

Abstract

For the purpose of characterizing the circulating HEV strains, comprehensive molecular methods combining two nested RT-PCRs targeting the consensus sequences of the HEV ORF1 and ORF2 genes and a sensitive real-time RT-PCR targeting the overlapping region of HEV ORF2 and ORF3 were developed. Additionally, an efficient complete HEV-3 genome amplification method was carried out for new HEV-3 subtype identification and assignment. In order to evaluate the system, we used one HEV-positive sample from a kidney transplant recipient in Switzerland, and thirty-four human serum and feces samples from chronic hepatitis E patients collected by three German university hospitals. The newly developed molecular tools in this project will greatly facilitate the detection, quantification, and determination of HEV-3 variants in circulation and thereby improve our understanding of HEV evolution and genetic diversity.

Firstly, the sequence and phylogenetic analyses of HEV variants from chronic hepatitis E patients circulating in Germany have shown HEV-3c (29/34) is the predominant subtype. Meanwhile, antiviral resistant mutations have been detected in HEV variants of several German renal transplant recipients which might be responsible for the failure of ribavirin treatment. Secondly, we have characterized the first HEV full-length genomic sequence in Switzerland, which is weakly homologous to known HEV-3 strains. Taken together with other recent investigations, the results obtained so far from Switzerland would support the hypothesis of a Swiss specific HEV subtype. Thirdly, the epidemic HEV strains of the Nigerian hepatitis E outbreak in 2017 were characterized in-depth. Consequently, novel HEV-1e and HEV-2b strains were identified as the causative pathogens for the hepatitis E outbreak in Nigeria during 2017. This is the first report that both HEV-1 and HEV-2 circulate during an outbreak of hepatitis E. Clean drinking water and good hygiene are important to minimize the risk of hepatitis E outbreak in Sub-Saharan Africa.

Some 278 rodent and 78 bat liver specimens from multiple species and different geographical locations were tested for the purpose of the assessment the distribution of HEV variants in rodents and bats, due to the known zoonotic potential of these species. HEV variants were found in two rodent species containing *Apodemus chevrieri* (Chevrier's field mouse) from family *Muridae* and *Eothenomys melanogaster* (Pe`re David's vole) from family *Cricetidae* and one bat species *Myotis davidii* (whiskered bat) from family *Vespertilionidae*. It is hypothesized that two assumed novel genotypes (HEV-C3 and HEV-C4) can be assigned to the species *Orthohepevirus C* and bat HEV in China represents a novel genotype (HEV-D2) of the species *Orthohepevirus D*. These results expand the knowledge of HEV diversity in orders of Rodentia and Chiroptera and gives fresh insights into the origin, host range, and evolution of HEV.

In conclusion, this project has enhanced our knowledge of the molecular epidemiology and risk assessment of circulating HEV variants in different European and Sub-Saharan African countries, and in wild animals.

Zusammenfassung

Die Hepatitis E Virus (HEV) Infektion stellt neuerdings ein ernstzunehmendes Problem der öffentlichen Gesundheit dar. Vier HEV-Genotypen (HEV-1 bis HEV-4) sind als human Pathogene bekannt.

Um zirkulierende HEV-3 Varianten zu identifizieren und charakterisieren, wurde ein molekularer Ansatz entwickelt. Dieser kombiniert eine sensitive HEV-spezifische Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), die eine überlappende Region des HEV ORF2 und ORF3 (die ORF2/3 Region) amplifiziert, mit zwei neu entwickelten Konsensus-Nested-RT-PCRs, welche jeweils Regionen in den HEV ORF1 und ORF2 Genen abdecken. Da vollständige Genomsequenzen zur Zuordnung neuer HEV-3 Subtypen erforderlich sind, wurde ein einfacher Amplifikationsansatz für Volllänge HEV-3 Genome implementiert. 34 humane Serum- und Stuhlproben von chronischen Hepatitis E Patienten aus drei deutschen Universitätskliniken, sowie eine Probe eines schweizerischen Nierentransplantatempfängers wurden zur Evaluation des Systems ausgewählt. Dieser umfassende Ansatz wird erheblich zur Erkennung, Quantifizierung und Bestimmung von HEV-3 Virusstämmen beitragen und somit zu verbesserter molekularer Diagnostik und Verständnis der Diversität und Evolution von HEV führen.

In einem ersten Schritt haben Sequenz- und phylogenetische Analysen von in chronischen Hepatitis-E-Patienten zirkulierenden HEV Stämmen gezeigt, dass HEV-3c (29/34 untersuchten Proben) der vorherrschende HEV-Subtyp ist. Dies weist auf den Konsum von z.B. schlecht gegartem Fleisch als Ursache für zoonotische HEV Übertragungen in Deutschland hin. Als nächstes wurde die erste vollständige HEV Genomsequenz aus der Schweiz charakterisiert. Diese besaß nur eine geringe Homologie zu bereits bekannten HEV-3 Stämmen. Die bisher erzielten Ergebnisse aus der Schweiz unterstützen die Hypothese eines Schweiz-spezifischen HEV-Subtypen. Letztlich wurden HEV Stämme des nigerianischen Hepatitis E Ausbruchs 2017 im Detail charakterisiert. In diesen Analysen wurden neue HEV-1e und HEV-2b Stämme als Auslöser des Ausbruchs identifiziert. Dieses Ergebnis ist das erste Vorkommen eines gleichzeitigen Zirkulierens von HEV-1 und HEV-2 während eines Hepatitis E Ausbruchs. Der Einsatz angemessener sanitärer Einrichtungen und die Verfügbarkeit sauberen Trinkwassers sind ausschlaggebend, um das Ausbruchsrisiko der Hepatitis E in Subsahara-Afrika zu minimieren.

Zur Beurteilung der Verteilung von HEV Varianten in Nagern und Fledermäusen angesichts ihres zoonotischen Potentials, wurden 278 Nager- und 78 Fledermausproben untersucht, die von mehreren Spezies und aus verschiedenen geografischen Regionen in China stammten. HEV Varianten wurden in zwei Nagetierarten gefunden, einschließlich Chevriert-Waldmäusen (*Apodemus chevrieri*, Familie *Muridae*) und Père-David-Rötelmaus (*Eothenomys melanogaster*, Familie *Cricetidae*), sowie in der Schnurrbartfledermaus (*Myotis davidii*, Familie *Vespertilionidae*). Es wird vermutet, dass zwei mutmaßliche neuartige Genotypen HEV-C3 und HEV-C4 der Spezies *Orthohepevirus C* zugewiesen werden können und Fledermaus-HEV in China einen unabhängigen Genotypen (HEV-D2) innerhalb der Spezies *Orthohepevirus D* darstellt. Die aus der vorliegenden Promotionsarbeit zu zoonotischen Transmission von HEV vorgefundenen Ergebnisse helfen unser Wissen über HEV Infektionen in den Ordnungen Rodentia und Chiroptera zu verbessern und erlauben neue Einblicke in den Ursprung, Entwicklung und Wirtsspektrum von HEV.

Abschließend, dieses Projekt hat das Verständnis der molekularen Epidemiologie und des klinischen Ergebnisses von HEV Varianten weiter verbessert.