranlagenzuläufen und -abläufen zusammengefasst. Untersucht wurden Abwasserproben der Kläranlage Ruhleben, die mit UZ aufkonzentriert wurden. Die gemessenen Daten wurden in die Monate des Frühlings und Sommers bzw. des Herbsts und Winters aufgeteilt.

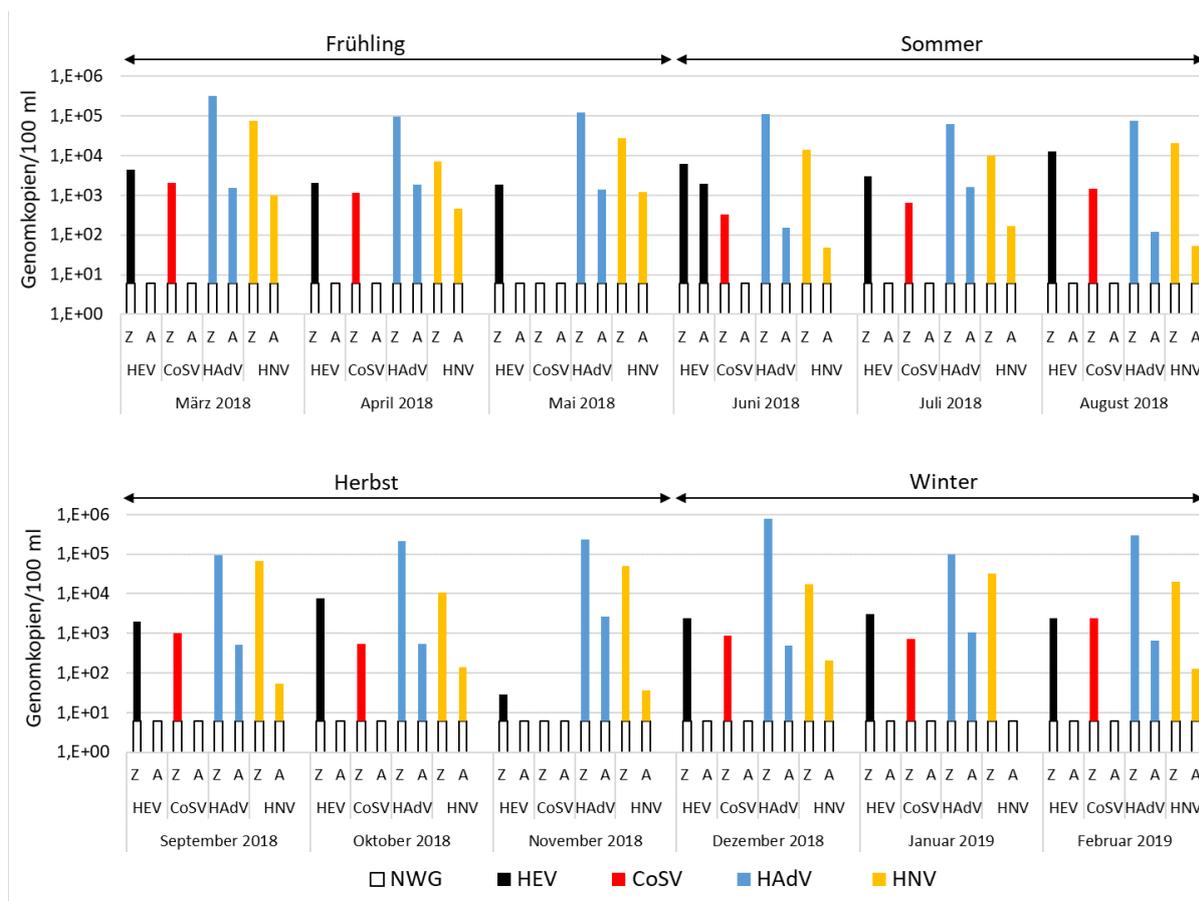


Abbildung 41: Von März 2018 bis Februar 2019 wurden die Konzentrationen von HEV, CoSV, HAdV und HNV in monatlichen Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, ermittelt.

Die in den Kläranlagenzulaufproben gemessenen Konzentrationen an HEV, CoSV, HAdV und HNV wurden mit den entsprechenden Ablaufproben verglichen (Abb. 41). Aus derselben Zulauf- bzw. Ablaufprobe wurde jeweils eine Konzentration für jedes Virus ermittelt. In den Zulaufproben der Kläranlage kamen HAdV in den höchsten Konzentrationen vor, gefolgt von HNV, HEV und schließlich CoSV. In dem untersuchten Jahr wurden HEV in jeder Zulaufprobe aber in nur einer Ablaufprobe vom Juni 2018 detektiert. Ähnliche Detektionsraten zeigten CoSV, in 10 von 12 Zulaufproben wurden die Viren nachgewiesen, jedoch in keiner Ablaufprobe. In den Ablaufproben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, waren HEV und CoSV nicht mehr nachweisbar, ihre Konzentrationen lagen nun möglicherweise unterhalb der NWG. HEV konnten jedoch in Direktproben der Kläranlagenabläufe noch nachgewiesen werden (siehe Abb. 24 und Abb. 25). HAdV und HNV hingegen wurden neben den Zulaufproben auch in nahezu allen Ablaufproben detektiert. Durchschnittlich wurden in den Ablaufproben noch ca. 1×10^3 HAdV-Kopien/100 ml und 3×10^2 HNV-Kopien/100 ml gemessen. Innerhalb der Kläranlage fand somit eine Virusreduktion von ungefähr 2 Log_{10} -Stufen statt. Bei den HAdV und HNV war kein klares saisonales Auftreten erkennbar. Die Konzentration der HAdV und HNV war in den Kläranlagenablaufproben im Frühling 2018 jedoch etwas erhöht im Vergleich zum Mittelwert aller 12 Ablaufproben im Jahresverlauf. In den sommerlichen Zulaufproben der Kläranlage war die Konzentration an HAdV und HNV hingegen etwas geringer als der jeweilige Mittelwert der 12 Zulaufproben. In den monatlich untersuchten Abwasserproben zeigten HEV und CoSV kein saisonabhängiges Vorkommen.

4 Diskussion

4.1 Begründung der Auswahl der durchgeführten umweltvirologischen Untersuchungen

Zwischen Menschen und Tieren übertragbare Infektionskrankheiten stehen angesichts der vorherrschenden Pandemie, verursacht durch das zoonotische SARS-CoV-2, im Fokus des Interesses. Durch Kenntnisse über das Vorkommen dieser Viren in Menschen und Tieren sowie deren Verbreitung in der Umwelt kann das Infektionsgeschehen abgeschätzt, Übertragungsrouten identifiziert und entsprechende Maßnahmen ergriffen werden. Oft fehlen Daten zum Vorkommen in der Umwelt, um die Verbreitung der zoonotischen Viren zu komplettieren. Die hohe Seroprävalenz von Hepatitis-E-Viren in Menschen und Tieren korreliert beispielsweise nicht ausreichend mit den klinischen Diagnosen in Deutschland und es gibt nur wenig Informationen zum Vorkommen in der Umwelt. HEV könnten somit ein unterschätztes bzw. unerkanntes Gesundheitsrisiko für die deutsche Bevölkerung darstellen. Cosaviren sind ebenfalls zoonotische Viren, über die es bislang generell wenig Informationen zum Vorkommen in Menschen, Tieren und der Umwelt gibt. Zudem kam es in Deutschland in den letzten Jahren gehäuft zu Erkrankungen, bei denen Patienten „Poliovirus-ähnliche“ Symptome, vor allem akute schlaffe Lähmungen, aufwiesen. Polioviren konnten aber in diesen Fällen als Verursacher ausgeschlossen werden. Cosaviren können ähnliche Lähmungserscheinungen verursachen. Das Infektionsgeschehen von CoSV in der Bevölkerung sollte deshalb über das Abwasser untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in der Umwelt in Deutschland zu untersuchen. In diese Studie wurden sowohl Abwasserproben als auch Oberflächengewässerproben einbezogen. Die Viren wurden mit verschiedenen Methoden aufkonzentriert und die Viruskonzentrationen mittels quantitativer PCR bestimmt. Da abhängig vom HEV-Genotyp das Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung variiert, wurden HEV aus Umweltproben weiter charakterisiert, um die in der Umwelt zirkulierenden HEV-Stämme zu identifizieren. Die HEV-Genotypen wurden außerdem mit HEV-Sequenzen von infizierten Patienten auf Korrelation getestet. In den Umweltproben wurden neben HEV und CoSV auch die Konzentrationen von anderen Indikatorviren für fäkale Verunreinigungen bestimmt. Die Konzentrationen an humanen Adenoviren und Noroviren sowie somatischen Coliphagen und F+-spezifischen RNA-Phagen wurden ermittelt, um deren Vorkommen mit dem der HEV und CoSV zu vergleichen.

Fast alle viralen Pathogene kommen auch in der Umwelt vor. Humanpathogene Viren können die Umwelt, speziell Oberflächengewässer wie Flüsse und Seen, direkt durch menschliche und tierische Exkremente oder durch Kontaminationen mit Abwasser erreichen. Generell wird zwischen punktuellen Verschmutzungen, die an spezifischen Stellen durch Direkteinleitungen in die Umwelt gelangen und diffusen Belastungen unterschieden. Durch Punktquellen, wie z.B. Kläranlagenabläufe, werden die Viren direkt in die Oberflächengewässer eingebracht. Diffuse Verunreinigungen hingegen treten sporadisch auf. Zu den zeitweiligen und unregelmäßigen Kontaminationsquellen zählen urbane und landwirtschaftliche Oberflächenabflüsse, illegale Einleitungen von Abwässern, undichte Abwasserkanäle oder Klärgruben, Boote, die Fäkalien ins Wasser entlassen, und Mischwasserüberläufe. Die meisten Viren, die über kontaminierte Nahrung oder den Wasserweg übertragen werden können, sind typischerweise unbehüllte Viren mit einer sehr hohen Tenazität (Carter, 2005). Das liegt zum einen an der nicht vorhandenen Lipidhülle, wodurch sie stabiler

gegenüber Umwelteinflüssen sind, und zum anderen an ihrer Fähigkeit, den Verdauungstrakt, in dem sehr niedrige pH-Werte herrschen, zu überleben (Stewart *et al.*, 2008; Girones *et al.*, 2010).

Die in die Umwelt gelangten Viren werden durch die meist großen Wasservolumen in den Oberflächengewässern verdünnt. Die humanpathogenen Viren und Phagen befinden sich nach ihrem Eintrag in die Gewässer jedoch nicht nur im Wasser selbst, sie können auch an die Oberflächen von Sedimenten binden und sich dort anreichern (Bonilla *et al.*, 2007; Hassard *et al.*, 2016). Der pH-Wert der Umgebung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorption von Viren an die Sedimentoberflächen. Dieser Zusammenhang wurde durch Bindungsexperimente mit humanpathogenen Viren und Phagen an Silika-Partikel gefunden (Zerda *et al.*, 1985). Liegt der pH-Wert unter dem isoelektrischen Punkt der jeweiligen Viren, ist deren Oberfläche positiv geladen und sie binden an negativ geladene Partikel. Umgekehrt gilt, dass bei einem über dem isoelektrischen Punkt vorhandenem pH-Wert die Ladung der Viren negativ ist und sie an Oberflächen mit positiver Ladung adsorbieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen das der Kläranlage zugeführte Abwasser nach der Entfernung von groben Bestandteilen (Kläranlagenzulauf nach Vorklärung) beprobt und untersucht, um in der Bevölkerung zirkulierende HEV, CoSV, HAdV und HNV zu detektieren (Übersicht aller Probenahmestellen siehe Abb. 21). Die entsprechenden Kläranlagenabläufe wurden ebenfalls getestet, um die Reinigungsleistungen der Kläranlagen und die in die Oberflächengewässer eingeleiteten Viruskonzentrationen zu bestimmen. Die Viruskonzentrationen nach der Verdünnung in den Oberflächengewässern wurden in Wasserproben von zwei Flüssen und einer Badestelle bestimmt. Von dieser Badestelle wurden außerdem Sedimentproben genommen und auf Virenadsorption getestet. Ausgehend von den nachgewiesenen Viruslasten in den Gewässern kann auch die potenzielle Gefahr einer fäkal-oralen Übertragung auf Menschen bewertet werden. Durch Wassersport, Freizeitaktivitäten im Wasser und Schwimmen wird Oberflächenwasser von Erwachsenen und Kindern verschluckt und Viren könnten aufgenommen werden und dann möglicherweise eine Infektion hervorrufen (Dorevitch *et al.*, 2011; Schets *et al.*, 2011).

Zoonotische HEV des Genotyps 3 kommen vor allem bei Menschen und Wildschweinen vor. Endemische Gebiete mit großen Wildschweinpopulationen sind daher von Interesse, um die HEV-Übertragung über die Umwelt durch diese Tiere zu untersuchen. Daher wurden aus zwei Forstrevieren, in denen bereits HEV-Infektionen bei Wildschweinen nachgewiesen wurden, Oberflächengewässerproben aus Gräben, sumpfigen Gewässern, Suhlen, in denen sich Wasser gesammelt hat, und Proben aus einem See auf HEV RNA untersucht.

4.2 Virenanreicherungen aus Wasserproben

Da humanpathogene Viren in der Umwelt in geringen oder sehr geringen Konzentrationen vorkommen, müssen sie meist vor dem eigentlichen Nachweis aufkonzentriert werden. Diese Aufkonzentrierung der Viren für weitere Analysen ist der kritischste Schritt umweltvirologischer Analysen. Größere Wasservolumen werden auf kleinere Volumen eingeengt und die vorhandenen Viren somit aufkonzentriert. Direkte Analysen ohne zusätzliche Aufkonzentrierungen sind teilweise auch möglich, wenn die Viruskonzentrationen, beispielsweise in Kläranlagenzuläufen, ausreichend hoch sind.

Zum Nachweis von Viren aus Umweltproben werden molekulare Techniken, vor allem PCR-basierte Methoden, verwendet. Oft stellt dieses Verfahren sogar die einzige Möglichkeit der Detektion und

Quantifizierung dar, weil für viele Viren keine zellkulturbasierten Methoden etabliert sind. Die Amplifikation von Nukleinsäuren während der PCR stellt ein spezifisches, sensitives und schnelles Detektionsverfahren dar. Neben dem Vorkommen kann mit der quantitativen PCR ebenfalls die Konzentration der Viren, beispielsweise in Oberflächengewässerproben, bestimmt werden. Anhand der quantitativen Daten ist dann eine Abschätzung des Infektionsrisikos für die Bevölkerung möglich. Die Effizienz der Virusentfernung in Trink- und Abwasseraufbereitungsanlagen kann ebenfalls bewertet werden. Der Nukleinsäurenachweis mittels PCR sagt jedoch nichts über die Infektiosität der Viren aus, denn es kann nicht zwischen infektiösen und inaktivierten Viruspartikeln unterschieden werden. Für die Charakterisierung von Viren können Teile des Virusgenoms mittels *nested*-RT-PCR vervielfältigt und sequenziert werden, um Genotypisierungen durchzuführen (Bosch, 1998; Girones *et al.*, 2010).

4.2.1 Methodenvergleiche zur Aufkonzentrierung von HEV und CoSV

Für die Aufkonzentrierung von HEV aus Abwasserproben wurden bislang hauptsächlich die Methoden der Ultrazentrifugation (Clemente-Casares *et al.*, 2003; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018A; Matos *et al.*, 2018) und Polyethylenglykol-Fällung (Masclaux *et al.*, 2013; Myrmel *et al.*, 2015; Iaconelli *et al.*, 2015; Ram *et al.*, 2016; Miura *et al.*, 2016) gebraucht. Zum Teil wurden diesen Techniken Adsorptions/Elutions- oder Membranfilterverfahren vorgeschaltet. Für HEV-Untersuchungen in Kläranlagenzulaufproben wurden ebenfalls Direktproben ohne Aufkonzentrierungsverfahren verwendet (La Rosa *et al.*, 2010).

Bislang wurden Umweltproben insgesamt selten auf Cosaviren untersucht. In den wenigen bisherigen Analysen wurden Membranfilter zur Aufkonzentrierung genutzt. Diese bestanden aus Polyethersulfon (Blinkova *et al.*, 2009) oder aus negativ geladenem Zellulosemischester (Haramoto und Otagiri, 2014; Tandukar *et al.*, 2018) mit anschließender Ultrafiltration (Kitajima *et al.*, 2015). Kläranlagenzulaufproben wurden in einer italienischen Studie mittels PEG-Fällung aufkonzentriert, um CoSV nachzuweisen (Ferraro *et al.*, 2018). In Frankreich wiederum wurde eine Kombination aus Filtern, Flockung und UZ angewandt, um CoSV in Proben von Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässer zu detektieren (Prevost *et al.*, 2015).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aufkonzentrierungsverfahren besitzen verschiedene Nachweisgrenzen, die vor allem von den eingesetzten Wasservolumen und den Endvolumen der Virusaufkonzentrierungen abhängig sind. Die untersuchten Direktproben (5 ml) haben aufgrund ihres geringen Probenvolumens eine NWG von 200 Kopien/100 ml. Die NWG der aufkonzentrierten Proben wurden wie folgt berechnet: UZ-Proben (180 ml Ausgangsvolumen): 6 Kopien/100 ml, PEG-Proben (1 L Ausgangsvolumen): 4 Kopien/100 ml und GW-Proben (2 L Ausgangsvolumen): 1 Kopie/100 ml. Je größer das verwendete Ausgangsvolumen und je geringer das Endvolumen ist, desto geringer ist auch die errechnete NWG. Die Aufkonzentrierungsmethoden sind hauptsächlich dafür da, die NWG zu verringern. Theoretisch sollte unabhängig vom Ausgangsvolumen immer die gleiche Viruskonzentration, bezogen auf 100 ml der Probe, gemessen werden. Diese Annahme wurde in einem Experiment mit verschiedenen Ausgangsvolumen der UZ-Methode mit anschließendem HEV-Nachweis untersucht. Je größer das verwendete Abwasservolumen gewählt wurde, desto geringer war die NWG, aber überraschenderweise auch die detektierte Konzentration an HEV-Kopien bezogen auf 100 ml Probe (Abb. 20). In Berechnungen, bei denen von der Viruskonzentration in einem Konzentrat auf die Konzentration der Ursprungprobe schlussgefolgert wird, wird normalerweise angenommen, dass 100 % der vorhandenen Viren der Probe aufkonzentriert werden, was jedoch selten der Fall ist. Mit steigendem Wasservolumen können auch mehr Viren im Aufkonzentrierungsprozess verloren gehen.

Dadurch können, wie das Experiment mit HEV in Abbildung 20 gezeigt hat, geringere Viruskonzentrationen in Proben, die von größeren Volumen aufkonzentriert wurden, resultieren.

Die Analyse von Direktproben bzw. die verschiedenen Methoden der Virusaufkonzentrierung waren für HEV und CoSV unterschiedlich gut geeignet. Die Untersuchungen zeigten, dass die GW-Filtration für die Aufkonzentrierung der untersuchten Viren nicht geeignet war. Das Verfahren der Ultrazentrifugation (UZ) zur Aufkonzentrierung war hingegen für HEV und CoSV gut geeignet. HEV konnten auch mit der direkten Analyse von Wasserproben zuverlässig nachgewiesen werden (Tab. 6). Cosaviren konnten dagegen in Direktproben nicht nachgewiesen werden, da sie in den untersuchten Proben in geringeren Konzentrationen als die Hepatitisviren vorkamen. Zur Detektion der CoSV eignete sich wiederum die PEG-Methode deutlich besser (Tab. 15), welche zur Aufkonzentrierung von HEV weniger geeignet war. Die unterschiedlich gute Eignung der PEG-Methode zur Aufkonzentrierung könnte durch die spezifischen Charakteristika der Viren begründet werden. Die Einstellung der Probe auf pH 7,2 könnte beispielsweise einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Viren haben, was wiederum deren Bindung an die PEG-Moleküle beeinflussen könnte. Die Oberflächenladung der Viren ist abhängig vom isoelektrischen Punkt, der jedoch für HEV und CoSV bislang noch nicht bekannt ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass zur Aufkonzentrierung von HEV die Methode der UZ neben der direkten Analyse der Viren am besten geeignet war. Cosaviren ließen sich am besten in Proben nachweisen, die mittels PEG-Fällung oder UZ aufkonzentriert wurden.

Humane Adenoviren (HAdV) konnten dagegen sowohl in Direktproben als auch in UZ- und PEG-Proben sicher nachgewiesen werden. Zur Detektion der HNV waren Direktproben und mittels UZ aufkonzentrierte Proben dagegen besser geeignet als PEG-Proben. Das äußerte sich darin, dass die Konzentrationsunterschiede zwischen HNV und HAdV in PEG-Proben bis zu 2 Log₁₀-Stufen betragen (Abb. 39), die in den Direktproben jedoch nur etwa 0,6 Log₁₀-Stufen (Abb. 23).

Die Methode der Virusaufkonzentrierung scheint somit - je nach Virus - einen großen Einfluss auf das Ergebnis der Viruskonzentrationen zu haben bzw. beeinflusst das Verhältnis verschiedener Viren zueinander. Ermittelte Viruskonzentrationen sollten deswegen immer zusammen mit der verwendeten Aufkonzentrierungsmethode angegeben werden, um verschiedene Studien besser miteinander vergleichen zu können.

Der Nachweis von Viren in Direktproben bzw. aufkonzentrierten Wasserproben geht auch stets mit Vor- und Nachteilen der jeweiligen Methode einher. Bei der Analyse von Direktproben kann es gegebenenfalls zu Unter- oder Überschätzungen der Viruskonzentrationen kommen, da in der PCR stets kleine Volumen an Nukleinsäure (5-10 µl) eingesetzt werden. Jedoch besteht bei diesen direkt getesteten Proben im Vergleich zu den aufkonzentrierten Proben nicht die Gefahr, neben Viren auch andere inhibitorische Substanzen aufzukonzentrieren. Inhibitoren können besonders molekularbiologische Nachweisverfahren, wie die PCR-Methode, beeinträchtigen (Bosch, 1998). Speziell der in der GW-Filtration und PEG-Fällung verwendete Fleischextrakt-Puffer könnte zur Inhibition der PCR führen (Fong und Lipp, 2005). Zudem wird bei dem Verfahren der GW-Filtration der pH-Wert der Probe mehrfach verändert, um die Aufkonzentrierung der Viren zu ermöglichen. Bei der UZ-Methode hingegen sind die Proben keinen weiteren Behandlungsschritten, wie pH-Veränderungen oder Chemikalien, ausgesetzt. Da die Viren dazu neigen, an Schwebstoffe zu binden (Jin and Flury 2002), werden während der UZ die Schwebstoffe in den Zulaufproben zusammen mit den daran gebundenen Viren pelletiert. Das UZ-Verfahren besteht lediglich aus zwei Prozessschritten und ist deshalb nicht sehr anfällig für Störungen. Dies spiegelt sich auch in der zuverlässigen Detektion von HEV, CoSV, HAdV und HNV in Kläranlagenzulaufproben, die via UZ aufkonzentriert wurden, wider.

4.3 Bestimmung der Konzentrationen von HEV und CoSV in Abwässern

4.3.1 Viruskonzentrationen in Kläranlagenzuläufen

Zunächst wurde ungeklärtes Abwasser einer Berliner Kläranlage monatlich über ein Jahr beprobt, um das Vorkommen von HEV und CoSV zu untersuchen. Der Mittelwert der HEV-Konzentrationen in Kläranlagenzulaufproben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, lag im Jahresverlauf von März 2018 bis Februar 2019 bei ca. 4×10^3 Kopien/100 ml (Abb. 22). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer spanischen Studie veröffentlicht (Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010), wobei in Kläranlagenzulaufproben durchschnittliche HEV-Konzentrationen von 3×10^3 Kopien/100 ml nachgewiesen wurden. In Schweden wurde in einer ungeklärten Abwasserprobe ebenfalls eine ähnliche Konzentration von 5×10^3 HEV-Kopien/100 ml detektiert. In beiden Studien wurden die Abwasserproben ebenfalls mittels UZ aufkonzentriert. Bei den schwedischen Versuchen wurden die Proben vor der UZ noch zusätzlich durch eine Adsorption-Elution-Methode mit NanoCeram-Filtern aufkonzentriert (Wang *et al.*, 2018A).

Im Jahresverlauf lag die durchschnittliche HEV-Konzentration in Direktproben der Kläranlage Ruhleben mit 2×10^4 Kopien/100 ml etwas höher als in den UZ-Proben. Die höchste monatliche Konzentration wurde im Juni 2018 mit 2×10^5 HEV-Kopien/100 ml detektiert. Diese Größenordnung und auch noch höhere HEV-Konzentrationen wurden auch in italienischen Abwasseruntersuchungen ermittelt, wobei dort in Direktproben 6×10^4 Kopien/100 ml bis 6×10^7 Kopien/100 ml nachgewiesen wurden (Di Profio *et al.*, 2019).

Im Vergleich zu den hohen HEV-Detektionsraten in Direktproben (92 %) und UZ-Proben (100 %) im Jahresverlauf wiesen die mittels PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben für HEV eine vergleichsweise geringe Detektionsrate von 25 % auf (Abb. 22). In nur drei von zwölf monatlich getesteten Zulaufproben konnten HEV-Konzentrationen von 7×10^1 Kopien/100 ml bis 3×10^3 Kopien/100 ml detektiert werden. Vergleichbare Studien mit Kläranlagenzulaufproben, in denen Viren mittels PEG-Fällung aufkonzentriert wurde, ergaben ähnliche HEV-Konzentrationen und Detektionsraten. So wurden Konzentrationen von 1×10^2 HEV-Kopien/100 ml bis 6×10^4 HEV-Kopien/100 ml bestimmt sowie in 22 % bzw. 32 % der Proben HEV nachgewiesen (Masclaux *et al.*, 2013; Miura *et al.* 2016; Iaconelli *et al.*, 2020). Im Vergleich zur PEG-Fällung eigneten sich somit Direktproben und mit UZ aufkonzentrierte Proben besser, um die Hepatitisviren im Abwasser nachzuweisen.

Für das HEV-Vorkommen konnte in der vorliegenden Arbeit kein klarer Saisoneffekt beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Bericht von Ram *et al.* (2016) aus Israel überein. Im Gegensatz dazu wurde HEV RNA in der Schweizer Studie von Masclaux *et al.* (2013) verstärkt im Sommer detektiert. Dort wurde je eine Probe im Sommer und eine im Winter von 31 verschiedene Kläranlagen untersucht. Die Einzugsgebiete dieser Kläranlagen waren, im Verhältnis gesehen, mit unter 50.000 Einwohnern eher klein. Die in dieser Arbeit monatlich über ein Jahr untersuchte Kläranlage war mit einem Einzugsgebiet von etwa 1,1 Millionen Menschen deutlich größer [Internetquelle 11]. Die in der Studie von Ram *et al.* (2016) beprobten 36 Kläranlagen reinigten im Durchschnitt das Abwasser von einer halben Million Einwohner und waren somit auch deutlich größer als die untersuchten Schweizer Kläranlagen. Die Berliner Kläranlage Ruhleben und die israelischen Kläranlagen waren also größer und es wurden mehrere Proben je Jahreszeit untersucht. Beides kann dazu beitragen, dass sich saisonale Unterschiede der verschiedenen Infektionswege (kontaminiertes Wasser, Fleischkonsum, Reiserückkehrer) eher ausgleichen können, da mehr Einwohner das HEV-Vorkommen beeinflussen. Hepatitis-E-Viren scheinen daher keine eindeutige Saisonalität aufzuweisen.

Die Konzentration an HEV RNA in Direktproben wurde mit den Konzentrationen von vier anderen Indikatorviren für fäkale Verunreinigung im Jahresverlauf verglichen (Abb. 23). Dabei zeigte sich, dass

somatische Coliphagen in dem untersuchten Jahr die höchsten Konzentrationen mit durchschnittlich 5×10^6 pfu/100 ml aufwiesen. Ähnliche hohe Konzentrationen konnten auch von humanen Adenoviren detektiert werden mit durchschnittlich 1×10^6 Kopien/100 ml, gefolgt von humanen Noroviren mit 4×10^5 Kopien/100 ml im Jahresverlauf. Der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen an F+-spezifischen RNA-Phagen betrug 9×10^4 pfu/100 ml. Diese Phagen vermehren sich in der Umwelt kaum und sind gegenüber Wärme und Gärungsprozessen im Vergleich zu somatischen Coliphagen weniger resistent (Sidhu und Toze, 2009). HEV wiesen mit durchschnittlich 2×10^4 Kopien/100 ml die geringsten Konzentrationen im Vergleich zu den anderen gemessenen Indikatorviren auf.

Dieselben Abwasserproben, in denen das Vorkommen von HEV RNA quantifiziert wurde, wurden ebenfalls monatlich über einen ganzen Jahresverlauf auf CoSV RNA getestet (Abb. 38). In 83 % der Kläranlagenzulaufproben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, konnten CoSV nachgewiesen werden. Es wurden CoSV-Konzentrationen von 3×10^2 Kopien/100 ml bis 2×10^3 Kopien/100 ml gemessen, der Mittelwert lag bei 9×10^2 Kopien/100 ml. In den via PEG-Fällung aufkonzentrierten Abwasserproben wurden 4×10^1 Kopien/100 ml bis 2×10^3 Kopien/100 ml gemessen, wobei die durchschnittliche CoSV-Konzentration bei 7×10^2 Kopien/100 ml lag. Der Mittelwert war somit etwas geringer als jener der UZ-Proben. Im Gegensatz zu den untersuchten Hepatitisviren, für die die Aufkonzentrierung mittels PEG-Fällung nicht sehr gut funktioniert hatte, wurde mit derselben Methode für CoSV eine Detektionsrate von 100 % erreicht, was diese Aufkonzentrierungsmethode für CoSV als sehr zuverlässig bestätigt.

Bislang gibt es nur wenig Studien, in denen das Vorkommen von CoSV in Kläranlagenzulaufproben quantifiziert wurde. In Japan wurden CoSV in 71 % der ungereinigten Abwasserproben detektiert. Dort wurden, im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, bis zu 2 Log_{10} -Stufen höhere CoSV-Konzentrationen von 4×10^3 Kopien/100 ml bis 3×10^5 Kopien/100 ml gemessen (Haramoto und Otagiri, 2014). In den USA wurden dagegen ähnliche CoSV-Konzentrationen wie in der Berliner Kläranlage detektiert, aber auch teilweise etwas höhere Konzentrationen von bis zu 3×10^4 Kopien/100 ml nachgewiesen (Kitajima *et al.*, 2015). In beiden Studien wurden negativ geladene Membranen, teils zusammen mit Ultrafiltration, zur Aufkonzentrierung verwendet. Da die Abwasserproben in meiner Arbeit jedoch via UZ und PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, sind die absoluten Konzentrationen der CoSV nur bedingt miteinander vergleichbar. Das in den Berliner Abwasserproben nachgewiesene CoSV-Vorkommen ist dennoch plausibel, da CoSV in den Studien aus Japan und den USA sogar noch häufiger und in höheren Konzentrationen in Abwasserproben detektiert wurden. Da CoSV bislang noch wenig erforscht sind und in der klinischen Diagnostik eine sehr geringe Rolle spielen, könnte die auf klinischen Daten beruhende CoSV-Prävalenz in der deutschen Bevölkerung unterschätzt werden.

Ein saisonales Auftreten der CoSV konnte nicht festgestellt werden. Demgegenüber wurde in einem Bericht von Haramoto und Otagiri (2014) ein höherer Anteil von CoSV-positiven Proben im Winter beobachtet. Die untersuchte japanische Kläranlage befindet sich in einer Stadt mit ca. 200.000 Einwohnern und ist somit deutlich kleiner als die in dieser Arbeit beprobte Berliner Kläranlage, in deren Einzugsgebiet ca. 1,1 Millionen Menschen leben. Wie bereits oben erwähnt, kann das saisonale Vorkommen von Viren durch die Größe der Kläranlage und die somit von mehr Menschen erfassten unterschiedlichen Infektionswege beeinflusst werden. Cosaviren zeigen insgesamt kein eindeutiges saisonales Vorkommen.

Die detektierten CoSV-Konzentrationen wurde mit den Konzentrationen von HEV, HAdV und HNV in Abwasserproben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, verglichen (Abb. 40). In dem beprobten Jahr wurden HAdV mit durchschnittlich 2×10^5 Kopien/100 ml von den vier untersuchten humanpathogenen Viren am häufigsten detektiert. Mit 3×10^4 Kopien/100 ml war der Mittelwerte der gemessenen HNV-Konzentrationen ca. 1 Log_{10} -Stufe geringer. Die durchschnittliche Konzentration von HEV war

wiederum knapp eine 1 Log₁₀-Stufe geringer und lag bei 4x10³ Kopien/100 ml. Der Mittelwert der CoSV-Konzentrationen war um 0,5 Log₁₀-Stufen geringer im Vergleich zu den HEV und lag bei 9x10² Kopien/100 ml. Die Mittelwerte der Konzentrationen von HEV, HAdV und HNV in Direktproben lagen im Durchschnitt um ca. 1 Log₁₀-Stufe höher im Vergleich zu den UZ-Proben im Jahresverlauf. Das könnte darauf hindeuten, dass die Viruskonzentrationen in den Direktproben überschätzt bzw. in den UZ-Proben unterschätzt werden könnten.

Anhand der Viruskonzentrationen im Abwasser können kaum exakte Rückschlüsse auf die in der Bevölkerung infizierten Individuen gezogen werden. Mehrere variable Faktoren beeinflussen die gemessenen HEV- und CoSV-Konzentrationen in den Kläranlagenzuläufen. Zum einen variiert die Menge der mit dem Kot ausgeschiedenen Viren zwischen verschiedenen Personen und die detektierten HEV und CoSV könnten ebenfalls von infizierten Tieren stammen. Die täglich in der Kläranlage gereinigte Abwassermenge kann zum anderen nicht eindeutig auf eine Einwohnerzahl bezogen werden, da sich tagsüber viele Pendler in der Stadt befinden und das Abwasser zudem auch Industrie- und Regenwasser beinhaltet. Außerdem gelangen je nach Tageszeit unterschiedlich große Abwassermengen zur Kläranlage, was ebenfalls Einfluss auf die Viruskonzentrationen nimmt. Generell deutet das kontinuierliche Vorhandensein von HEV und CoSV in den ungeklärten Abwasserproben jedoch darauf hin, dass in der deutschen Bevölkerung ein aktives Infektionsgeschehen dieser beiden zoonotischen RNA-Viren angenommen werden kann.

4.3.2 Reinigungsleistung der Kläranlagen bezogen auf Viren

Um die Reinigungsleistung innerhalb der Kläranlage Ruhleben zu untersuchen, wurden die Viruskonzentrationen in den Zulauf- und Ablaufproben über ein ganzes Jahr verglichen. In Direktproben war die HEV-Konzentration in den Ablaufproben im Durchschnitt ca. 1 Log₁₀-Stufe geringer als in den Zulaufproben (Abb. 24). Wenn die Bestimmungsgrenze auf das 10-fache der NWG (2x10³ Kopien/100 ml) gesetzt wird, weil die gemessenen Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze eine noch höhere Genauigkeit besitzen, waren 10 von 12 monatlichen Zulaufproben und nur 2 Ablaufproben HEV RNA positiv. Das bestätigt, dass die Reinigungsleistung innerhalb der Kläranlage mindestens eine Zehnerpotenz (1 Log₁₀-Stufe) betrug. In den mittels UZ aufkonzentrierten Kläranlagenablaufproben wurden nur im Monat Juni 2018 HEV detektiert, alle anderen monatlichen Ablaufproben waren HEV RNA negativ. Die durchschnittliche HEV-Konzentration in den Zulaufproben lag bei 4x10³ Kopien/100 ml und die NWG der UZ-Proben entspricht 6 Kopien/100 ml. Basierend auf der UZ-Methode kann somit von einer HEV-Reduktion von bis zu 3 Log₁₀-Stufen innerhalb der Kläranlage ausgegangen werden (Abb. 41). Bei Abwasseruntersuchungen auf einer französischen Insel konnte eine HEV Reduktion von 1 Log₁₀-Stufe beim Vergleich der Zulaufproben mit den bis unter die NWG reduzierten Ablaufproben festgestellt werden (Miura *et al.*, 2016). Auch in anderen Studien konnten HEV in Kläranlagenablaufproben nicht mehr nachgewiesen werden und wurden somit innerhalb der Kläranlagen bis unter die Bestimmungsgrenze reduziert (Masclaux *et al.*, 2013; Myrmel *et al.*, 2015). Die durchschnittliche Reduktion von Viren in Kläranlagen liegt im Bereich von 2 Log₁₀-Stufen (Selinka *et al.*, 2020; Fong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018 A). Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dies auch für die untersuchten Hepatitis-E-Viren durchschnittlich der Fall ist.

Cosaviren konnten in keiner Ablaufprobe der Berliner Kläranlagen nachgewiesen werden. Werden die Konzentrationen in den Zulaufproben (UZ- und PEG-Proben) mit den bis unter die NWG reduzierten Ablaufproben verglichen, kann innerhalb der Kläranlage Ruhleben eine CoSV-Reduktion von ebenfalls ca. 2 Log₁₀-Stufen angenommen werden. Auch in zwei anderen Studien wurden in Kläranlagenablaufproben um ca. 2 Log₁₀-Stufen reduzierte CoSV-Konzentrationen im Vergleich zu den

Zulaufproben nachgewiesen. In diesen Untersuchungen konnten CoSV noch in 29 % bzw. 17 % der Ablaufproben quantifiziert werden (Haramoto und Otagiri, 2014; Kitajima *et al.*, 2015).

Die Konzentration der HAdV und HNV wurden ebenfalls jeweils um ca. 2 Log₁₀-Stufen in der Kläranlage Ruhleben reduziert beim Vergleich der Zulauf- mit den Ablaufproben (Abb. 41). Die detektierten Konzentrationen und die Reduktionen an HAdV und HNV innerhalb der Berliner Kläranlage stimmen daher durchaus mit anderen Studien überein (Laverick *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018 A; Selinka *et al.*, 2020).

4.3.3 Effekt der UV-Behandlung auf Kläranlagenabläufe

In den Sommermonaten von April bis September findet in der Kläranlage Ruhleben eine zusätzliche UV-Desinfektion der Kläranlagenabläufe statt, da diese in den Fluss Havel fließen, der im Bereich der Unterhavel auch Badegewässer aufweist. Die Qualität der Oberflächengewässer soll auf diese Weise während der Badesaison sichergestellt werden.

In Abwasserproben, die mit UV-Licht (1100 J/m²) bestrahlt wurden, konnten in Lebendnachweisverfahren keine somatischen Coliphagen und F+-spezifischen RNA-Phagen mehr nachgewiesen werden. Anhand der bis unter die NWG reduzierten Phagenkonzentrationen konnte bestätigt werden, dass die Nukleinsäuren durch die UV-Desinfektion so beschädigt wurden, dass die Phagen nicht mehr lebensfähig waren. Innerhalb der Kläranlage Ruhleben wurde die Konzentration an lebensfähigen F+-Phagen somit um insgesamt 4 Log₁₀-Stufen und die der somatischen Phagen um 5,5 Log₁₀-Stufen reduziert. In einer Studie aus Berlin (Gnirss *et al.*, 2015) und einer weiteren aus Bochum (Leifels *et al.*, 2015) waren nach Bestrahlung mit UV-C-Licht ebenfalls keine infektiösen somatischen Coliphagen mehr nachweisbar. Die Phagen wurden mit demselben Lebendnachweisverfahren wie in der vorliegenden Arbeit bestimmt.

Die Reduktionen an HEV, HAdV und HNV wurden mittels qPCR überprüft. Die Kläranlagenablaufproben nach UV-Behandlung zeigten teils Reduktionen und teils leichte Erhöhungen der HEV RNA Konzentrationen im Vergleich zu den Ablaufproben ohne zusätzliche UV-Desinfektion (Tab. 8). Ähnliche Resultate konnten auch für HAdV und HNV beobachtet werden (Abb. 25). Diese Ergebnisse sind jedoch erklärbar: Zum einen wurden in der qPCR kleine Volumen von 10 µl Nukleinsäureprobe je Reaktionsansatz eingesetzt. Zum anderen waren die gemessenen Viruskonzentrationen gering und befanden sich im Bereich der Bestimmungsgrenze. Beides kann zu deutlichen Schwankungen der gemessenen Konzentrationen führen. In einer anderen Studie wurden ebenfalls teils erhöhte und teils verringerte HAdV-Konzentrationen beim Vergleich von Abwasserproben mit und ohne UV-Behandlung detektiert (Leifels *et al.*, 2019).

Des Weiteren zerstören die UV-C-Strahlen in den Nukleinsäuren die Doppelbindungen der Pyrimidinringe. Dadurch verbinden sich hauptsächlich benachbarte Thyminen zu Dimeren, seltener auch Thyminen und Cytosinen. Nukleinsäuren mit enthaltenen Dimeren können nicht mehr amplifiziert werden (Ravanat *et al.*, 2001). Die Nukleinsäure wird jedoch während der UV-Bestrahlung nicht komplett modifiziert, es wird auch Abschnitte geben, in denen sich keine Thymindimere gebildet haben. Je größer die PCR-Amplifikate sind, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, die Schädigung in der qPCR nachzuweisen (Ho, 2017). In dieser Arbeit wurden zur Detektion der Viren recht kurze Genomabschnitte amplifiziert: für HEV waren es 70 bp, für HNV 94 bp und für HAdV 69 bp. Es könnte deswegen möglicherweise die Gefahr bestehen, dass die vervielfältigten Bereiche keine Dimere enthielten und nach der UV-Bestrahlung amplifiziert werden konnten und es so zu keiner deutlichen Reduktion kam, obwohl die Viren generell inaktiviert waren. Ähnliche Ergebnisse gehen auch aus einer anderen Studie hervor, in der verschiedene Viren mit UV-Licht bestrahlt wurden und die Reduktionen

mittels qPCR bestimmt wurden. Dort konnte bei HAdV, MNV, Polioviren und Rotaviren keine Reduktion nach der UV-Desinfektion beobachtet werden (Leifels *et al.*, 2015).

Die klassische qPCR mit Amplifikationen kurzer Genbereiche stellt im Gegensatz zum Lebendnachweisverfahren keine geeignete Methode dar, um inaktivierte Viren nach einer UV-Desinfektion zu bestimmen. Übereinstimmende Resultate sind im FLUSSHYGIENE Abschlussbericht beschrieben (Selinka *et al.*, 2020). Eine Ausnahme könnte hierbei die *long amplicon* qPCR darstellen, die längere Genfragmente amplifiziert (Ho, 2017). Da molekularbiologische Methoden in diesem Zusammenhang einen Nachteil zeigen, ist es geeigneter, die Effizienz der UV-Inaktivierung mit Bakterien-spezifischen Indikatorviren (Bakteriophagen) zu überprüfen. Diese können in Plaqueassays auf ihre Infektiosität vor und nach UV-Behandlungen getestet werden.

4.3.4 PMA-qPCR zur Testung der Lebensfähigkeit von Viren

Ein molekularbiologisches Verfahren, das einen Hinweis auf die Lebensfähigkeit von Viren geben kann, ist die PMA-qPCR. Der interkalierende Farbstoff dringt in beschädigte Viruskapside ein, bindet an die Nukleinsäure und verhindert so die Amplifikation. Intakte und somit potenziell infektiöse Kapside wiederum sind PMA-unempfindlich. Die PMA-qPCR kann jedoch nicht nach UV-Desinfektionen angewendet werden, weil dabei zwar die Nukleinsäuren modifiziert werden, die Kapside aber intakt bleiben (Leifels *et al.*, 2015 und 2019). Die Versuche mit PMA zur Unterscheidung von defekten und intakten HEV- und CoSV-Kapsiden wurden mit Kläranlagenzulaufproben durchgeführt, um die Lebensfähigkeit der Viren im Abwasser zu untersuchen.

Bisher gibt es wenig Informationen zur Unterscheidung von intakten und defekten HEV-Partikeln mit der PMA-RT-qPCR-Methode. In einem Report von Randazzo *et al.* (2018) wurde Platin(IV)-chlorid (PtCl_4) zur Unterscheidung verwendet. Platin bildet Chelatkomplexe in der Nukleinsäure, wobei die Basen die Liganden bilden (Soejima und Iwatsuki, 2016). In den Experimenten wurden fäkale Proben mit Hitze behandelt und mit PtCl_4 inkubiert, die resultierende HEV RNA-Reduktion betrug 2,8 Log_{10} -Stufen. Nach der Bindung von PMA oder PtCl_4 an freie HEV RNA wurden dort außerdem drei verschiedene Primersysteme zur Detektion von HEV getestet. Auch die in dieser Arbeit genutzten Primer und Sonde von Jothikumar *et al.* (2006) wurden verwendet und erzielten bessere Detektionsergebnisse in Kombination mit PtCl_4 . Da PtCl_4 jedoch gesundheitsgefährlich ist, kann keine routinemäßige Verwendung dieser Methode erfolgen (Leifels *et al.*, 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die interkalierende Substanz PMA verwendet. Dieser Farbstoff wurde dem Farbstoff Ethidiumbromidmonoazid (EMA) vorgezogen, da EMA in vorherigen Studien auch intakte Viren beeinflusst hat und dies zu falsch negativen Ergebnissen führte (Leifels *et al.*, 2019). Als PMA-Endkonzentration wurden 50 μM pro Ansatz eingesetzt - was ausreichend ist, um mit allen zugänglichen Nukleinsäuren zu interkalieren - aber nicht zu hoch ist, dass PMA in intakte Viren eindringt (Coudray-Meunier *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2015).

In einem Vorversuch wurde die Anwendbarkeit der PMA-qPCR mit gespikten HAdV-2 (stammend aus Zellkulturüberständen) getestet, welche durch Hitze inaktiviert wurden. Die Konzentrationen an HAdV vor und nach der Hitzeinaktivierung waren ohne zusätzliche PMA-Zugabe ungefähr gleich, da durch die Wärme zwar die Kapside denaturiert werden, die DNA jedoch vorhanden bleibt. Dies wurde auch in den Versuchen von Leifels *et al.* (2019) bestätigt, wobei keine signifikante Reduktion der HAdV-Konzentration nach Hitzeinaktivierung (95 °C, 10 min) oder auch Chlorbehandlung mittels qPCR detektiert werden konnte. Nach Zugabe von PMA zu den durch Hitze denaturierten HAdV reduzierte sich die Viruskonzentration maximal um 2 Log_{10} -Stufen, auch wenn die Temperatur zur Virusinaktivierung, die HAdV-Ausgangskonzentration oder die PMA-Endkonzentration erhöht wurde (Abb. 26). Ähnliche Ergebnisse gehen aus der Studie von Leifels *et al.* (2019) hervor und liefern eine

mögliche Erklärung für die maximale Reduktion von 2 Log₁₀-Stufen. In der Studie wurde die interessante Entdeckung gemacht, dass die Reduktion der HAdV-Konzentration nach Wärme- und PMA-Behandlung auch von dem genutzten Primersystem abhängt. Wenn zur Detektion der HAdV die Oligonukleotide von Hernroth *et al.* (2002) genutzt wurden (wie in der vorliegenden Arbeit), konnte eine Reduktion von etwas unter 2 Log₁₀-Stufen erzielt werden. Wurden jedoch die Primer und Sonde von Heim *et al.* (2003) verwendet, lag die Reduktion der hitzebehandelten HAdV bei ca. 4,3 Log₁₀-Stufen. Demzufolge könnte die maximale HAdV-Reduktion von 2 Log₁₀-Stufen in meinen Experimenten in Zusammenhang mit dem genutzten Primersystem stehen. Das Primersystem von Hernroth *et al.* (2002) amplifiziert kürzere PCR-Fragmente als das von Heim *et al.* (2003). Bei kürzeren Fragmenten steigt die Chance, dass Bereiche während der PCR vervielfältigt werden, in denen kein PMA gebunden hat, da der Farbstoff nicht überall gleichmäßig an die Nukleinsäure bindet. Das Verfahren der PMA-qPCR unter Verwendung des genutzten Primersystems eignete sich somit nur bedingt zur Unterscheidung von intakten und durch Hitze inaktivierten HAdV.

Generell werden Kapsid-Intaktheits-Tests oft unter Laborbedingungen durchgeführt und sind dann nur begrenzt mit Ergebnissen von Umweltproben vergleichbar. Beispielsweise besteht in Kläranlagenzulaufproben das Risiko einer unvollständigen Photoaktivierung von PMA durch Trübungseffekte der partikelreichen Proben (Heise *et al.*, 2016). Nach dem Vorversuch wurden HAdV nun in Umweltproben untersucht. Dabei wurde die Konzentration an intakten HAdV in Direktproben von Kläranlagenzuläufen durch die Zugabe von 50 µM PMA bestimmt. In den PMA-behandelten Proben konnte eine eindeutige aber relativ geringe durchschnittliche HAdV-Reduktion von 0,2 Log₁₀-Stufen ermittelt werden. Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf geben, dass ein Großteil der im Abwasser zirkulierenden HAdV intakte Kapside besaß. In Kläranlagenzulaufproben sollte ebenfalls die Konzentration an intakten HEV in Direktproben und intakten CoSV in PEG-Proben bestimmt werden. Jedoch konnte hier nach PMA-Zugabe keine Reduktion, wie bei den HAdV, beobachtet werden. Die gemessenen Konzentrationen nach PMA-Behandlung schwankten stark. Die PMA-RT-qPCR zur Unterscheidung von intakten und defekten HEV- und CoSV-Kapsiden funktionierte somit nicht wie geplant. Ähnliche Ergebnisse wurden in Untersuchungen von Fuster *et al.* (2016) berichtet, wobei die Konzentrationen an Hepatitis-A-Viren in Abwasserproben mit und ohne PMA-Zugabe ebenfalls schwankten.

Generell wurden schon einige Studien veröffentlicht, bei denen das Verfahren der PMA-RT-qPCR bei Viren mit RNA-Genomen funktionierte, jedoch gab es deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Viren (Kim und Ko, 2012; Leifels *et al.*, 2015). Eine mögliche Erklärung der unterschiedlich guten Eignung der PMA-Methode für verschiedene RNA-Viren lieferten dabei Parshionkar *et al.* (2010). Die verwendeten Primer müssen demnach an Regionen binden, die starke Sekundärstrukturen aufweisen, weil PMA dann besser kovalent an die RNA binden kann. Erneut bestätigt sich somit, dass die Wahl des Primersystems einen entscheidenden Einfluss auf das Funktionieren der PMA-RT-qPCR Methode zu haben scheint. Eventuell waren die verwendeten qPCR-Primer zur Detektion von HEV und CoSV in Kombination mit dem eingesetzten PMA nicht geeignet, um intakte von defekten Kapsiden in Umweltproben zu unterscheiden. Über die Infektiosität der HEV und CoSV in den Abwasserproben war daher keine eindeutige Aussage möglich.

Ob die Viren jedoch überhaupt in Gewässern nachweisbar sind, wo sie eine potenzielle Gesundheitsgefahr für die Bevölkerung bedeuten könnten, wurde in Proben von Berliner Oberflächengewässern getestet.

4.4 Bestimmung der Konzentrationen von HEV und CoSV in Oberflächengewässern

Proben des Flusses Spree wurden zum einen unter normalen Wetterbedingungen und auch nach Mischwasserüberläufen nach Starkregenereignissen untersucht. Der Fluss Havel mit der darin gelegenen Badestelle „Kleine Badewiese“ wurde ebenfalls beprobt (Überblick der Berliner Oberflächengewässer siehe Abb. 27). Zusätzlich zu den Berliner Gewässern, die umfangreichen Wasserqualitätskontrollen unterliegen, wurde auch eine stark fäkal belastete Oberflächengewässerprobe des indischen Flusses Yamuna aus der Umgebung von Neu-Delhi von 2007 untersucht.

In den Berliner Flüssen Spree und Havel konnten HEV-Fragmente mit qPCR-Analysen nachgewiesen werden (Tab. 9 und Abb. 28). Vier der insgesamt 21 Flussproben der Spree und 6 der 11 monatlich getesteten Flussproben der Havel unter normalen Wetterbedingungen waren HEV RNA positiv. Von diesen insgesamt 10 HEV-positiven Flussproben lag die HEV-Konzentration in 3 Proben über der Bestimmungsgrenze. Insgesamt ist die Spree weniger stark mit Viren belastet als die Havel. HEV kommen in der Spree seltener und in geringeren Konzentrationen vor, ebenso wie HAdV und somatische Phagen, welche die sensitivsten viralen Indikatoren darstellen (Selinka *et al.*, 2020). An den Probenahmestellen am Spreetunnel, der an den Müggelsee angrenzt, und an der Havel befinden sich Grünflächen und Wälder. In diesen könnten Wildschweine leben, da Berlin eine große Wildschweinpopulation besitzt. Die in den Flüssen detektierten HEV könnten deshalb auch von Ausscheidungen der Tiere stammen. Wildschweine können chronisch HEV-infiziert sein und scheiden die Viren dann über viele Monate in hohen Mengen mit dem Kot aus (Schlosser *et al.*, 2015).

Gegenüber den unter normalen Wetterbedingungen untersuchten Flussproben wurde die Spree ebenfalls nach drei Starkregenereignissen beprobt. In der Innenstadt von Berlin befinden sich Mischwasserkanäle, die Regenwasser zusammen mit ungeklärtem Abwasser in die Spree leiten, falls das Kapazitätsmaximum durch starke Regenfälle überschritten wird. Die Detektionsrate für HEV RNA in Flussproben der Spree stieg von 19 % unter normalen Wetterbedingungen auf 75 % nach Starkregenereignissen mit durchschnittlichen HEV-Konzentrationen von 3×10^3 Kopien/100 ml (Tab. 10).

Über das Vorkommen von HEV in deutschen Flüssen gibt es bisher wenig zuverlässige Informationen. Andere humanpathogene Viren wurden aber bereits in deutschen Flüssen nachgewiesen, wie z. B. durch Hamza *et al.* (2009) in Rhein und Ruhr sowie in den zwei BMBF-Projekten „Sichere Ruhr“ und „FLUSSHYGIENE“. Unter normalen Wetterbedingungen wurden in den Flüssen Rhein und Ruhr somatische Phagen und HAdV häufiger als HNV detektiert (Hamza *et al.*, 2009; Mackowiak *et al.*, 2018), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. In dem Fluss Ruhr wurden nach starken Regenfällen vor allem erhöhte Konzentrationen an *Escherichia coli* (*E. coli*) und Intestinalen Enterokokken nachgewiesen (Schoenemann und Jardin, 2015). Da sich Phagen und andere Viren nach Mischwasserüberläufen durch ihre hohe Überlebensfähigkeit länger in Fließgewässern nachweisen lassen, stellen sie wie Bakterien ebenfalls geeignete Indikatoren für kurzzeitige Verschmutzungen dar. Im Projekt FLUSSHYGIENE wurden nach Starkregenereignissen in der Spree deutlich erhöhte Konzentrationen an HAdV und HNV über mehrere Tage detektiert, da dieser Fluss ein langsam fließendes Gewässer ist (Selinka *et al.*, 2020). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse belegen, dass humanpathogene Viren in deutsche Flüsse gelangen und diese somit potenziell kontaminieren können. Sedimente und Biofilme wurden außerdem als mögliche Reservoirs der Viren in Flüssen identifiziert (Mackowiak *et al.*, 2018). Auch HEV RNA konnte

in 5 von 17 Sedimentproben der Havel-Badestelle „Kleine Badewiese“ nachgewiesen werden, allerdings vorwiegend außerhalb der Badesaison.

Es gibt kaum Daten zum HEV-Vorkommen nach MWÜ-Ereignissen. Unter normalen Wetterbedingungen wurden HEV jedoch in mehreren europäischen Flüssen nachgewiesen. Der Großteil der untersuchten Flussproben wurde mittels *nested*-RT-PCR analysiert. Dabei ergaben sich teils geringe HEV-Detektionsraten in Flussproben von ca. 3 % in Slowenien und Italien (Steyer *et al.*, 2011; Iaconelli *et al.* 2017), aber auch höhere Raten von 17 % bis 25 % in den Niederlanden und Italien (Rutjes *et al.*, 2009; Idolo *et al.* 2013). Die Konzentrationen an HEV in Flussproben wurde in einer weiteren portugiesischen Studie via RT-qPCR quantifiziert. Dafür wurden 122 L bis 900 L Flusswasser in drei Schritten auf 1 ml aufkonzentriert. Insgesamt waren 88 % der Proben des Flusses positiv für HEV RNA. Durch das große Probenvolumen konnten auch geringe HEV-Konzentrationen von 2 Kopien/L nachgewiesen und als HEV-positiv gewertet werden (Salvador *et al.*, 2020). In den portugiesischen Flussproben wurden HEV-Konzentrationen bis zu 7×10^2 Kopien/100 ml gemessen. Der Wert ist mit den in dieser Arbeit gemessenen geringen HEV-Konzentrationen in Flussproben der Spree vergleichbar.

Um die Wasserqualität, vor allem in der Badesaison, sicherzustellen, wird in der Kläranlage Ruhleben in Berlin in den Sommermonaten von April bis September ein Umleitsystem eingesetzt. In der Unterhavel befinden sich mehrere offizielle Badestellen. Diese könnten potenziell durch vorbelastete Zuflüsse der Spree und Oberhavel mit Regenwassereinleitungen, Klärwerkeinleitungen und MWÜ verschmutzt werden [Internetquelle 12]. Um mikrobiologische Verunreinigungen durch Einleitungen von Kläranlagenabläufen im Sommer zu minimieren, wird ein Drittel der gereinigten Abwassermenge der Kläranlage Ruhleben unterirdisch in den Teltowkanal geleitet [Internetquelle 13]. So gelangt weniger geklärtes Abwasser in den Ruhlebener Altarm der Spree, der wiederum in die Havel und dann in die Unterhavel fließt.

Um das Umleitsystem hinsichtlich des Vorkommens von HEV zu bewerten, wurde die Havel im Winter und im Sommer 4 km stromabwärts von der Einleitung des Kläranlagenablaufes beprobt. In den im Sommer genommenen Proben der Havel wurden keine geringeren Konzentrationen an HEV sowie an HAdV und somatischen Phagen detektiert im Vergleich zu den Wintermonaten (Abb. 28). Der relativ kleine Datensatz von 11 untersuchten Havelproben spiegelte die Umleitung des Ablaufs der Kläranlage in den Teltowkanal somit nicht deutlich wider, da eine gleichbleibende Virusbelastung der Havel im Sommer beobachtet wurde. Um das Umleitsystem in vollem Umfang für HEV bewerten zu können, wäre aber ein deutlich größerer Datensatz nötig. Das UBA führt jedoch seit mehreren Jahren Untersuchungen an der Havel durch (nicht publizierte Daten) und konnte im Rahmen des Projekts FLUSSHYGIENE deutlich geringere Konzentrationen in den Sommermonaten und dadurch das generelle Funktionieren des Umleitsystems für HAdV, HNV, Bakteriophagen sowie für Bakterien belegen (Selinka *et al.*, 2020). Offensichtlich stammen die im Sommer 2018 in der Havel detektierten HEV nicht gänzlich vom Ablauf der Kläranlage, sondern es liegen auch andere Eintragsquellen, wie Ausscheidungen von Wildschweinen, zugrunde. Außerdem befinden sich nahe der Probenahmestelle Kleingartenanlagen, die im Sommer dauerhaft bewohnt sind und von denen nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass ungereinigtes Abwasser in den Fluss gelangt. Viren setzen sich auch in den Sedimenten der Flüsse ab und können dort akkumulieren. Je nach Zusammensetzung des Sediments sind Viren dort gegen Inaktivierung besser geschützt als im freien Wasser und können von da auch in geringem Maße wieder ins Wasser freigesetzt werden (Chung und Sobsey, 1993; Mackowiak *et al.*, 2018). Im Sommer wird die Havel von vielen Schiffen passiert, was zur Aufwirbelung von Wasser und Sediment führen kann. Die Aufwirbelung der sedimentierten Viren aus den Wintermonaten an Stellen mit relativ geringen Wasservolumen könnte die gemessenen Konzentrationen von HEV, HAdV und somatischen Phagen im Sommer in der Havel erklären.

Die Badestelle „Kleine Badewiese“ an der Unterhavel wurde ebenfalls im Sommer und im Winter beprobt und auf verschiedene Viren untersucht. Der Effekt der Umleitung sollte auch dort überprüft werden wo Menschen baden gehen, weil er dort entscheidend ist. An der Badestelle konnten nur vereinzelt geringe HEV-Konzentrationen nachgewiesen werden. Lediglich im Wintermonat Februar 2019 konnte eine Konzentration an HEV im Bereich der Bestimmungsgrenze detektiert werden. Die gemessenen Konzentrationen an HAdV, somatischen- und F+-Phagen spiegelten deutlich wider, dass in den Wintermonaten, wenn der Ablauf der Kläranlage Ruhleben in die Havel eingeleitet wird, höhere Virusbelastungen an der Badestelle vorhanden waren (Tab. 11). In Proben, welche in den Sommermonaten der Badesaison genommen wurden, ließen sich die Indikatorviren nicht detektieren und der Effekt der Abwasserumleitung war sichtbar. Das bestätigt auch die Vermutung, dass die Kontaminationen in den Havelproben im Sommer nicht alle vom Ablauf der Kläranlage, sondern auch von anderen Quellen, stammten. Im Gegensatz zu der oben genannten Probenahmestelle der Havel an der Heerstraße ist der Fluss an der Badestelle KBW (Unterhavel) seeartig verbreitert. Eine Aufwirbelung des Sediments durch Schiffe direkt an der Badestelle ist unwahrscheinlich, da diese vor Schiffsverkehr geschützt ist [Internetquelle 12].

Der positive Effekt der Abwasserumleitung im Sommer, um die Badewasserqualität in der Unterhavel sicherzustellen, wird an der Badestelle KBW, auch hinsichtlich der Messungen an HEV-Konzentrationen, sichtbar.

Im Gegensatz zu den detektierbaren HEV konnten CoSV in Proben der Berliner Oberflächengewässer nicht nachgewiesen werden. Sie konnten jedoch in einer indischen Flussprobe (6×10^2 CoSV-Kopien/100 ml) detektiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass CoSV in Oberflächengewässerproben nachgewiesen werden können, wenn sie dort in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden sind. Interessanterweise wurde die Flussprobe aus dem Yamuna schon 2007 genommen und ist somit älter als die Studie von 2008, in der erstmals CoSV beschrieben wurden (Kapoor *et al.*, 2008). In zwei anderen Berichten konnten CoSV jedoch in noch älteren, gelagerten fäkalen Patientenproben aus Australien (1981) und den Niederlanden (1994) nachgewiesen werden (Holtz *et al.*, 2008; Cotten *et al.*, 2014). Diese Resultate sprechen dafür, dass CoSV-Infektionen zum Zeitpunkt der ersten Beschreibung geographisch schon weit verbreitet waren.

Nicht nur in der indischen Flussprobe, sondern auch in anderen Ländern wie Japan, Nepal und Frankreich, konnten CoSV in Oberflächengewässern nachgewiesen werden. So waren 29 % der Proben von einem japanischen Fluss, in den einige Kläranlagenabläufe eingeleitet werden, CoSV RNA positiv. Dabei wurden durchschnittliche Konzentrationen von 6×10^3 Kopien/100 ml der positiven Proben detektiert (Haramoto und Otagiri, 2014). In dem stark verschmutzten Fluss Bagmati in Nepal, in den ungeklärte Abwässer und andere Flüssigabfälle fließen, wurden sogar in 50 % der Proben CoSV-Konzentrationen von bis zu 5×10^5 Kopien/100 ml nachgewiesen (Tandukar *et al.*, 2018). In einer französischen Untersuchung wurden in dem Fluss Seine und dessen Nebenflüssen 21 % bzw. 12 % der Proben positiv auf CoSV RNA getestet mit geringen Konzentrationen von 10^1 CoSV-Kopien/100 ml (Prevost *et al.*, 2015). Je nach vorhandener Konzentration und genutztem Aufkonzentrierungsverfahren können Cosaviren demnach auch in Oberflächengewässern nachgewiesen werden.

4.5 Molekularbiologische Charakterisierung von HEV und CoSV in Umweltproben

Weil die verschiedenen Genotypen der HEV unterschiedliche gesundheitliche Gefahren bergen können, wurden die Abwasserproben in weiteren molekularbiologischen Untersuchungen analysiert, um die HEV-Genotypen zu bestimmen. Solche Untersuchungen erlauben außerdem, die im Abwasser detektierten Genotypen mit den in der Bevölkerung vorherrschenden HEV-Genotypen zu vergleichen.

In Europa ist der am häufigsten vorkommende Genotyp HEV-3 (Abb. 4; EFSA 2017). In einigen europäischen Ländern wie der Schweiz oder Spanien wurde der Genotyp HEV-1 vereinzelt identifiziert (Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010; Masclaux *et al.*, 2013). In Italien wurde HEV-1 sogar in einigen Studien häufiger als HEV-3 nachgewiesen (La Rosa *et al.*, 2010; Alfonsi *et al.*, 2018). Eine Infektion mit dem Genotyp HEV-1 ist besonders für schwangere Frauen gefährlich, weil dabei Mortalitätsraten von bis zu 30 % auftreten (Clemente-Casares *et al.*, 2016; RKI, 2015).

Von den mittels *nested*-RT-PCR untersuchten Berliner Kläranlagenzulaufproben konnten 15 HEV-Amplifikationsprodukte, was einer Rate von 9 % entspricht, sequenziert werden. Im Gegensatz zur RT-qPCR-Detektion müssen für die Genotypisierung in der *nested*-RT-PCR längere Fragmente amplifiziert werden. Dies könnte die geringere HEV-Detektionsrate im Vergleich zu den via RT-qPCR untersuchten Zulaufproben erklären (Tab. 7). Auch in der Veröffentlichung von Di Profio *et al.* (2019) zeigten sich in Proben von vier verschiedenen Kläranlagen jeweils deutlich geringere HEV-Detektionsraten im *nested*-RT-PCR-Verfahren gegenüber der RT-qPCR. Ähnliche Raten von 5 % bis 13,5 % an HEV positiven Zulaufproben, die via *nested*-PCR ermittelt wurden, berichteten auch andere Studien aus Italien und Spanien (Rusiñol *et al.*, 2015; Iaconelli *et al.*, 2017; Alfonsi *et al.*, 2018).

Für die Genotypisierung eigneten sich aufkonzentrierte Proben am besten. Von insgesamt 15 sequenzierten Amplikons stammten 13 von Proben, die durch UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden. Die isolierten Sequenzen wurden mit HEV-Referenzsequenzen verglichen, die von Smith *et al.* (2016B) empfohlen wurden. Da die verwendeten Primer in der ORF-1-Region des HEV-Genoms binden, wurden die Sequenzen in diesem Bereich miteinander verglichen, um die HEV-Genotypen zu bestimmen. Obwohl das verwendete *nested*-RT-PCR-Primersystem die RNA der vier weltweit dominierenden Genotypen HEV-1 bis HEV-4 amplifizieren kann (Johns *et al.*, 2010), wurden in den in dieser Arbeit untersuchten Umweltproben nur Viren des Genotyps HEV-3 detektiert.

Die in den Abbildungen 33 und 34 sowie in der Tabelle 13 gezeigten Daten belegen, dass am häufigsten der Subgenotyp HEV-3c im Abwasser detektiert wurde (Nachweis in 10 sequenzierten Proben). Zwei Proben enthielten den Genotyp HEV-3f. Von den drei Sequenzen, die nicht eindeutig subtypisiert werden konnten, gehörten zwei wahrscheinlich zum Subtyp HEV-3a und eine zu HEV-3c oder HEV-3i. Da der Genotyp 3 zoonotisch ist, konnte nicht zwischen einem menschlichen und einem tierischen Ursprung unterschieden werden.

Die in Berliner Umweltproben zirkulierenden HEV-Stämme wurden anschließend mit Sequenzen von HEV-infizierten Patienten (Wang *et al.*, 2018B) aus der gleichen Region verglichen (Beyer *et al.*, 2020). Wie in den Abwasserproben wurde auch in den Patienten eines Berliner Krankenhauses der Subgenotyp HEV-3c am häufigsten detektiert. Der in zwei Kläranlagenzulaufproben als eindeutig HEV-3f identifizierte Genotyp wurde ebenfalls in einem HEV-infizierten Patienten nachgewiesen. Der Großteil der HEV-Sequenzen aus den Abwässern und Patienten clusterte innerhalb der Subtypen HEV-3c und HEV-3f. Diese geringe genetische Distanz spricht dafür, dass sich die HEV-Stämme, die in der Umwelt und in Patienten zirkulieren, in ihrer Sequenz ähneln und sich womöglich gegenseitig

bedingen. Solch eine Korrelation zwischen im Abwasser nachgewiesenen Viren und klinischen Fällen wurde auch in Schweden und Russland gefunden (Hellmér *et al.*, 2014; Ivanova *et al.*, 2019).

Der in Berliner Abwasserproben vorherrschende Subgenotyp HEV-3c wurde auch in klinischen Proben aus Deutschland identifiziert. So wurde HEV-3c als der häufigste Genotyp in deutschen Blutspendern bestimmt (Vollmer *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde HEV-3c als Erreger im ersten deutschen klinischen Bericht einer akuten Hepatitis-E-Infektion während einer Schwangerschaft festgestellt (Tabatabai *et al.*, 2014).

Die meisten identifizierten HEV-Sequenzen stammten von Abwasserproben der innerstädtischen Kläranlage Ruhleben in Berlin, in deren Einzugsgebiet etwa 1,1 Millionen Menschen leben. Eine Sequenz mit dem Subgenotyp HEV-3c konnte auch aus einer Rohabwasserprobe der vorstädtischen Kläranlage Schönerlinde gewonnen werden. Direkt neben dieser Kläranlage befindet sich eine große Schweinemastanlage mit ca. 5600 Tieren [Internetquelle 14]. Die Zulaufproben der Kläranlage Schönerlinde wiesen jedoch keine höheren HEV-Detektionsraten im Vergleich zu den drei anderen Kläranlagen auf (Tab. 7). In allen Ablaufproben war jedoch HEV RNA in geringen Konzentrationen nachweisbar. Trotz des kleinen Datensatzes ist somit eine Tendenz von erhöhten HEV-Detektionsraten erkennbar, die möglicherweise auf das Abwasser der Schweinemastanlage zurückzuführen sind. Diese Daten korrelieren mit Berichten aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands, wobei in Schweineherden teilweise hohe HEV-Seroprävalenzen von 45 % nachgewiesen wurden (Dremsek *et al.*, 2013; Krumbholz *et al.*, 2013).

Auch in Schweinefleischprodukten lässt sich HEV RNA nachweisen. In 10 % der untersuchten Schweinefleischprodukte aus Deutschland konnte HEV RNA detektiert werden (Pallerla *et al.*, 2021). Interessanterweise wurden die Sequenzen überwiegend dem Subtyp HEV-3c zugeordnet und in einer Fleischprobe befand sich HEV-3f. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den im Abwasser identifizierten HEV-Subgenotypen überein.

HEV-Infektionen sind neben Hausschweinen auch in Wildschweinen mit ähnlich hohen Seroprävalenzen weit verbreitet (Schielke *et al.*, 2015; Weigand *et al.*, 2018). In dem Bundesland Brandenburg waren 2007 alle getesteten Wildschweine HEV RNA positiv (Adlhoch *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls zwei Forstreviere in Brandenburg in Zusammenarbeit mit dem BfR beprobt. Oberflächengewässerproben wurden dabei am UBA und Wildschweinleberproben am BfR auf HEV RNA untersucht. Insgesamt wurden in den Umweltproben sehr geringe HEV-Detektionsraten mit Konzentrationen knapp über der NWG ermittelt. Die HEV RNA negativ getesteten Wildschweinleberproben bestätigten, dass zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine akuten HEV-Infektionsgeschehen in den Wildschweinpopulationen der beiden Forstreviere vorherrschten.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Berlin die größte urbane Wildschweinpopulation Deutschlands beherbergt (Stillfried *et al.* 2017). In Wildschweinen aus Berlin und Potsdam wurden die Genotypen HEV-3c und HEV-3a nachgewiesen (Schielke *et al.* 2009), was wiederum mit den in meiner Arbeit detektierten Subgenotypen im Abwasser übereinstimmt. Dieser Bericht belegt außerdem eine sehr homologe Nukleotidsequenz zwischen einem HEV-Isolat aus einem Wildschwein und einem HEV-infizierten Patienten aus Deutschland.

Zusammenfassend ist in Deutschland der Subgenotyp HEV-3c vorherrschend, sowohl in der Umwelt als auch in Menschen und Tieren. Der Genotyp HEV-3f wurde in einem deutlich geringeren Anteil ebenfalls in Proben der Umwelt, in Patienten und Schweinefleischprodukten detektiert. Da in derselben Region die gleichen HEV-Stämme zirkulieren, kann angenommen werden, dass eine HEV-Übertragung von Hausschweinen oder Wildschweinen auf den Menschen erfolgen kann. Das könnte entweder durch den Konsum des Fleisches (Li *et al.*, 2005B; Wichmann *et al.*, 2008), den direkten

Kontakt zu den Tieren (Krumbholz *et al.*, 2014A), andere tierische Überträger wie Hunde (Schielke *et al.*, 2009) oder über eine indirekte Übertragung über Oberflächengewässer oder die Umwelt geschehen.

Von einer Genotypisierung der CoSV wurde in dieser Arbeit abgesehen, da einige am Umweltbundesamt verfügbare Abwasserproben im Rahmen eines Verbundprojektes mit dem Robert Koch-Institut zur Methodenentwicklung zum Nachweis von Polioviren im Abwasser auch auf CoSV getestet wurden (Schneider *et al.*, 2021). Mittels *nested*-RT-PCR (Kapoor *et al.*, 2008) wurden Zulaufproben der Kläranlagen Ruhleben von 2013 bis 2018, die mittels PEG-Fällung aufkonzentriert wurden, auf CoSV untersucht. Es waren 54 % der 46 getesteten Zulaufproben positiv für CoSV RNA. Die in diesem Projekt durchgeführten molekularbiologischen Genotypisierungen zeigten, dass Viren der Cosavirus Spezies A (n=27) am häufigsten identifiziert wurden, gefolgt von Spezies D (n=9) und Spezies B (n=2) (Schneider *et al.*, 2021). In drei untersuchten Kläranlagenzulaufproben aus dem Jahr 2018 von März bis Mai wurde jeweils die Spezies CoSV-A und im März und Mai zusätzlich die Spezies CoSV-D nachgewiesen. Diese drei Proben wurden ebenfalls mittels RT-qPCR positiv auf CoSV RNA getestet (Abb. 38). Demnach korrelieren die Ergebnisse der Genotypisierung via *nested*-PCR und die RT-qPCR-Nachweise.

Wie in den Berliner Abwasserproben war in Italien die Spezies CoSV-A vorherrschend, gefolgt von CoSV-D (Ferraro *et al.*, 2018). In der Patientenprobe aus den Niederlanden von 1994 konnte ebenfalls die Spezies CoSV-D identifiziert werden (Cotten *et al.*, 2014). In den USA verhält sich die Häufigkeit der CoSV-Spezies dagegen etwas anders, dort ist die Spezies CoSV-D dominierend, CoSV-A kommt hingegen seltener vor (Blinkova *et al.*, 2009; Kitajima *et al.*, 2015).

Mit CoSV-Infektionen werden akute schlaffe Lähmungen und Durchfall in Verbindung gebracht (Kapoor *et al.*, 2008; Holtz *et al.*, 2008). In der aktuellen Veröffentlichung von Schneider *et al.* (2021) wurde auch über das Vorkommen des Genotyps CoSV-D in Stuhlproben eines dreijährigen Kindes mit Polio-ähnlichen Lähmungserscheinungen, das in Deutschland hospitalisiert wurde, berichtet. Cosaviren könnten daher eine durchaus höhere medizinische Bedeutung haben, als dies bisher bekannt ist.

4.6 Risikobewertung von HEV- oder CoSV-Infektionen über die Umwelt

HEV-Infektionen können Leberentzündungen hervorrufen und im schlimmsten Fall zum Leberversagen führen. Um das Risiko einer HEV-Infektion über die Umwelt zu bewerten, sind die aufgenommene Wassermenge und die minimale Infektionsdosis von Bedeutung. Während Freizeitaktivitäten im Wasser mit wenig Kontakt zum Wasser selbst, wie dem Fahren von diversen kleinen Booten oder dem Stand-Up-Paddling, werden ca. 3-12 ml des Oberflächenwassers geschluckt (Dorevitch *et al.*, 2011). Pro Schwimmgang nehmen Kinder und Erwachsene hingegen bis zu 50 ml Wasser auf (Schets *et al.*, 2011). Problematisch dabei ist, dass bisher nicht eindeutig geklärt ist, wie viele Viruspartikel notwendig sind, um eine HEV-Infektion auszulösen. Es ist jedoch ein Fall aus Deutschland beschrieben, in dem ca. 7000 Internationale Einheiten HEV RNA über eine Bluttransfusion übertragen wurden und ausreichten, um einen immunsupprimierten Patienten chronisch mit HEV zu infizieren (Huzly *et al.*, 2014). Eine Internationale Einheit entspricht 2,25 HEV Kopien [Internetquelle 15]. Die infektiöse Dosis bei der Bluttransfusion lag somit bei ca. $1,6 \times 10^4$ HEV-Kopien. Daneben ist beispielsweise von humanpathogenen Noroviren bekannt, dass ca. 2×10^3 Viruspartikel notwendig sind, um bei 50 % der Menschen eine Infektion hervorzurufen (Atmar *et al.*, 2014).

In der Spree in Berlin wurden nur vereinzelt geringe HEV-Konzentrationen sowie geringe Konzentrationen an HAdV und HNV detektiert. Der Fluss ist sauber und es besteht kein Risiko einer HEV-Infektion.

Ganz anders sieht es nach Starkregenereignissen aus. Durch Mischwasserüberläufe kann die Spree zeitweise stark mit verschiedenen humanpathogenen Viren aus dem Abwasser belastet sein. Direkt nach starken Regenfällen sollten keine Freizeitaktivitäten in dem Fluss unternommen werden, da sonst das Risiko einer wasserbürtigen Infektion mit Viren, auch HEV, erhöht ist. Nach MWÜ in die Spree wurden durchschnittliche Konzentrationen an Noroviren von etwa 1×10^4 Kopien/100 ml nachgewiesen. Während eines Schwimmganges würden sich in 50 ml verschlucktem Oberflächenwasser theoretisch bis zu 5×10^3 HNV-Kopien befinden. Diese Menge könnte, basierend auf der Studie von Atmar *et al.* (2014), bei über 50 % der Menschen eine HNV-Infektion hervorrufen, die zu Magen-Darm-Entzündungen führen kann. Die durchschnittliche Konzentration an HAdV in den MWÜ-Proben war höher als die der HNV. Eine HAdV-Infektion durch das Verschlucken von mit Abwasser kontaminiertem Flusswasser erscheint somit nach Starkregenereignissen ebenfalls möglich und könnte bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem leichte Atemwegs- und Durchfallerkrankungen verursachen.

Die HEV RNA positiven MWÜ- und Havelproben wiesen Konzentrationen von durchschnittlich 3×10^3 HEV-Kopien/100 ml auf. Beim Baden könnten dann mutmaßlich $1,5 \times 10^3$ HEV-Partikel aufgenommen werden. Bei diesen Konzentrationen an HEV sind Infektionen relativ unwahrscheinlich, können aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Konzentration ist zwar deutlich geringer als die infektiöse Dosis von $1,6 \times 10^4$ HEV-Kopien, die während einer Bluttransfusion zu einer HEV-Infektion führte (Huzly *et al.*, 2014), aber HEV-Infektionen über die fäkal-orale Route könnten durchaus abweichende Infektionsdosen besitzen. In der Havel bzw. generell in Flüssen mit stellenweise dauerhaftem Schiffsverkehr könnten Schwimmgänge Risiken bergen, da in solchen Gewässern starke Verwirbelungen von sedimentieren Viren oder anderen Komponenten wie Schwermetallen eine gesundheitliche Gefährdung darstellen könnten. Der Nachweis von HEV RNA sagt jedoch noch nichts über deren Infektiosität aus und bislang wurde noch nicht gezeigt, dass im Sediment akkumulierte Viren infektiös bleiben.

Freizeitaktivitäten im Sommer in den Badegewässern der Unterhavel sind hingegen relativ unbedenklich. Aufgrund der geringen humanpathogenen Viruskonzentrationen besteht in den Sommermonaten kein erhöhtes Infektionsrisiko.

Generell sind Viren bei niedrigen Temperaturen stabiler. Die Inaktivierung von HEV erfolgt bei 4 °C deutlich langsamer als bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C. Auch in den getesteten Kläranlagenzulaufproben blieb die Konzentration an HEV RNA bei einer 4 °C Lagerung über mehrere Tage stabil (Abb. 19). Eine Hitzebehandlung für 2 min bei 70 °C inaktiviert HEV dagegen vollständig (Schielke *et al.*, 2011; Johne *et al.*, 2016).

Die gesundheitliche Gefahr, die nach einer HEV-Infektion besteht, ist außerdem vom HEV-Genotyp abhängig. Die in den Abwasserproben detektierten HEV wurden charakterisiert, um die in Berlin zirkulierenden Genotypen zu identifizieren. In allen Kläranlagenzulaufproben wurde der Genotyp HEV-3 detektiert. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass, falls intakte HEV Oberflächengewässer erreichen, sie auch diesem Genotyp zuzuordnen sind. Somit besteht keine erhöhte gesundheitliche Gefahr für Schwangere, die eher mit dem Genotyp HEV-1 einhergehen würde.

In Berliner Gewässern besteht vermutlich kein Risiko einer CoSV-Infektion durch Freizeitaktivitäten im Wasser, da die Viren dort nicht nachgewiesen werden konnten. CoSV wurden aber schon in anderen europäischen und asiatischen Oberflächengewässern nachgewiesen. Es könnte somit eine

Wahrscheinlichkeit bestehen, dass CoSV-Infektionen prinzipiell auch über den Umweltpfad möglich sind (Bibby *et al.*, 2019).

4.7 Resümee und Ausblick

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen der zoonotischen Hepatitis-E-Viren und Cosaviren in der Umwelt am Beispiel des Berliner Raums untersucht und somit Informationen zur Verbreitung dieser Viren in Deutschland erweitert. Außerdem stellte sich heraus, dass verschiedene Aufkonzentrierungsmethoden unterschiedlich gut geeignet waren, um HEV bzw CoSV nachzuweisen. Im Abwasser konnten HEV und CoSV detektiert werden, was für ein aktives Infektionsgeschehen dieser Viren in der deutschen Bevölkerung spricht. HEV wurden auch in Berliner Oberflächengewässern nachgewiesen, wo sie eine potenzielle Infektionsgefahr darstellen könnten. Insgesamt kamen HEV und CoSV meist in geringeren Konzentrationen als die anderen untersuchten Indikatorviren für fäkale Verunreinigungen vor. Alle im Abwasser identifizierten HEV gehörten dem Genotyp HEV-3 an und die Sequenzen korrelierten mit HEV-infizierten Patientendaten. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass in der Bevölkerung zirkulierende Infektionen mit Erregern, die fäkal ausgeschieden werden, über das Abwasser kontrolliert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten also wichtige Erkenntnisse zum Vorkommen von HEV in Abwässern und Oberflächengewässern gesammelt werden. Es konnte dabei jedoch nicht geklärt werden, ob die detektierten Viren von Menschen oder Tieren stammen. Um einen Hinweis auf den Ursprung der HEV zu erhalten, könnten die aktuell in Berliner Wildschweinen zirkulierenden HEV-Stämme untersucht werden. Solche Proben standen jedoch für die vorliegende Untersuchung nicht zur Verfügung. Die in Wildschweinen identifizierten HEV-Sequenzen könnten dann mit HEV-Isolaten aus Umweltproben und Patientenproben verglichen werden. Durch Sequenzanalysen kann dann ermittelt werden, ob die aus der Umwelt isolierten HEV näher mit Sequenzen von HEV-infizierten Patienten oder Wildschweinen verwandt sind. Dies ließe Rückschlüsse über den menschlichen oder tierischen Ursprung der HEV in der Umwelt zu.

Die in dieser Arbeit beschriebene Risikobewertung einer HEV-Infektion über die Umwelt basiert auf den ermittelten Viruskonzentrationen in den Oberflächengewässern. Das Vorhandensein der viralen genomischen RNA in den Wasserproben gibt jedoch wenig Hinweise auf die Infektiosität und die damit verbundene Übertragbarkeit der Viren auf den Menschen. Die Risikoabschätzung müsste deswegen durch Infektiosität-Tests ergänzt werden, um die gesundheitliche Gefährdung für die Bevölkerung präziser abschätzen zu können. Zur Bewertung der Infektiosität sind Zellkulturverfahren notwendig, mit denen HEV effizient vermehrt werden können. Bislang gelang dies nur in wenigen Fällen. Schemmerer *et al.* (2016) konnten einen spezifischen HEV-3c Stamm „47832c“ auf der subklonierten Zelllinie A549/D3 vervielfältigen. Mit diesem Zellkultursystem wurden bereits Versuche zur Temperaturbeständigkeit durchgeführt (Johns *et al.*, 2016). Die Limitierung bestand jedoch darin, dass lediglich dieser spezielle HEV-Stamm in der Zellkultur vermehrungsfähig war. HEV aus anderen Proben konnten nicht mit dieser Zelllinie vervielfältigt werden. In einer kürzlich erschienenen Studie wurden interessante Untersuchungen zur HEV-Infektiosität veröffentlicht. Die Zelllinie Vero 6, die von Nierenzellen der Grünen Meerkatze stammt, wurde dabei erstmals verwendet, um die Infektiosität von HEV aus Wasserproben zu analysieren. Durch das Auftreten von zytopathischen Effekten in den kultivierten Zellen wurde die Infektiosität der viralen Partikel beurteilt und durch die Detektion von HEV RNA via RT-qPCR bestätigt. Auf diese Weise konnten in mehreren Proben infektiöse HEV nachgewiesen werden (Salvador *et al.*, 2020). Mit der Kombination von Zellkultur- und PCR-Verfahren,

der sogenannten *integrated cell culture* PCR (ICC-PCR), könnte so in Zukunft womöglich die Infektiosität von HEV aus Umweltproben bewertet werden.

Da es in Deutschland bislang generell wenig Informationen zum Vorkommen von CoSV gibt, sollten neben der Umwelt auch Daten zur Verbreitung in Tieren und Menschen gesammelt werden. So wäre es interessant, auch Hauschweine und Wildschweine auf CoSV RNA zu testen, da die Viren in Asien bereits in Schweinen nachgewiesen wurden. Weiterhin sollten Patienten aus Deutschland, die unter Lähmungen oder Durchfall leiden, gegebenenfalls auch auf CoSV untersucht werden. CoSV-Sequenzdaten aus Tieren und Patienten könnten dann mit den in der Umwelt zirkulierenden CoSV-Spezies verglichen werden, um das konstante Vorkommen der Cosaviren in den Abwässern aufzuklären.

5 Anhang

Tabelle 17: Sequenzen der Standards zur Quantifizierung von HEV und CoSV während der RT-qPCR.

Standard	Sequenz
HEV 213 bp	CCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCGCGCCACCGGCCGGTCAGCCGTCTGGCCGTCGCCGTG GGCGGCGCAGCGGCCGGTGCCGGCGGTGGTTTCTGGGGTGACAGGGTTGATTCTCAGCCCT TCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTCGCCGCCGATGTCGTTTCACAACCCGGGG CTGGAACCTCGCCCTCGACAGCCGCCCCG
HEV 210 bp	TACTGCAAGGTCAGAGCTCTATCTGATGAAGTGTCGATGCAGATGCAATTCATGCGGTGGTT TCTGGGGTGACCGGGCTGATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTC GCCCCGATGTCACCGCTGCTATAGTAACTGGACCTTATGTTGTTAACATGCAAGACCACTCG ATCAGCTTAACGTGAAT
CoSV 229 bp	ATCTCAAGGTGATCAAGTCACTGGTGAATAGAGCGAAGGTTGAGGAGACCTGAGGAATTTCC ATGTGGCTTTGCCAGGAGTTGTAGCGATGCTGTGTGTGTGTGCGGATTTCCCCTCATGGCAAC ATGAGCCTCACAGGCCAAAAGCCCTGTCCGAAAGGACCCACACAGTGGAGCAACCCAGCTC CCTCCTACAAAGCTTTGTGAGAATGAACTCAAGTTTATTCTA

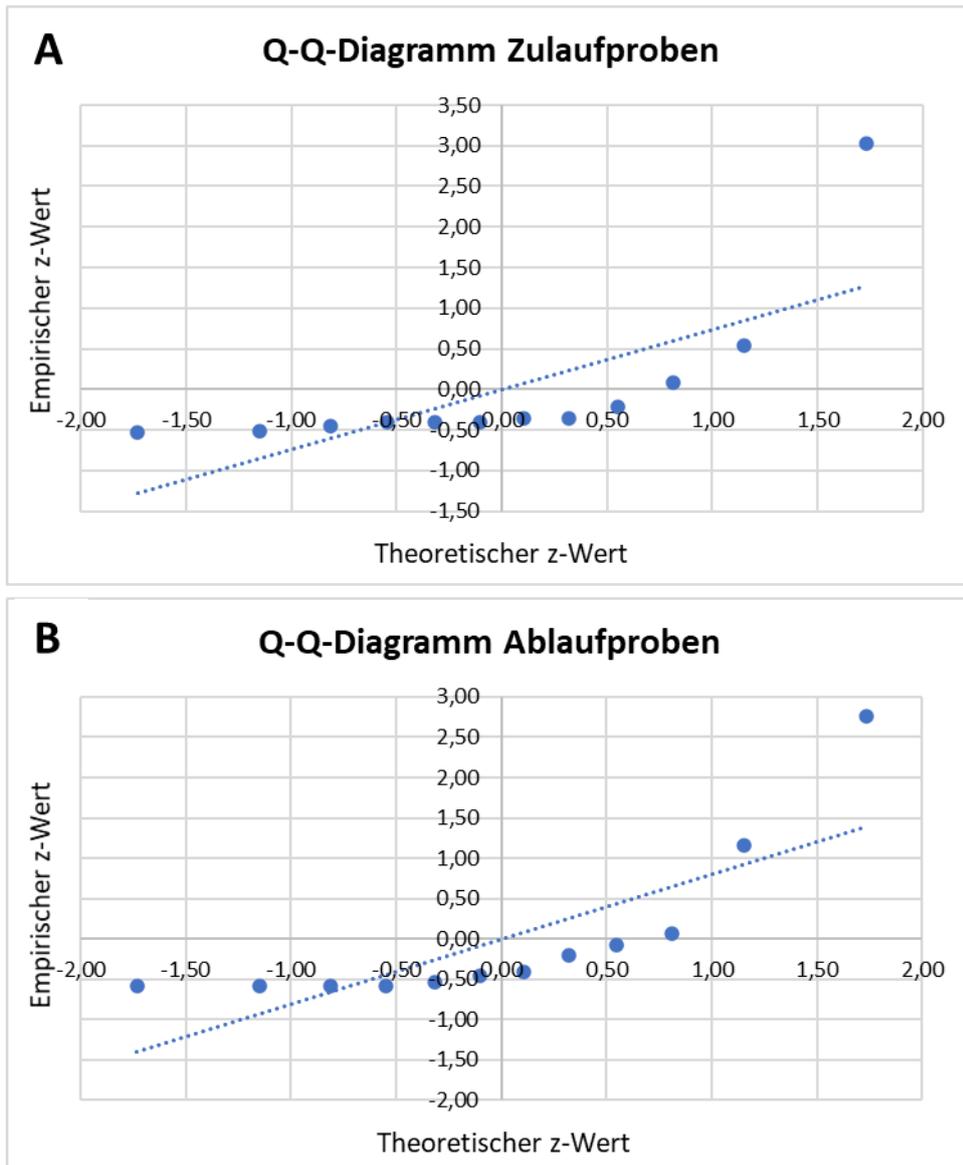


Abbildung 42: Erstellte Quantil-Quantil (Q-Q)-Diagramme, um die monatlich erhobenen Daten der Kläranlagenzulaufproben (A) und der Ablaufproben (B) auf Normalverteilung zu testen. Die empirischen z-Werte wurden den theoretisch erwarteten z-Werten der Standardnormalverteilung gegenübergestellt.

$n_1 \backslash n_2$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2							0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3				0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4			0	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	14
5		0	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
8	0	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
9	0	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
10	0	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
11	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	69	74	78	83
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
16	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87	93	99	105
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
20	2	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127

Abbildung 43: Tabellarische Darstellung der U_{kritisch} -Werte zweiseitiger Tests bei $\alpha = 0,05$, die zur Durchführung des Mann-Whitney U-Tests benötigt wurden. Der rot markierte kritische Wert von 37 wurde für statistische Berechnungen benötigt, um signifikante Unterschiede zwischen monatlichen Viruskonzentrationen zu prüfen [Internetquelle 10].

Tabelle 18: Identifizierte RNA-Sequenzen und Aminosäuresequenzen in der RdRp-Region der HEV-Isolate (mit Angabe von Ort, Monat/Jahr der Probenahme) aus Berliner Kläranlagenzulaufproben.

Isolat	RNA-Sequenz	Aminosäuresequenz
Seq1 KA RL 03/2016	TGTGCTCTGTTTGGCCCTTGGTTCCGCGCTATTGAGAAAGAAATACTGGCC CTACTCCCGCCTAATATATTTTATGGAGACGCCTATGAGGAGTCAGTGTTTG CCGCCGCTGTGTCCGGGGCGGGGTCATGTATGGTATTTGAGAATGACTTCT CTGAGTTTGACGGCACCCAGAATAACTTCTCTCTTGGCCTTGAATGTGTGGT AATGGAGGAGTGCGGCATGCCTCAATGGTTAATTAGATTGTATCATCTGGT TCGGTCAGCCTGGATCTTGCAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGTTTTTG GAAGAAGCACTCCGGTGAGCCTGG	CALFGPWFR AIEKEILALL PPNIFYGDAYEESVFAAA VSGAGSCMVFENDFSEF DGTQNNFSLGLECVVM EECGMPQWLIRLYHLVR SAWILQAPKESLKGFWK KHSGEPPG
Seq2 KA RL 06/2016	AGCCCTGCTTCCACCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAGGAGTCTGT GTTTGCCCGCCTGTGTGTCAGGGGCAGGTTCAAGCATGGTGTGTTGAGAACG ATTTTTCAGAATTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGTG TGTAGTCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAATCCGGTTGTACCA CTTGGTCCGGTCCGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGG GATTTTGGAAGAAACTCCGGTGAGCCTGGACCTCGCCT	ALLPPNIFYGDAYEESVF AAAVSGAGSSMVFEND FSEFDSTQNNFSLGLECV VMEECGMPQWLIRLYH LVRSAWILQAPKESLKG WKKHS
Seq3 KA RL 07/2016	TGTGCTCTGTTTGGCCCGTGGTTCCGTGCTATTGAAAAGAAATACTAGCC CTGCTCCCGCCTAATATTTTCTACGGCGACGCATACGAGGAGTCTGTGTTTG CCGCCGCTGTGTGTCAGGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTTGAGAATGATTTT CAGAGTTTGATAGCACTCAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGTGCCTGG TCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTAATCCGGTTGTACCATTTGG TTCCGGTCCGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGATTTT GGAAGAAGCACTCTGGTGAGCCTGG	CALFGPWFR AIEKEILALL PPNIFYGDAYEESVFAAA VSGAGSSMVFENDFSEF DSTQNNFSLGLECVME EECGMPQWLIRLYHLVRS AWILQAPKESLKGFWKK HSGEPG
Seq 4 KA RL 08/2016	TATTAGCCCTGCTTCCACCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAGGAGTC TGTGTTTGCCCGCCTGTGTGTCAGGGGCAGGTTCAAGCATGGTGTGTTGAGA ACGATTTTTCAGAATTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGA GTGTGTAGTCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAATCCGGTTGT ACCACTTGGTCCGGTCCGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTA AGGGATTTTGAAGAAACTC	LALLPPNIFYGDAYEESVF AAAVSGAGSSMVFEND FSEFDSTQNNFSLGLECV VMEECGMPQWLIRLYH LVRSAWILQAPKESLKG WKKHS
Seq5 KA RL 05/2017	TGTGCTCTGTTTGGCCCTTGGTTTTCGTGCCATTGAAAAGAAATATTGGCCC TACTCCCGCCTAATATCTTTTATGGCGACGCCTATGAGGAATCAGTGTTTCGC TGCCGCTGTGTCCGGGGCGGGGTCGTGCATGGTGTGTTGAAAATGACTTTTC AGAGTCTGACAGTACCCAAAATAATTTCTCCCTTGGTCTTGAATGTGTGGTT ATGGAGGAGTGCGGCATGCCCCAGTGGCTAATTAGGTCGTATCATCTGGTT CGGTCAGCCTGGATTTTGCAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGTTTTTGG AAGAAACTCCGGTGAGCCTGG	CALFGPWFR AIEKEILALL PPNIFYGDAYEESVFAAA VSGAGSCMVFENDFSES DSTQNNFSLGLECVME EECGMPQWLIRSYHLVRS AWILQAPKESLKGFWKK HSGEPG
Seq6 KA SL 10/2017	AATATTAGCCTGCTTCCACCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAGGAG TCTGTGTTTGCCCGCCTGTGTGTCAGGGGCAGGTTCAAGCATGGTGTGTTGAG AACGATTTTTCAGAATTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCG AGTGTGTAGTCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAATCCGGTTG TACCACTTGGTCCGGTCCGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTT AAGGGATTTTGAAGAAACTCCGGTGAGCCTGGAACGCCTAT	ILALLPPNIFYGDAYEESV FAAAVSGAGSSMVFEN DFSEFDSTQNNFSLGLEC VVMEECGMPQWLIRLY HLVRS AWILQAPKESL KGFWKHS

Seq7 KA RL 10/2017	GATCTAGCTTTGCTTCCACCCAATGATTTTTATGGCGATGCCTATGAGGAGT CAGTGTCTTCTGCAGCCATTTCTGGGGCTGGCTCCAGTATGGTTTTGAGAA CGATTTTTCTGAGTTTGATAGCACCCAAAATAATTTTTCTTGGCCTTGAGT GTGTCATTATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTTATCCGACTATATC ATCTGGTTAGGTCAGCCTGGACTTTGCAAGCCCCGAAAGAGTCTTTGAAAG GTTTCTGGAAGAAACACTCCGGT	ALLPPNDFYGDAYEESVF SAAISGAGSSMVFENDF SEFDSTQNNFSLGLECVI MEECGMPQWLIRLYHL VRSAWTLQAPKESLKG WKKHSG
Seq8 KA RL 03/2018 _1	GTAAGCCCTGCTCCCGCTAATATCTTCTACGGCGACGCACATGAGGAG TCTGTGTTTCCCGCTGTGTGAGGGCAGATTCAAGCATGGTATTTGAG AATGATTTTTAGAGTTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCG AGTGTGTAATCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAACCCGGTTG TACCATTTGGTCCGGTCCGGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCT AAGGGATTTTGAAGAAACACTC	LALLPPNIFYGDAHEESV FAAAVSGADSSMVFEN DFSEFDSTQNNFSLGLEC VIMEECGMPQWLIRLY HLVRSAWILQAPKESL GFWKKHS
Seq9 KA RL 03/2018 _2	CCGCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAGGAATCTGCGTTGCCGCC GCTGTTTCAGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTTGAGAATGATTTTTAGAG TTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGTGTGTAGTTATGG AGGAATGTGGCATGCCCAATGGTTAATCCGGTTGTACCATTTGGTCCGGT CGGCTGGATCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGATTTTGAAG AAACACTCCGGTGAGCCTGGA	PPNIFYGDAYEESAFAAA VSGAGSSMVFENDFSEF DSTQNNFSLGLECVME ECGMPQWLIRLYHLVRS AWILQAPKESLKGFWK HSGEP
Seq10 KA RL 04/2018	CTACGGTGACGCATACGAGGAATCTGTGTTTCCCGCTGTGTGAGGGG CAGGTTCAAGCATGGTGTGTTGAGAATGATTTTTAGAGTTTGACAGCACCC AAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGTGTGTAGTTATGGAGGAATGTGGCA TGCCCCAGTGGCTAATCCGGTTGTACCATTTGGTCCGGTCCGGCTGGATCC TACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTA	YGDAYEESVFAAAVSGA GSSMVFENDFSEFDSTQ NNFSLGLECVMEECG MPQWLIRLYHLVRS AWILQAPKESL
Seq11 KA RL 07/2018	ATACTAGCCCTGCTCCCGCTAATATCTTCTACGGCGATGCATACGAGGGG TCTGTGTTTGTGCCGCTGTGTGCGGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTTGAG AATGATTTTTAGAGTTTGATAGCACTCAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCG AGTGTGTGGTATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAATTCCGGTTG TACCATTTGGTCCGGTCCGGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCT AAGGGATTTTGAAGAAACATTCCGGTGAGCCTGGAAATCTGTTG	ILALLPPNIFYGDAYEGSV FAAAVSGAGSSMVFEN DFSEFDSTQNNFSLGLEC VMEECGMPQWLIRLY HLVRSAWILQAPKESL GFWKKHSGEP
Seq12 KA RL 08/2018	TGCTCCCGCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAGGAATCTGCGTTTGC CGCCGCTGTTTCAGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTTGAGAATGATTTTTCT AGAGTTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGTGTGTGATT ATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTAATCCGGTTGTACCATTTGGT CGGTCGGCTGGATCCTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGATTTTG GAAGAAACACTCCGGTGAGCCTGG	LPPNIFYGDAYEESAFAA AVSGAGSSMVFENDFSE FDSTQNNFSLGLECVIM EECGMPQWLIRLYHLV RSAWILQAPKESLKGFW KHS
Seq13 KA RL 10/2018	GTAGAAATTTCTGGGGCTGGCTCCAGTATGGTTTTGAGAACGATTTTTCT GAGTTTGATAGCACCCAAAATAATTTTTCTTGGCCTTGAGTGTGCATTA TGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTTATCCGACTATATCATCTGGTTA GGTCAGCCTGGACTTTGCAAGCCCCGAAAGAGTCTTTGAAAGGTTTCTGGA AGAAACACTCCGGTGAGCCTGGATT	ISGAGSSMVFENDFSEF DSTQNNFSLGLECVIME ECGMPQWLIRLYHLVRS AWTLQAPKESLKGFWK KHSG

Anhang

Seq14	GAGGAGTCTGTGTTTGCTGCTGCCATGTCCGGGGCAGGTTCCCTCCATGGTC	EESVFAAAMSGAGSSM
KA RL	TTTGAGAATGATTTTTCTGAGTTTGATAGCACTCAAATAATTTTTCCCTTG	VFENDFSEFDSTQNNFSL
12/2018	GTCTCGAGTGTGTAATTATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTCATCC	GLECVIMEECGMPQWLI
	GGTTGTACCATTTGGTTTCGATCGGCCTGGATTCTACAGGCCCCGAAGGAGT	RLYHLVRSAWILQAPKES
	CTCTAAAGGATTTTGAAGAAACACTCCGGTGAGCCTGGA	LKGFWKKHSGEP
Seq15	GAAATACTAGCCCTGCTCCCGCCTAATATTTTCTACGGTGACGCATACGAG	EILALLPPNIFYGDAYEES
KA RL	GAATCTGCGTTTGCCGCCGCTTTTCAGGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTT	AFAAAVSGAGSSMVFE
01/2019	GAGAATGATTTTTCAGAGTTTGATAGCACCCAAAATAACTTCTCTTTGGTC	NDFSEFDSTQNNFSLGL
	TCGAGTGTGTAGTTATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGTTAATCCGG	ECVMEECGMPQWLIR
	TTGTACCATTTGGTTTCGGTCGGCCTGGATCCTACAGGCCCCGAAGGAGTCT	LYHLVRSAWILQAPKESL
	CTTAAGGGATTTTGAAGAAACACTCCGGTGAGCCTGGAT	KGFWKKHSGEP

6 Literaturverzeichnis

6.1 Internetquellen

- [1] Bundesinstitut für Risikobewertung „Zoonosen: Gesundheitliche Bewertung“, unter: <https://www.bfr.bund.de/de/zoonosen.html> (abgerufen am 17.05.2021).
- [2] World Health Organization (2020) „Hepatitis E“, unter: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e> (abgerufen am 17.05.2021).
- [3] Paul-Ehrlich-Institut (2019) „Sicherheit der Blutspenden weiter erhöht – PEI ordnet Hepatitis-E-Testung bei Blutspenderinnen und Blutspendern an“, unter: <https://www.pei.de/DE/newsroom/pm/jahr/2019/11-sicherheit-blutspenden-weiter-erhoeht-pei-ordnet-hepatitis-e-testung-blutspende-an.html> (abgerufen am 18.05.2021).
- [4] Robert Koch-Institut (2001 bis 2019) „Infektionsepidemiologische Jahrbücher“, unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/jahrbuch_node.html (abgerufen am 18.05.2021).
- [5] ViralZone (Swiss Institute of Bioinformatics) „Cosavirus“, unter: <https://viralzone.expasy.org/4797> (abgerufen am 18.05.2021).
- [6] UniProt „UniProtKB - B8XTP8 (POLG_COSAA)“, unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/B8XTP8> (abgerufen am 18.05.2021).
- [7] World Health Organization (2017) „Diarrhoeal disease“, unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> (abgerufen am 18.05.2021).
- [8] SciencePrimer.com „Copy number calculator for realtime PCR“, unter: <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> (abgerufen am 18.05.2021).
- [9] UniScience, unter: http://www.uniscience.co.kr/geniul_ref.html (abgerufen am 18.05.2021).
- [10] Real Statistics Using Excel „Mann-Whitney Table, Alpha = .05 (two-tailed)“, unter: <http://www.real-statistics.com/statistics-tables/mann-whitney-table/> (abgerufen am 18.05.2021).
- [11] Berliner Wasserbetriebe (2013) „Die Müritz viermal mit sauberem Wasser gefüllt - Ruhleben: In 50 Jahren drei Milliarden Kubikmeter Abwasser geklärt“, unter: https://www.bwb.de/de/25430_10782.php (abgerufen am 18.05.2021).
- [12] Landesamt für Gesundheit und Soziales „EU-Badestelle Kleine Badewiese - Badegewässerprofil Unterhavel“, unter: <https://www.berlin.de/lageso/gesundheit/gesundheitsschutz/badegewaesser/badegewaesserprofile/artikel.339129.php> (abgerufen am 18.05.2021).
- [13] FragDenStaat (2020) „Ableitungen Klärwerk Ruhleben in Teltowkanal“, unter: <https://fragdenstaat.de/anfrage/ableitungen-klarwerk-ruhleben-in-teltowkanal/> (abgerufen am 18.05.2021).
- [14] Ministerium für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Landwirtschaft (2017) „Tierhaltungsanlagen in Brandenburg“, unter: <https://kleineanfragen.de/brandenburg/6/7293-tierhaltungsanlagen-in-brandenburg> (abgerufen am 18.05.2021).

[15] ARUP Laboratories „Hepatitis E Virus by Quantitative PCR“, unter: <https://ltd.aruplab.com/Tests/Pub/2011654> (abgerufen am 18.05.2021).

6.2 Publikationen

Ackermann, H. W. (2006). Classification of bacteriophages. *The bacteriophages*, 2, 8-16.

Adlhoch, C., Avellon, A., Baylis, S. A., Ciccaglione, A. R., Couturier, E., de Sousa, R., et al. & Dalton, H. R. (2016). Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *Journal of Clinical Virology*, 82, 9-16.

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. *Veterinary microbiology*, 139(3-4), 270-278.

Aggarwal, R., & Naik, S. (2009). Epidemiology of hepatitis E: current status. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(9), 1484-1493.

Agrawal, S., Gupta, D., & Panda, S. K. (2001). The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology*, 282(1), 87-101.

Ahmed, S. M., Lopman, B. A., & Levy, K. (2013). A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS one*, 8(10), e75922.

Alfonsi, V., Romanò, L., Ciccaglione, A. R., La Rosa, G., Bruni, R., Zanetti, A., et al. & Tosti, M. E. (2018). Hepatitis E in Italy: 5 years of national epidemiological, virological and environmental surveillance, 2012 to 2016. *Eurosurveillance*, 23(41), 1700517.

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. *Emerging infectious diseases*, 23(1), 130.

Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., et al. & Graham, D. Y. (2014). Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *The Journal of infectious diseases*, 209(7), 1016-1022.

Ayouni, S., Estienney, M., Hammami, S., Neji Guediche, M., Pothier, P., Aouni, M., et al. & de Rougemont, A. (2016). Cosavirus, salivirus and bufavirus in diarrheal Tunisian infants. *PLoS One*, 11(9), e0162255.

Bae, S. E., & Son, H. S. (2011). Classification of viral zoonosis through receptor pattern analysis. *BMC bioinformatics*, 12(1), 96.

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. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), 187-191.

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(1), 23-31.

- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., & Dalton, H. (2004).** Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerging infectious diseases*, *10*(5), 953.
- Batts, W., Yun, S., Hedrick, R., & Winton, J. (2011).** A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus research*, *158*(1-2), 116-123.
- Bengis, R. G., Leighton, F. A., Fischer, J. R., Artois, M., Morner, T., & Tate, C. M. (2004).** The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Revue scientifique et technique-office international des epizooties*, *23*(2), 497-512.
- Beyer, S., Szewzyk, R., Gnirss, R., Johne, R., & Selinka, H.-C. (2020).** Detection and Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wastewater and Urban Surface Waters in Germany. *Food and Environmental Virology*, 1-11.
- Bibby, K., Crank, K., Greaves, J., Li, X., Wu, Z., Hamza, I. A., & Stachler, E. (2019).** Metagenomics and the development of viral water quality tools. *npj Clean Water*, *2*(1), 1-13.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., et al. & Delwart, E. (2009).** Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *Journal of clinical microbiology*, *47*(11), 3507-3513.
- Bollback, J. P., & Huelsenbeck, J. P. (2001).** Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *Journal of molecular evolution*, *52*(2), 117-128.
- Bonilla, T. D., Nowosielski, K., Cuvelier, M., Hartz, A., Green, M., Esiobu, N., et al. & Rogerson, A. (2007).** Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine pollution bulletin*, *54*(9), 1472-1482.
- Borchardt, M. A., Haas, N. L., & Hunt, R. J. (2004).** Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5937-5946.
- Bosch, A. (1998).** Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*, *1*(3), 191-6.
- Brassard, J., Gagné, M. J., Généreux, M., & Côté, C. (2012).** Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Applied and environmental microbiology*, *78*(10), 3763-3766.
- Burbano-Rosero, E. M., Ueda-Ito, M., Kisielius, J. J., Nagasse-Sugahara, T. K., Almeida, B. C., Souza, C. P., et al. & Rivera, I. N. G. (2011).** Diversity of somatic coliphages in coastal regions with different levels of anthropogenic activity in Sao Paulo State, Brazil. *Applied and environmental microbiology*, *77*(12), 4208-4216.
- Campanini, G., Roviola, F., Meloni, F., Cascina, A., Ciccocioppo, R., Piralla, A., & Baldanti, F. (2013).** Persistent human cosavirus infection in lung transplant recipient, Italy. *Emerging infectious diseases*, *19*(10), 1667.
- Cao, D., & Meng, X. J. (2012).** Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging microbes & infections*, *1*(1), 1-10.
- Carter, M. J. (2005).** Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of applied microbiology*, *98*(6), 1354-1380.

- Chase, A. J., & Semler, B. L.** (2012). Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. *Future virology*, 7(2), 179-191.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C. W., Green, K., Martella, V., et al. & Vinjé, J.** (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of general virology*, 100(10), 1393.
- Christensen, P. B., Engle, R. E., Hjort, C., Homburg, K. M., Vach, W., Georgsen, J., & Purcell, R. H.** (2008). Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clinical Infectious Diseases*, 47(8), 1026-1031.
- Chung, H., & Sobsey, M. D.** (1993). Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science and Technology*, 27(3-4), 425-428.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., & Girones, R.** (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerging infectious diseases*, 9(4), 449.
- Clemente-Casares, P., Ramos-Romero, C., Ramirez-Gonzalez, E., & Mas, A.** (2016). Hepatitis E virus in industrialized countries: the silent threat. *BioMed research international*, 2016.
- Cotten, M., Oude Munnink, B. B., Canuti, M., Deijs, M., Watson, S. J., Kellam, P., & van der Hoek, L.** (2014). Full genome virus detection in fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel iterative sequence classification algorithm. *Plos one*, 9(4), e93269.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., & Perelle, S.** (2013). Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC microbiology*, 13(1), 1-16.
- Crossan, C., Baker, P. J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H. R., & Scobie, L.** (2012). Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerging infectious diseases*, 18(12), 2085.
- Dalton, H. R., Pas, S. D., Madden, R. G., & van der Eijk, A. A.** (2014). Hepatitis e virus: current concepts and future perspectives. *Current infectious disease reports*, 16(4), 399.
- Danthi, P., Tosteson, M., Li, Q. H., & Chow, M.** (2003). Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *Journal of virology*, 77(9), 5266-5274.
- Demeke, T., & Jenkins, G. R.** (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 1977-1990.
- Di Profio, F., Melegari, I., Palombieri, A., Sarchese, V., Arbuatti, A., Fruci, P., et al. & Di Martino, B.** (2019). High prevalence of hepatitis E virus in raw sewage in Southern Italy. *Virus research*, 272, 197710.
- Diedrich, S., & Böttcher, S.** (2017). Häufung „Polio-ähnlicher“ Erkrankungen in 2016. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 9 RKI*, 85–87.
- DIN EN ISO 10705-1:2002** Nachweis und Zählung von Bakteriophagen, Teil 1: Zählung von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen
- DIN EN ISO 10705-2:2002** Nachweis und Zählung von Bakteriophagen, Teil 2: Zählung von somatischen Coliphagen
- Dorevitch, S., Panthi, S., Huang, Y., Li, H., Michalek, A. M., Pratap, P., et al. & Li, A.** (2011). Water ingestion during water recreation. *Water research*, 45(5), 2020-2028.

- Dremsek, P., Joel, S., Baechlein, C., Pavio, N., Schielke, A., Ziller, M., et al. & Ulrich, R. G. (2013).** Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs. *Journal of Virological Methods*, *190*(1-2), 11-16.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., et al. & Girones, R. (2017).** Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *Efsa Journal*, *15*(7), e04886.
- Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (2003).** Hepatitis E virus. *Reviews in medical virology*, *13*(3), 145-154.
- Emerson, S. U., Clemente-Casares, P., Moiduddin, N., Arankalle, V. A., Torian, U., & Purcell, R. H. (2006).** Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *Journal of general virology*, *87*(3), 697-704.
- Faber, M., Askar, M., & Stark, K. (2018B).** Case-control study on risk factors for acute hepatitis E in Germany, 2012 to 2014. *Eurosurveillance*, *23*(19), 17-00469.
- Faber, M., Willrich, N., Schemmerer, M., Rauh, C., Kuhnert, R., Stark, K., & Wenzel, J. J. (2018A).** Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *Journal of viral hepatitis*, *25*(6), 752-758.
- Farkas, K., Hassard, F., McDonald, J. E., Malham, S. K., & Jones, D. L. (2017).** Evaluation of molecular methods for the detection and quantification of pathogen-derived nucleic acids in sediment. *Frontiers in microbiology*, *8*, 53.
- Fenaux, H., Chassaing, M., Berger, S., Gantzer, C., Bertrand, I., & Schvoerer, E. (2019).** Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries. *Water research*, *151*, 144-157.
- Ferraro, G. B., Mancini, P., Divizia, M., Suffredini, E., Della Libera, S., Iaconelli, M., & La Rosa, G. (2018).** Occurrence and genetic diversity of human Cosavirus in sewage in Italy. *Food and environmental virology*, *10*(4), 386-390.
- Fischer, C., Hofmann, M., Danzer, M., Hofer, K., Kaar, J., & Gabriel, C. (2015).** Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria. *PLoS One*, *10*(3), e0119576.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., & Codony, F. (2012).** Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of microbiological methods*, *91*(2), 276-289.
- Fong, T. T., & Lipp, E. K. (2005).** Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and molecular biology reviews*, *69*(2), 357-371.
- Fong, T. T., Phanikumar, M. S., Xagorarakis, I., & Rose, J. B. (2010).** Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Applied and environmental microbiology*, *76*(3), 715-723.
- Fuster, N., Pintó, R. M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., & Guix, S. (2016).** Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water research*, *101*, 226-232.
- Garbuglia, A. R., Scognamiglio, P., Petrosillo, N., Mastroianni, C. M., Sordillo, P., Gentile, D., et al. & Capobianchi, M. R. (2013).** Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(1), 110.

- Garson, J. A., Ferns, R. B., Grant, P. R., Ijaz, S., Nastouli, E., Szypliska, R., & Tedder, R. S. (2012).** Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *Journal of virological methods*, *186*(1-2), 157-160.
- Girones, R., Ferrus, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Correˆa, A., et al. & Bofill-Mas, S. (2010).** Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water research*, *44*(15), 4325-4339.
- Gnirss, R., Lüdicke, C., Beraktschjan, M., Renner, P., Feuerpfeil, I., Dizer, H., Szewzyk, R., & Selinka, H.-C. (2015).** Abwasserdesinfektion-Verfahrensvergleich in Bezug auf Indikatororganismen. *KA-Korrespondenz Abwasser, Abfall*, *62*(3), 225-238.
- Grabow, W. O. K., Coubrough, P., Nupen, E. M., & Bateman, B. W. (1984).** Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. *Water SA*, *10*(1), 07-14.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., & Emerson, S. U. (2006).** A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *Journal of virology*, *80*(12), 5919-5926.
- Haas, C. N., Rose, J. B., Gerba, C., & Regli, S. (1993).** Risk assessment of virus in drinking water. *Risk analysis*, *13*(5), 545-552.
- Hakim, M. S., Wang, W., Bramer, W. M., Geng, J., Huang, F., de Man, R. A., et al. & Pan, Q. (2017).** The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver International*, *37*(1), 19-31.
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., & Wilhelm, M. (2009).** Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research*, *43*(10), 2657-2668.
- Haramoto, E., & Otagiri, M. (2014).** Occurrence of human cosavirus in wastewater and river water in Japan. *Food and environmental virology*, *6*(1), 62-66.
- Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., et al. & Malham, S. K. (2016).** Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments—a review. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1692.
- Havelaar, A. H., Van Olphen, M., & Drost, Y. C. (1993).** F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and environmental microbiology*, *59*(9), 2956-2962.
- Heim, A., & Dürrwald, R. (2019).** Infektionen mit humanen Adenoviren. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 22 RKI*, 187 – 189.
- Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., & Pring-Åkerblom, P. (2003).** Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of medical virology*, *70*(2), 228-239.
- Heise, J., Nega, M., Alawi, M., & Wagner, D. (2016).** Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. *Journal of microbiological methods*, *121*, 11-23.
- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., et al. & Norder, H. (2014).** Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and environmental microbiology*, *80*(21), 6771-6781.
- Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., & Allard, A. K. (2002).** Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in

the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4523-4533.

Hillienhof, A. (2019). One-Health-Ansatz: WHO stellt Leitfaden zur Bekämpfung von Zoonosen vor. *Deutsches Ärzteblatt International*, 116(14), A-706

Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenka, O., Seidel, M., et al. & Schultz, A. C. (2017). Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLoS one*, 12(1), e0170199.

Ho, J. (2017). Molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung bei Viren und Bakterien nach Desinfektionsverfahren (Dissertation, Technische Universität München).

Höhne, M., & Schreier, E. (2004). Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *Journal of medical virology*, 72(2), 312-319.

Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z., & Jameel, S. (2015). Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic*, 16(4), 398-416.

Holtz, L. R., Finkbeiner, S. R., Kirkwood, C. D., & Wang, D. (2008). Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea. *Virology Journal*, 5(1), 1-5.

Huzly, D., Umhau, M., Bettinger, D., Cathomen, T., Emmerich, F., Hasselblatt, P., et al. & Panning, M. (2014). Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Eurosurveillance*, 19(21), 20812.

Iaconelli, M., Bonanno Ferraro, G., Mancini, P., Suffredini, E., Veneri, C., Ciccaglione, A. R., et al. & La Rosa, G. (2020). Nine-year nationwide environmental surveillance of hepatitis E virus in urban wastewaters in Italy (2011–2019). *International journal of environmental research and public health*, 17(6), 2059.

Iaconelli, M., Muscillo, M., Della Libera, S., Fratini, M., Meucci, L., De Ceglia, M., et al. & La Rosa, G. (2017). One-year surveillance of human enteric viruses in raw and treated wastewaters, downstream river waters, and drinking waters. *Food and environmental virology*, 9(1), 79-88.

Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A. R., et al. & La Rosa, G. (2015). Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in bivalve molluscs in Italy. *Food and Environmental Virology*, 7(4), 316-324.

Ibarluzea, J. M., Moreno, B., Serrano, E., Larburu, K., Maiztegi, M. J., Yarzabal, A., & Santa Marina, L. (2007). Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. *Journal of water and health*, 5(3), 417-426.

Idolo, A., Serio, F., Lugoli, F., Grassi, T., Bagordo, F., Guido, M., et al. & De Donno, A. (2013). Identification of HEV in symptom-free migrants and environmental samples in Italy. *Journal of viral hepatitis*, 20(6), 438-443.

Ivanova, O. E., Yarmolskaya, M. S., Eremeeva, T. P., Babkina, G. M., Baykova, O. Y., Akhmadishina, L. V., et al. & Lukashev, A. N. (2019). Environmental surveillance for poliovirus and other enteroviruses: Long-term experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *viruses*, 11(5), 424.

Jiang, S., Noble, R., & Chu, W. (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 179-184.

- Jin, Y., & Flury, M.** (2002). Fate and transport of viruses in porous media. *Advances in agronomy*, *77*, 39-102.
- Johne, R., Plenge-Boenig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J., & Schielke, A.** (2010). Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *Journal of General Virology*, *91*(3), 750-758.
- Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R. G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P., & Hofmann, J.** (2014). An ORF 1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *Journal of viral hepatitis*, *21*(6), 447-456.
- Johne, R., Trojnar, E., Filter, M., & Hofmann, J.** (2016). Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method. *Applied and environmental microbiology*, *82*(14), 4225-4231.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P.** (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990-993.
- Jones, T. H., Brassard, J., Topp, E., Wilkes, G., & Lapen, D. R.** (2017). Waterborne viruses and F-specific coliphages in mixed-use watersheds: microbial associations, host specificities, and affinities with environmental/land use factors. *Applied and environmental microbiology*, *83*(3).
- 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. *Journal of virological methods*, *131*(1), 65-71.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., & Jameel, S.** (2009). Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *Journal of virology*, *83*(24), 12714-12724.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N. S., Ijaz, S., Izopet, J., & Dalton, H. R.** (2012). Hepatitis e. *The Lancet*, *379*(9835), 2477-2488.
- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., & Dalton, H. R.** (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 1-16.
- Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., et al. & Delwart, E.** (2008). A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(51), 20482-20487.
- Kapusinszky, B., Phan, T. G., Kapoor, A., & Delwart, E.** (2012). Genetic diversity of the genus Cosavirus in the family Picornaviridae: a new species, recombination, and 26 new genotypes. *PLoS One*, *7*(5), e36685.
- Khamrin, P., & Maneekarn, N.** (2014). Detection and genetic characterization of cosavirus in a pediatric patient with diarrhea. *Archives of virology*, *159*(9), 2485-2489.
- Kim, S. Y., & Ko, G.** (2012). Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Letters in applied microbiology*, *55*(3), 182-188.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, *16*(2), 111-120.
- Kitajima, M., Rachmadi, A. T., Iker, B. C., Haramoto, E., Pepper, I. L., & Gerba, C. P.** (2015). Occurrence and genetic diversity of human cosavirus in influent and effluent of wastewater treatment plants in Arizona, United States. *Archives of virology*, *160*(7), 1775-1779.

- Kotulski, Y., & König, A.** (2008). Conflicts, crises and challenges: wild boar in the Berlin City—a social empirical and statistical survey. *Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici*, *17*(4), 233-246.
- Krog, J. S., Forslund, A., Larsen, L. E., Dalsgaard, A., Kjaer, J., Olsen, P., & Schultz, A. C.** (2017). Leaching of viruses and other microorganisms naturally occurring in pig slurry to tile drains on a well-structured loamy field in Denmark. *Hydrogeology Journal*, *25*(4), 1045-1062.
- Krumbholz, A., Joel, S., Dremsek, P., Neubert, A., Johne, R., Dürrwald, R., et al. & Zell, R.** (2014A). Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Medical Microbiology and Immunology*, *203*(4), 273-282.
- Krumbholz, A., Joel, S., Neubert, A., Dremsek, P., Dürrwald, R., Johne, R., et al. & Zell, R.** (2013). Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Veterinary microbiology*, *167*(3-4), 394-402.
- Krumbholz, A., Mohn, U., Lange, J., Motz, M., Wenzel, J. J., Jilg, W., et al. & Zell, R.** (2012). Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Medical microbiology and immunology*, *201*(2), 239-244.
- Krumbholz, A., Neubert, A., Joel, S., Girschick, H., Huppertz, H. I., Kaiser, P., et al. & Sauerbrei, A.** (2014B). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in children in Germany. *The Pediatric infectious disease journal*, *33*(3), 258-262.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K.** (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, *33*(7), 1870-1874.
- Kumar, V., Das, S., & Jameel, S.** (2010). The biology and pathogenesis of hepatitis viruses. *Current science*, 312-325.
- Kuzmanovic, D. A., Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C., & Krueger, S.** (2003). Bacteriophage MS2: molecular weight and spatial distribution of the protein and RNA components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Structure*, *11*(11), 1339-1348.
- La Rosa, G., Fontana, S., Di Grazia, A., Iaconelli, M., Pourshaban, M., & Muscillo, M.** (2007). Molecular identification and genetic analysis of norovirus genogroups I and II in water environments: comparative analysis of different reverse transcription-PCR assays. *Applied and environmental microbiology*, *73*(13), 4152-4161.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Vennarucci, V. S., & Muscillo, M.** (2010). Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Applied and environmental microbiology*, *76*(17), 5870-5873.
- Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. J., Kieke, B. A., & Borchardt, M. A.** (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(10), 2990-2996.
- Laverick, M. A., Wyn-Jones, A. P., & Carter, M. J.** (2004). Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Letters in Applied Microbiology*, *39*(2), 127-136.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., & Dei-Cas, E.** (2002). Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical reviews in microbiology*, *28*(4), 371-409.

- Leifels, M., Dan, C., Sozzi, E., Shoults, D. C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., & Sirikanchana, K. (2020).** Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications—A systematic review. *Water Research X*, 100080.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., & Hamza, I. A. (2015).** Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(8), 686-693.
- Leifels, M., Shoults, D., Wiedemeyer, A., Ashbolt, N. J., Sozzi, E., Hagemeyer, A., & Jurzik, L. (2019).** Capsid integrity qPCR—an azo-dye based and culture-independent approach to estimate adenovirus infectivity after disinfection and in the aquatic environment. *Water*, 11(6), 1196.
- Lewis, G. D., & Metcalf, T. G. (1988).** Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and environmental microbiology*, 54(8), 1983-1988.
- Li, S. W., Zhang, J., He, Z. Q., Gu, Y., Liu, R. S., Lin, J., et al. & Xia, N. S. (2005A).** Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3400-3406.
- Li, T. C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., et al. & Miyamura, T. (2005B).** Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1958.
- Liang, L., Goh, S. G., Vergara, G. G. R. V., Fang, H. M., Rezaeinejad, S., Chang, S. Y., et al. & Gin, K. Y. H. (2015).** Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 850-860.
- Lodder, W. J., & de Roda Husman, A. M. (2005).** Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1453-1461.
- Lucarelli, C., Spada, E., Taliani, G., Chionne, P., Madonna, E., Marcantonio, C., et al. & Ciccaglione, A. R. (2016).** High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014. *Eurosurveillance*, 21(30), 30299.
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., et al. & Jofre, J. (2003).** Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of applied microbiology*, 94(5), 808-815.
- Maan, H. S., Chowdhary, R., Shakya, A. K., & Dhole, T. N. (2013).** Genetic diversity of cosaviruses in nonpolio acute flaccid paralysis cases of undefined etiology, Northern India, 2010–2011. *Journal of Clinical Virology*, 58(1), 183-187.
- Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., & Wingender, J. (2018).** Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of the Total Environment*, 626, 650-659.
- Manor, Y., Blomqvist, S., Sofer, D., Alfandari, J., Halmut, T., Abramovitz, B., et al. & Shulman, L. M. (2007).** Advanced environmental surveillance and molecular analyses indicate separate importations rather than endemic circulation of wild type 1 poliovirus in Gaza district in 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5954-5958.

- Mansuy, J. M.,** Legrand-Abravanel, F., Calot, J. P., Peron, J. M., Alric, L., Agudo, S., *et al.* & Izopet, J. (2008). High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *Journal of medical virology*, 80(2), 289-293.
- Martín-Díaz, J.,** Casas-Mangas, R., García-Aljaro, C., Blanch, A. R., & Lucena, F. (2016). Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Science and Technology*, 73(9), 2182-2188.
- Masclaux, F. G.,** Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., & Oppliger, A. (2013). High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water research*, 47(14), 5101-5109.
- Matos, A.,** Mesquita, J. R., Gonçalves, D., Abreu-Silva, J., Luxo, C., & Nascimento, M. S. (2018). First detection and molecular characterization of hepatitis E virus in water from wastewater treatment plants in Portugal. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(2), 364-367.
- McMinn, B. R.,** Huff, E. M., Rhodes, E. R., & Korajkic, A. (2017). Concentration and quantification of somatic and F+ coliphages from recreational waters. *Journal of virological methods*, 249, 58-65.
- Meng, X. J.** (2000). Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis?. *Journal of hepatology*, 33(5), 842-845.
- Meng, X. J.** (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 256-265.
- Meng, X. J.** (2013). Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. In *Seminars in liver disease* (Vol. 33, No. 01, pp. 041-049). Thieme Medical Publishers.
- Merbecks, S.,** Beier, D., Müller, L., Partisch, M., & Gruschwitz, A. (2004). Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 36 RKI*, 301-302.
- Michel, A.,** Clermont, O., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2010). Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its Escherichia coli lipopolysaccharide receptor. *Applied and environmental microbiology*, 76(21), 7310-7313.
- Miura, T.,** Lhomme, S., Le Saux, J. C., Le Mehaute, P., Guillois, Y., Couturier, E., *et al.* & Le Guyader, F. S. (2016). Detection of hepatitis E virus in sewage after an outbreak on a French island. *Food and environmental virology*, 8(3), 194-199.
- Müller, B.,** Klemm, U., Marques, A. M., & Schreier, E. (2007). Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice. *Archives of virology*, 152(9), 1709-1719.
- Murrison, L. B., & Sherman, K. E.** (2017). The enigma of hepatitis E virus. *Gastroenterology & Hepatology*, 13(8), 484.
- Myrmel, M.,** Lange, H., & Rimstad, E. (2015). A 1-year quantitative survey of noro-, adeno-, human boca-, and hepatitis E viruses in raw and secondarily treated sewage from two plants in Norway. *Food and environmental virology*, 7(3), 213-223.
- Nagashima, S.,** Takahashi, M., Jirintai, S., Kobayashi, T., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2014). The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Archives of virology*, 159(5), 979-991.

- Nagashima, S.,** Takahashi, M., Jirintai, S., Tanaka, T., Nishizawa, T., Yasuda, J., & Okamoto, H. (2011A). Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *Journal of general virology*, *92*(12), 2838-2848.
- Nagashima, S.,** Takahashi, M., Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2011B). A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *Journal of general virology*, *92*(2), 269-278.
- Nair, V. P.,** Anang, S., Subramani, C., Madhvi, A., Bakshi, K., Srivastava, A., *et al.* & Surjit, M. (2016). Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis E virus. *PLoS pathogens*, *12*(4), e1005521.
- Nelson, K. E.** (2014). Transmission of hepatitis E virus by transfusion: what is the risk?. *Transfusion*, *54*(1), 8-10.
- Ng, T. F. F.,** Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., *et al.* & Delwart, E. (2012). High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *Journal of virology*, *86*(22), 12161-12175.
- Nieva, J. L.,** Madan, V., & Carrasco, L. (2012). Viroporins: structure and biological functions. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 563-574.
- Nimgaonkar, I.,** Ding, Q., Schwartz, R. E., & Ploss, A. (2018). Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *15*(2), 96.
- Nocker, A.,** Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods*, *67*(2), 310-320.
- Ogorzaly, L.,** Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A., & Gantzer, C. (2009). Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water research*, *43*(5), 1257-1264.
- Okitsu, S.,** Khamrin, P., Hanaoka, N., Thongprachum, A., Takanashi, S., Fujimoto, T., *et al.* & Ushijima, H. (2016). Cosavirus (family Picornaviridae) in pigs in Thailand and Japan. *Archives of virology*, *161*(1), 159-163.
- Pal, M.** (2005). Importance of zoonoses in public health. *Indian Journal of Animal Sciences*, *75*(5), 586-591.
- Pallerla, S. R.,** Schembecker, S., Meyer, C. G., Linh, L. T. K., Johne, R., Wedemeyer, H., *et al.* & Velavan, T. P. (2021). Hepatitis E virus genome detection in commercial pork livers and pork meat products in Germany. *Journal of Viral Hepatitis*, *28*(1), 196-204.
- Parshionikar, S.,** Laseke, I., & Fout, G. S. (2010). Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied and environmental microbiology*, *76*(13), 4318-4326.
- Pérez-Gracia, M. T.,** García, M., Suay, B., & Mateos-Lindemann, M. L. (2015). Current knowledge on hepatitis E. *Journal of clinical and translational hepatology*, *3*(2), 117.
- Pina, S.,** Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., & Girones, R. (2000). HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *Journal of hepatology*, *33*(5), 826-833.

- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Girones, R. (1998).** Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and environmental microbiology*, *64*(11), 4485-4488.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2016).** Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research*, *91*, 68-76.
- Prevost, B., Lucas, F. S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2015).** Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment international*, *79*, 42-50.
- Price, R. H. M., Graham, C., & Ramalingam, S. (2019).** Association between viral seasonality and meteorological factors. *Scientific reports*, *9*(1), 1-11.
- Purdy, M. A., & Khudyakov, Y. E. (2010).** Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PloS one*, *5*(12), e14376.
- Qi, Y., Zhang, F., Zhang, L., Harrison, T. J., Huang, W., Zhao, C., et al. & Wang, Y. (2015).** Hepatitis E virus produced from cell culture has a lipid envelope. *PLoS One*, *10*(7), e0132503.
- Ram, D., Manor, Y., Gozlan, Y., Schwartz, E., Ben-Ari, Z., Mendelson, E., & Mor, O. (2016).** Hepatitis E virus genotype 3 in sewage and genotype 1 in acute hepatitis cases, Israel. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *95*(1), 216-220.
- Randazzo, W., Vasquez-García, A., Aznar, R., & Sánchez, G. (2018).** Viability RT-qPCR to distinguish between HEV and HAV with intact and altered capsids. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1973.
- Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001).** Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *63*(1-3), 88-102.
- RKI (2000).** Ratgeber Infektionskrankheiten 11. Folge: Erkrankungen durch Norwalk-like-Viren. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 4 RKI*, 29-33.
- RKI (2014).** Aktuelles zu Norovirus-Infektionen Epidemiologische und molekular-epidemiologische Aspekte in Deutschland ab der Saison 2009/2010 bis Ende 2013. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 19 RKI*, 165-172.
- RKI (2015).** Hepatitis E RKI-Ratgeber für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 44 RKI*, 467-474.
- Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., et al. & Clemente-Casares, P. (2010).** Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *Journal of water and health*, *8*(2), 346-354.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992).** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*, *17*(1), 37-45.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J. F., Silvera, C., et al. & Girones, R. (2015).** Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: implications for water pollution management. *Journal of Environmental Management*, *159*, 58-67.
- Rutjes, S. A., Lodder, W. J., Lodder-Verschoor, F., Van den Berg, H. H., Vennema, H., Duizer, E., et al. & de Roda Husman, A. M. (2009).** Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerging infectious diseases*, *15*(3), 381.

- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H. L., Walsh, A., et al. & Morgan, D. (2009).** Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerging infectious diseases*, 15(11), 1738.
- Salvador, D., Neto, C., Benoliel, M. J., & Caeiro, M. F. (2020).** Assessment of the presence of hepatitis e virus in surface water and drinking water in Portugal. *Microorganisms*, 8(5), 761.
- Sauleda, S., Ong, E., Bes, M., Janssen, A., Cory, R., Babizki, M., et al. & Linnen, J. M. (2015).** Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion*, 55(5), 972-979.
- Schemmerer, M., Apelt, S., Trojnar, E., Ulrich, R. G., Wenzel, J. J., & Johne, R. (2016).** Enhanced replication of hepatitis E virus strain 47832c in an A549-derived subclonal cell line. *Viruses*, 8(10), 267.
- Schets, F. M., Schijven, J. F., & de Roda Husman, A. M. (2011).** Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water research*, 45(7), 2392-2400.
- Schielke, A., Filter, M., Appel, B., & Johne, R. (2011).** Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virology Journal*, 8(1), 1-9.
- Schielke, A., Ibrahim, V., Czogiel, I., Faber, M., Schrader, C., Dremsek, P., et al. & 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 infectious diseases*, 15(1), 440.
- Schielke, A., Sachs, K., Lierz, M., Appel, B., Jansen, A., & Johne, R. (2009).** Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virology Journal*, 6(1), 1-7.
- Schiff, G. M., Stefanovic, G. M., Young, B., & Pennekamp, J. K. (1984).** Minimum human infectious dose of enteric virus (Echovirus-12) in drinking water. In *Enteric viruses in water* (Vol. 15, pp. 222-228). Karger Publishers.
- Schlosser, B., Stein, A., Neuhaus, R., Pahl, S., Ramez, B., Krüger, D. H., et al. & Hofmann, J. (2012).** Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *Journal of hepatology*, 56(2), 500-502.
- 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. *Veterinary microbiology*, 180(1-2), 15-21.
- Schneider, J., Engler, M., Hofmann, J., Selinka, H.-C., Jones, T. C., Drosten, C., et al. & Böttcher, S. (2021).** Molecular detection of cosaviruses in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany. *Virus Research*, 198285.
- Schoenemann, B., & Jardin, N. (2015).** Baden in Fließgewässern. Ein Handlungsleitfaden am Beispiel des Baldeneysees & der Unteren Ruhr im Rahmen des BMBF-Projekts Sichere Ruhr. Essen.
- Selinka, H.-C., Botzenhart, K., Feuerpfeil, I., Puchert, W., Schmoll, O., Szewzyk, R., & Willmitzer, H. (2011).** Nachweis von Viren im Rohwasser als Grundlage einer Risikoabschätzung. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 54(4), 496-504.
- Selinka, H.-C., Schmidt, A., & Szewzyk, R. (2020).** Viren und Parasiten in Abwasser und Flüssen sowie Handlungsempfehlungen für Flüsse mit kurzzeitigen Verschmutzungen. BMBF-Abschlussbericht des

Umweltbundesamts im Forschungsprojekt FLUSSHYGIENE - Hygienisch relevante Mikroorganismen und Krankheitserreger in multifunktionalen Gewässern und Wasserkreisläufen

Sidhu, J. P., & Toze, S. G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment international*, *35*(1), 187-201.

Silverman, A. I., Akrong, M. O., Amoah, P., Drechsel, P., & Nelson, K. L. (2013). Quantification of human norovirus GII, human adenovirus, and fecal indicator organisms in wastewater used for irrigation in Accra, Ghana. *Journal of water and health*, *11*(3), 473-488.

Smith, D. B., Paddy, J. O., & Simmonds, P. (2016A). The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK. *Journal of Medical Virology*, *88*(5), 915-918.

Smith, D. B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E. F., Ulrich, R. G., Johne, R., et al. & Purdy, M. A. (2016B). Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *The Journal of general virology*, *97*(Pt 3), 537.

Smith, D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X. J., et al. & International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group. (2014B). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*, *95*(Pt 10), 2223.

Smith, D. B., Vanek, J., Wellington, L., Johannessen, I., Ramalingam, S., & Simmonds, P. (2013). Hepatitis E virus mixed infection in immunocompetent patient. *Emerging infectious diseases*, *19*(3), 468.

Smith, K. F., Goldberg, M., Rosenthal, S., Carlson, L., Chen, J., Chen, C., & Ramachandran, S. (2014A). Global rise in human infectious disease outbreaks. *Journal of the Royal Society Interface*, *11*(101), 20140950.

Soejima, T., & Iwatsuki, K. J. (2016). Innovative use of palladium compounds to selectively detect live Enterobacteriaceae in milk by PCR. *Applied and environmental microbiology*, *82*(23), 6930-6941.

Sprenger, C., Lorenzen, G., Grunert, A., Ronghang, M., Dizer, H., Selinka, H.-C., et al. & Szewzyk, R. (2014). Removal of indigenous coliphages and enteric viruses during riverbank filtration from highly polluted river water in Delhi (India). *Journal of water and health*, *12*(2), 332-342.

Stetler, R. E. (1984). Coliphages as indicators of enteroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(3), 668-670.

Stewart, J. R., Gast, R. J., Fujioka, R. S., Solo-Gabriele, H. M., Meschke, J. S., Amaral-Zettler, L. A., et al. & Holland, A. F. (2008). The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental Health*, *7*(2), 1-14.

Steyer, A., Naglič, T., Močilnik, T., Poljšak-Prijatelj, M., & Poljak, M. (2011). Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(7), 1732-1737.

Stillfried, M., Gras, P., Busch, M., Börner, K., Kramer-Schadt, S., & Ortmann, S. (2017). Wild inside: Urban wild boar select natural, not anthropogenic food resources. *PloS one*, *12*(4), e0175127.

Stöcker, A., Souza, B. F. D. C. D., Ribeiro, T. C. M., Netto, E. M., Araujo, L. O., Corrêa, J. I., et al. & Drexler, J. F. (2012). Cosavirus infection in persons with and without gastroenteritis, Brazil. *Emerging infectious diseases*, *18*(4), 656.

- Surjit**, M., Oberoi, R., Kumar, R., & Lal, S. K. (2006). Enhanced α 1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12), 8135-8142.
- Tabatabai**, J., Wenzel, J. J., Soboletzki, M., Flux, C., Navid, M. H., & Schnitzler, P. (2014). First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *Journal of Clinical Virology*, 61(1), 170-172.
- Takahashi**, H., Nakazawa, M., Ohshima, C., Sato, M., Tsuchiya, T., Takeuchi, A., *et al.* & Kimura, B. (2015). Heat-denatured lysozyme inactivates murine norovirus as a surrogate human norovirus. *Scientific reports*, 5(1), 1-9.
- Takahashi**, M., Yamada, K., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Tanaka, T., & Okamoto, H. (2008). Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Archives of virology*, 153(9), 1703.
- 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(1), 120-131.
- Tandukar**, S., Sherchand, J. B., Bhandari, D., Sherchan, S. P., Malla, B., Ghaju Shrestha, R., & Haramoto, E. (2018). Presence of human enteric viruses, protozoa, and indicators of pathogens in the Bagmati River, Nepal. *Pathogens*, 7(2), 38.
- Teshale**, E. H., Howard, C. M., Grytdal, S. P., Handzel, T. R., Barry, V., Kamili, S., *et al.* & Hu, D. J. (2010). Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 123.
- TrinkwV** (2001) Trinkwasserverordnung: Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (BGBl. I S. 959) in der Fassung der Neubekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459).
- Varma**, S. P. K., Kumar, A., Kapur, N., Durgapal, H., Acharya, S. K., & Panda, S. K. (2011). Hepatitis E virus replication involves alternating negative-and positive-sense RNA synthesis. *Journal of general virology*, 92(3), 572-581.
- Vilaginès**, P., Sarrette, B., Husson, G., & Vilagines, R. (1993). Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Science and Technology*, 27(3-4), 299-306.
- Vivek**, R., Nihal, L., Illiyaraja, J., Reddy, P. K., Sarkar, R., Eapen, C. E., & Kang, G. (2010). Investigation of an epidemic of Hepatitis E in Nellore in south India. *Tropical Medicine & International Health*, 15(11), 1333-1339.
- Vollmer**, T., Diekmann, J., Johne, R., Eberhardt, M., Knabbe, C., & Dreier, J. (2012). Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2708-2713.
- Wang**, B., Harms, D., Papp, C. P., Niendorf, S., Jacobsen, S., Lütgehetmann, M., *et al.* & Bock, C. T. (2018B). Comprehensive molecular approach for characterization of hepatitis E virus genotype 3 variants. *Journal of clinical microbiology*, 56(5).
- Wang**, L. F., & Cramer, G. (2014). Emerging zoonotic viral diseases. *Rev Sci Tech*, 33(2), 569-81.
- Wang**, H., Sikora, P., Rutgeresson, C., Lindh, M., Brodin, T., Björnlén, B., *et al.* & Norder, H. (2018A). Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *International journal of hygiene and environmental health*, 221(3), 479-488.

- Wang, H., Kjellberg, I., Sikora, P., Rydberg, H., Lindh, M., Bergstedt, O., & Norder, H. (2020).** Hepatitis E virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water. *Water research, 168*, 115141.
- Weigand, K., Weigand, K., Schemmerer, M., Müller, M., & Wenzel, J. J. (2018).** Hepatitis E seroprevalence and genotyping in a cohort of wild boars in Southern Germany and Eastern Alsace. *Food and environmental virology, 10*(2), 167-175.
- 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. *Journal of clinical virology, 52*(1), 50-54.
- Wichmann, O., Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., et al. & Stark, K. (2008).** Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *The Journal of infectious diseases, 198*(12), 1732-1741.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Cao, K. Y., Wernery, U., Schountz, T., et al. & Yuen, K. Y. (2016).** New hepatitis E virus genotype in Bactrian camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerging infectious diseases, 22*(12), 2219.
- Woolson, K. L., Forbes, A., Vine, L., Beynon, L., McElhinney, L., Panayi, V., et al. & Dalton, H. R. (2014).** Extra-hepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics, 40*(11-12), 1282-1291.
- Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., et al. & Wyer, M. (2011).** Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water research, 45*(3), 1025-1038.
- 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*(1), 35-45.
- Yin, X., & Feng, Z. (2019).** Hepatitis E virus entry. *Viruses, 11*(10), 883.
- Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., & Feng, Z. (2016).** Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses. *Journal of virology, 90*(8), 4232-4242.
- Zell, R. (2018).** Picornaviridae—the ever-growing virus family. *Archives of virology, 163*(2), 299-317.
- Zerda, K. S., Gerba, C. P., Hou, K. C., & Goyal, S. M. (1985).** Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Applied and environmental microbiology, 49*(1), 91-95.

7 Bisherige Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Beyer, S., Szewzyk, R., Gnirss, R., Johne, R., & Selinka, H.-C. (2020). Detection and Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wastewater and Urban Surface Waters in Germany. *Food and Environmental Virology*, 1-11.

Beyer, S., Szewzyk, R., & Selinka, H.-C. »Detection and characterization of Hepatitis-E-Viruses in urban and rural wastewater samples« (Poster), *28th Annual Meeting of the Society for Virology*, 2018 in Würzburg, Deutschland

Beyer, S., Szewzyk, R., & Selinka, H.-C. » Nachweis und Charakterisierung von Hepatitis-E-Viren in Abwasser- und Oberflächenwasserproben« (Poster), *4.BfR-Symposium Lebensmittel-assoziierte Viren*, 2018 in Berlin, Deutschland

Beyer, S., Szewzyk, R., & Selinka, H.-C. »Detection and characterization of hepatitis E virus genotype 3 in wastewater and urban surface waters in Germany« (Poster akzeptiert, Konferenz wurde dann aufgrund der Corona-Pandemie abgesagt), *30th Annual Meeting of the Society for Virology*, 2020 in Berlin, Deutschland

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Wasserkreislauf in Deutschland vom Verbraucher, zur Kläranlage, in die Umwelt, zum Wasserwerk und wieder zurück zum Verbraucher.

Abbildung 2: HEV-Genom mit der genomischen und subgenomischen RNA, die während der Replikation erzeugt wird. Die RNA beinhaltet drei ORFs, die für verschiedene Proteine kodieren.

Abbildung 3: Lebenszyklus von Hepatitis-E-Viren in Leberzellen.

Abbildung 4: Verteilung der Genotypen HEV-1, HEV-2, HEV-3 und HEV-4 auf der Welt.

Abbildung 5: Potenzielle Übertragungswege des HEV Genotyps 3 auf den Menschen in Deutschland.

Abbildung 6: An das RKI gemeldete HEV-Erkrankungen von 2001 bis 2019 in Deutschland.

Abbildung 7: Hauptvorkommen von Wildschweinen in Berlin.

Abbildung 8: Durchschnitt und Oberfläche eines CoSV-Virions mit ikosaedrischer Symmetrie.

Abbildung 9: Das RNA-Genom der CoSV und die daraus resultierenden 11 viralen Proteine.

Abbildung 10: Länder, in denen bereits CoSV detektiert wurden, sind auf der Weltkarte in schwarz gekennzeichnet.

Abbildung 11: Vier Probenahmestandorte in Berlin Spandau.

Abbildung 12: Drei Schritte der Polyethylenglykol-Fällung.

Abbildung 13: Röhrchen, Gerät und Pellet der Ultrazentrifugation.

Abbildung 14: Materialien, Aufbau und Elution der Glaswollefiltration.

Abbildung 15: Standardkurven zur Quantifizierung von HEV.

Abbildung 16: Standardkurve basierend auf den eingesetzten HEV-Standards von 10^6 Kopien/10 μ l bis 10^1 Kopien/10 μ l (rot) zur Quantifizierung von HEV in Umweltproben (blau und grün).

Abbildung 17: Funktionsweise der PMA-qPCR zur Unterscheidung von intakten und defekten Viruskapsiden.

Abbildung 18: Diagramm des Methodenablaufes inklusive Probenahme, Aufkonzentrierungsverfahren, Nukleinsäureextraktion, Detektion und Charakterisierung der Viren.

Abbildung 19: Vergleich der HEV-Konzentrationen in Direktproben und mit UZ aufkonzentrierten Abwasserproben mit Kennzeichnung der Bearbeitungstage nach Probenahme.

Abbildung 20: Einfluss der Probenvolumen für die Ultrazentrifugation (UZ) im Vergleich zur Direktmessung (5 ml), um HEV RNA in Abwasserproben via RT-qPCR zu quantifizieren

Abbildung 21: Überblick aller Probenahmestellen.

Abbildung 22: HEV-Konzentrationen in monatlichen Zulaufproben der KA RL im Verlauf von einem Jahr. Jeden Monat wurden Direktproben (D) und mit UZ (U)- und PEG-Fällung (P) aufkonzentrierte Proben via RT-qPCR auf HEV RNA untersucht.

Abbildung 23: Quantifizierte Viruskonzentrationen von HEV, HAdV, HNV, somatischen Phagen und F+-Phagen in Direktproben von monatlichen Kläranlagenzulaufen von März 2018 bis Februar 2019.

Abbildung 24: Verlauf der HEV RNA-Konzentrationen in monatlichen Zulaufproben (Z) und Ablaufproben (A) der KA RL, analysiert mit der RT-qPCR in Direktproben.

Abbildung 25: Konzentrationen an HEV, HAdV, HNV, somatischen Phagen und F+-Phagen in Direktproben von Kläranlagenabläufen vor (-) und nach (+) UV-Behandlung im April, Mai, Juni und August 2018.

Abbildung 26: Spikeversuch mit HAdV, um die PMA-qPCR in einem Vorversuch zu testen.

Abbildung 27: Oberflächengewässer in Berlin mit Fließrichtungen sowie der Probenahmestellen 1 bis 6.

Abbildung 28: Direktproben der Havel an der Heerstraße von 2018/2019 wurden auf HEV, HAdV und somatische Phagen getestet.

Abbildung 29: Spikeversuch mit MNV, um die Virenelution aus Sedimentproben auszutesten.

Abbildung 30: Vergleich der beiden *nested*-PCR-Primersysteme von Smith *et al.* (2013) und Johne *et al.* (2010). Getestet wurden jeweils eine HEV-Positivkontrolle (+) und eine Negativkontrolle (-).

Abbildung 31: Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben (März 2018) wurden auf HEV RNA mittels *nested*-RT-PCRs mit den Primern von Smith *et al.* (A) und Johne *et al.* (B) getestet.

Abbildung 32: Fünf Agarosegele mit neun markierten Banden, die 332 bp große HEV-Amplifikate sichtbar machen. Diese PCR-Produkte wurden in *nested*-PCRs mit den Primern von Johne *et al.* (2010) erzeugt.

Abbildung 33: Phylogenetischer Stammbaum zur Genotypisierung der 15 HEV-Sequenzen, die in den Berliner Kläranlagenzulaufproben identifiziert wurden. Die Sequenzen wurden mit 41 HEV-Referenzsequenzen der Genotypen 1 bis 7 verglichen.

Abbildung 34: Phylogenetischer Stammbaum zum Vergleich der in Berliner Kläranlagenzulaufproben detektierten HEV-3 Stämme mit Sequenzen aus HEV-infizierten Patienten aus Berlin.

Abbildung 35: Das Vorkommen von Wildschweinen auf Berliner Grünflächen. Im Tiergarten in Berlin befinden sich keine lokalen Wildschweinpopulationen.

Abbildung 36: Vergleich der mittels RT-qPCR ermittelten CoSV-Konzentrationen von je vier Kläranlagenzulaufproben, die mit UZ oder PEG-Fällung aufkonzentriert wurden.

Abbildung 37: Quantifizierung von Cosaviren via RT-qPCR aus Abwasserproben, wobei verschiedene Probenvolumen für die Virusaufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation getestet wurden.

Abbildung 38: Konzentrationen an Cosaviren in monatlichen Zulaufproben der KA RL im Jahresverlauf. Es wurden mit UZ (U) und PEG-Fällung (P) bearbeitete Proben via RT-qPCR auf CoSV getestet.

Abbildung 39: Monatlich gemessene Konzentration an CoSV, HAdV und HNV in Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben, die mittels PEG-Fällungen aufkonzentriert wurden, von März 2018 bis Februar 2019.

Abbildung 40: Monatliche Kläranlagenzulaufproben, die mit UZ aufkonzentriert wurden. Im Verlauf eines Jahres wurden die Konzentrationen an HEV, CoSV, HAdV und HNV ermittelt.

Abbildung 41: Von März 2018 bis Februar 2019 wurden die Konzentrationen von HEV, CoSV, HAdV und HNV in monatlichen Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Ruhleben, die mittels UZ aufkonzentriert wurden, ermittelt.

Abbildung 42: Erstellte Quantil-Quantil (Q-Q)-Diagramme, um die monatlich erhobenen Daten der Kläranlagenzulaufproben (A) und der Ablaufproben (B) auf Normalverteilung zu testen. Die empirischen z-Werte wurden den theoretisch erwarteten z-Werten der Standardnormalverteilung gegenübergestellt.

Abbildung 43: Tabellarische Darstellung der U_{kritisch} -Werte zweiseitiger Tests bei $\alpha = 0,05$, die zur Durchführung des Mann-Whitney U-Tests benötigt wurden.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: GPS-Koordinaten und Bezeichnung der Probenahmestellen in den beiden Forstrevieren.

Tabelle 2: Genutzte Kits und Zusammensetzung der Reaktionsmischungen in der qPCR pro Ansatz zur Detektion von HEV, CoSV, HNV, MNV und HAdV.

Tabelle 3: Verwendete Primer und Sonden sowie Temperaturprofile zur qPCR-Amplifikation von Sequenzen der HEV, CoSV, HNV, MNV und HAdV.

Tabelle 4: Umrechnung der HEV-Kopienzahl pro Reaktionsansatz auf 100 ml der Ursprungsprobe.

Tabelle 5: Verwendete Primer und Temperaturprofile der RT-PCR und *nested*-PCR zur HEV-Detektion.

Tabelle 6: Methodenvergleich: Viren in Abwasserproben wurden mit 3 Methoden (UZ, PEG, GW) aufkonzentriert und via RT-qPCR auf HEV getestet, ebenso wie Direktproben.

Tabelle 7: Detektion von HEV RNA in Zu- und Ablaufproben von vier verschiedenen KA mittels RT-qPCR.

Tabelle 8: HEV RNA-Konzentrationen (Direkt-, UZ-, PEG-Proben) der Kläranlagenabläufe vor (-) und nach (+) UV-Behandlung während der Abwasserreinigung in der KA RL wurden via RT-qPCR ermittelt.

Tabelle 9: Direktproben der Spree unter normalen Wetterbedingungen von 2016 bevor (ST und BSW) und nachdem (vor KA RL) der Fluss die Berliner Innenstadt passierte.

Tabelle 10: Die Virusbelastung nach MWÜ in die Spree wurde bei drei Starkregenereignissen untersucht.

Tabelle 11: Quantifizierung von HEV und andere Indikatorviren in Wasserproben der Badestelle „Kleine Badewiese“ (2018/2019) in Direktproben und mit UZ- oder PEG-Fällung aufkonzentrierten Proben.

Tabelle 12: Übersicht des HEV-Vorkommens in den untersuchten Oberflächengewässerproben aus Berlin. Die Viren wurden mittels RT-qPCR detektiert.

Tabelle 13: Überblick der HEV-Sequenzen, die aus Kläranlagenzulaufproben isoliert wurden und deren HEV-Subgenotypen mit MEGA 7 bestimmt und mit HEVnet überprüft wurden.

Tabelle 14: Oberflächengewässerproben von mehreren Stellen aus zwei Forstrevieren, die auf HEV RNA getestet wurden in Direktproben, UZ-Proben und PEG-Proben.

Tabelle 15: Methodenvergleich: Viren in Kläranlagenzulaufproben wurden mit 3 Methoden (UZ, PEG, GW) aufkonzentriert und via RT-qPCR auf CoSV untersucht. Direktproben wurden ebenfalls getestet.

Tabelle 16: Konzentrationen an CoSV, HEV, HAdV und HNV in einer Probe des indischen Yamuna Flusses in der Umgebung von Neu-Delhi, angegeben in Kopien/100 ml.

Tabelle 17: Sequenzen der Standards zur Quantifizierung von HEV und CoSV während der RT-qPCR.

Tabelle 18: Identifizierte RNA-Sequenzen und Aminosäuresequenzen in der RdRp-Region der HEV-Isolate (mit Angabe von Ort, Monat/Jahr der Probenahme) aus Berliner Kläranlagenzulaufproben.

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift