



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

Mr sc. vet. med. Diana Lupulović

**Razvoj i primena različitih laboratorijskih
metoda za dijagnostikovanje infekcije
izazvane hepatitis E virusom kod
svinja i ljudi**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2013.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

1. Prof.dr Branislav Lako, redovni profesor, mentor

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Uža naučna oblast: Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja

(potpis)

2. Dr Sava Lazić, naučni savetnik, član

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"

Uža naučna oblast: Mikrobiologija i zarazne bolesti životinja

(potpis)

3. Prof dr. Slavica Knežević-Ušaj, vanredni profesor, član

Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Uža naučna oblast: Patologija

(potpis)

4. Prof dr. Mladen Gagrčin, redovni profesor, član

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Uža naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

(potpis)

5. Dr Tamaš Petrović, viši naučni saradnik, član

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"

Uža naučna oblast: Mikrobiologija i zarazne bolesti životinja

(potpis)

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Diana Lupulović
AU

Mentor: dr sc. Branislav Lako, redovni profesor
MN

Naslov rada: Razvoj i primena različitih laboratorijskih
NR metoda za dijagnostikovanje infekcije izazvane
hepatitis E virusom kod svinja i ljudi

Jezik publikacije: Srpski
JP

Jezik izvoda: Srpski/Engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2013.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja 8/stranica 162/slika 26/tabela 25
FO grafikona 6/ referenci 246

Naučna oblast: Veterinarska medicina
NO

Naučna disciplina: Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Hepatitis E virus, infekcija, dijagnostika, svinje, ljudi
PO

UDK: 616.36-002:599.731.1(043.3)

Čuva se: Biblioteka, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u ČU
Novom Sadu

Važna napomena:
VN

Izvod:
IZ

Hepatitis E virus (HEV) je uzročnik akutne hepatitis E infekcije kod ljudi. HEV se prenosi putem zagađene vode i odgovoran je za nastanak mnogobrojnih epidemija velikih razmera u zemljama u razvoju Azije i Afrike. Hepatitis E je prvi put kod svinja izolovan 1997. godine, a kasnije je dokazan i kod ostalih životinjskih vrsta, kao što su: divlje svinje, jelen, zečevi, pacovi, ptice i ostalo.

Prva istraživanja prisustva HEV infekcije kod domaćih i divljih svinja u Srbiji sprovedena su 2008. godine. HEV RНК je dokazana u 30% uzoraka fecesa i 45% uzoraka organa (Petrovic et al., 2008). Analizom uzoraka krvnih seruma svinja u individualnim gazdinstvima ustanovljena je seroprevalencija od 34,6% (Lupulovic et al, 2010). Cilj ovog istraživanja je ispitivanje raširenosti HEV infekcije kod svinja na farmama na teritoriji Vojvodine, kao i ispitivanje HEV seroprevalencije kod ljudi u Vojvodini.

Od metoda za istraživanje korišćene su: nekomercijalni ELISA test (*in-house* ELISA), komercijalni ELISA test, Western-blot metod, real-time RT -PCR i imunohistohemijska metoda za detekciju HEV antigena.

Materijal za ispitivanje su bili uzorci krvi svinja (300) sa 3 farme na teritoriji Južne Bačke i Srema i uzorci krvi ljudi (294), kao i uzorci fecesa, žuči, jetre i mesa sakupljeni u klanicama od 95 tovljenika i 50 prasadi.

Prisustvo specifičnih antitela IgG klase protiv hepatitis E virusa dokazano je kod svinja na sve tri ispitujuće farme. Primenom *in house* ELISA testa ustanovljena je seroprevalencija od 37% na farmi A, 31% na farmi B i 54% na farmi C, dok je primenom komercijalnog ELISA testa utvrđeno 40% seropozitivnih svinja na farmi A, 41% na farmi B i 65% na farmi C. U poređnom analizom rezultata dobijenih sa oba ELISA testa, ustanovljena je prosečna seroprevalencija od 40,66% *in house* ELISA testom, odnosno 48,66% komercijalnim ELISA testom.

Sprovedena su i istraživanja prisustva specifičnih antitela IgG klase protiv HEV u krvnim serumima dobrovoljnih davalaca krvi i kod pacijenata. Primenom *in house* ELISA testa utvrđena je

seroprevalencija od 15% kod dobrovoljnih davalaca krvi, dok su uzorci krvi pacijenata bili seronegativni. Testiranjem komercijalnim ELISA testom kod dobrovoljnih davalaca krvi pozitivan serološki nalaz je ustanovljen kod 17,86% dobrovoljnih davalaca krvi (pregledani su serumi koji su u *in house* testu dali pozitivan ili sumnjiv nalaz, kao i određen broj seronegativnih uzoraka), a kod pacijenata 2,12%.

Kao tzv. „zlatni standard“ za definisanje rezultata sa sumnjivim serološkim nalazom čije su ekstinkcije bile blizu cut off vrednosti u *in house* ELISA testu, korišćen je Western blot metod. Pozitivan rezultat je potvrđen kod 6 od ukupno pregledanih 11 uzoraka krvi svinja, odnosno od ukupno pregledanih 11 uzoraka seruma ljudi, pozitivan nalaz je ustanovljen kod 7 uzoraka.

Uzorci sa klanica pregledani su real-time RT-PCR metodom, a HEV RNK je dokazana u u fecesu (54%), žuči (26%), jetri (16%) i mesu (10%) prasadi. Kod tovljenika prisustvo HEV RNK je potvrđeno samo u fecesu (7,27%), dok su svi uzorci tkiva bili negativni.

Patahistološkim pregledom dokazane su mikroskopske lezije II stepena kod 3 uzorka (11,53%) jetri prasadi od ukupno pregledanih 26 uzoraka sa pozitivnim RT-PCR. Imunohistohemijskim pregledom uzoraka jetre prasadi nije dokazano prisustvo antigena hepatitis E virusa.

Definisani su protokoli laboratorijskog ispitivanja hepatitis E infekcije kod svinja i ljudi, kao i u uzorcima mesa i jetri svinja u klanicama.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 12.09.2011
DP

Datum odbrane: 2013.
DO

Članovi komisije: Prof.dr Branislav Lako, redovni profesor
KO Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Uža naučna oblast: Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti

dr Sava Lazić, naučni savetnik
Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"
Uža naučna oblast: Mikrobiologija i zarazne bolesti

Prof dr. Slavica Knežević-Ušaj, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Uža naučna oblast: Patologija

Prof dr. Mladen Gagrčin, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Uža naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

dr Tamaš Petrović, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"
Uža naučna oblast: Mikrobiologija i zarazne bolesti

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: DT
Monograph documentation

Type of record: TR
Textual printed material

Contents code: CC
Doctoral dissertation

Author: AU
Diana Lupulović

Mentor: MN
Branislav Lako, PhD, Full Professor

Title:
Development and application of different laboratory methods for the diagnosis of hepatitis E virus infection in pigs and humans

Language of text: LT
Serbian

Language of abstract: LA
Serbian/English

Country of publication: CP
Serbia

Locality of publication: LP
Vojvodina

Publication year: PY
2013.

Publisher: PU
Authors reprint

Publication place: PP
Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Physical description: PD
Number of chapters 8/pages 162/images 26/tables 25 graphs 6/references 246

Scientific field: Veterinary medicine
SF

Scientific discipline: Veterinary Microbiology and Animal Infectious Diseases
SD

Subject, Key words: Hepatitis E virus, infection, diagnostic, pigs, humans
SKW

UDC: 616.36-002:599.731.1(043.3)

Holding data: Library, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
HD

Note:
N

Abstract:
AB

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute hepatitis E infection in humans. HEV is transmitted through contaminated water and is responsible for the outbreaks of many large-scale epidemics in the developing countries of Asia and Africa. Swine HEV was first isolated in 1997, and was later detected in other animal species, such are: wild boar, deer, rabbits, rats, birds and more.

The first investigations of HEV infection in domestic and wild pigs in Serbia were carried out in 2008. HEV RNA was detected in 30% of faecal samples and 45% of the tissue samples (Petrovic et al., 2008). Analysing the blood samples of backyard pigs, the seroprevalence of 34,6% was determined (Lupulovic et al, 2010). The aim of this study was to investigate the prevalence of HEV infection in pigs on farms in Vojvodina, as well as testing the HEV seroprevalence in humans.

The methods used for this study were: non-commercial ELISA (*in house* ELISA), the commercial ELISA, Western blot method, real-time RT-PCR and immunohistochemical method for the detection of HEV antigen.

Material for the study were: blood samples of pigs (300) from 3 farms on the territory of South Backa and Srem and blood samples of people (294), as well as faeces, bile, liver and meat collected in slaughterhouses from 95 fatteners and 50 piglets.

The presence of specific IgG antibodies against the hepatitis E virus in pigs has been detected on all three examined farms. Upon the application of *in house* ELISA, the seroprevalence of 37% was established on farm A, 31% in farm B and 54% on farm C, while using a commercial ELISA, 40% of seropositive pigs were detected on farm A, 41% of fami B and 65% Farm C. The comparative analysis of the results obtained with both ELISA, determined the average seroprevalence of 40,66% by *in house* ELISA and 48,66% by commercial ELISA.

The research of the presence of specific IgG antibodies against HEV in the serum of blood donors and patients were also conducted. Upon the application of *in house* ELISA, the seroprevalence of 15% were recorded in blood donors, while blood samples of patients were seronegative. Testing by commercial ELISA, positiv serological findings were diagnosed in 17,86% of blood donors (serums with positive or suspicious results in *in house* ELISA and a number of seronegative samples were tested), and in patients 2, 12%.

As so-called "gold standard" for defining the serological results with suspiciousserological findings, which extinctions were close to cut off values in *in house* ELISA, we used the Western

blot method. The positive result was confirmed in 6 of 11 blood samples of pigs, while in 11 tested human serums, the positive result was established in 7 samples.

Samples from slaughterhouses were examined by real-time RT-PCR method, and HEV RNA has been detected in feces (54%), bile (26%), liver (16%) and meat (10%) of piglets. In fatteners, the presence of HEV RNA was confirmed only in feces (7.27%), while all tissue samples were negative.

Pathohistological examination has proved the presence of microscopic lesions grade II, which were detected in 3 piglet liver samples (11,53%) of 26 tested samples with positive RT-PCR result. The HEV antigen was not identified in liver samples of piglets by immunohistochemical examination.

The laboratory protocols were defined for hepatitis E infection in pigs and humans, as well as in meat and liver samples of pigs in slaughterhouses.

Accepted on Scientific Board on: 12.09.2011.

AS

Defended: 2013.

DE

Thesis Defend Board:

DB

Branislav Lako, PhD, Full Professor,
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Scientific discipline: Veterinary Microbiology and Infectious
Diseases

Sava Lazic, PhD, Scientific Advisor, member
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad"
Scientific discipline: Microbiology and Infectious Diseases

Slavica Knezevic-Ušaj, PhD, Associate Professor
Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Scientific discipline: Pathology

Mladen Gagrčin, PhD, Full Professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of
animal products

Tamas Petrovic, PhD, Senior Research Associate
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad"
Scientific discipline: Microbiology and Infectious Diseases

Razvoj i primena različitih laboratorijskih metoda za dijagnostikovanje infekcije izazvane hepatitis E virusom kod svinja i ljudi

Sažetak

Hepatitis E virus (HEV) je uzročnik akutne hepatitis E infekcije kod ljudi. HEV se prenosi putem zagađene vode i odgovoran je za nastanak mnogobrojnih epidemija velikih razmera u zemljama u razvoju Azije i Afrike. Hepatitis E je prvi put kod svinja izolovan 1997. godine, a kasnije je HEV dokazan i kod ostalih životinjskih vrsta, kao što su: divlje svinje, jelen, zečevi, pacovi, ptice i ostalo.

Prva istraživanja prisustva HEV infekcije kod domaćih i divljih svinja u Srbiji sprovedena su 2008. godine. HEV RNK je dokazana u 30% uzoraka fecesa i 45% uzoraka organa (Petrovic et al., 2008). Analizom uzoraka krvnih seruma svinja u individualnim gazdinstvima ustanovljena je seroprevalencija od 34,6% (Lupulovic et al, 2010). Cilj ovog istraživanja je ispitivanje raširenosti HEV infekcije kod svinja na farmama na teritoriji Vojvodine i ispitivanje HEV seroprevalencije kod ljudi u Vojvodini.

Od metoda za istraživanje korišćene su: nekomercijalni ELISA test (*in-house* ELISA), komercijalni ELISA test, Western-blot metod, real-time RT-PCR i imunohistohemijska metoda za detekciju HEV antigena.

Materijal za ispitivanje su bili uzorci krvi svinja (300) sa 3 farme na teritoriji Južne Bačke i Srema i uzorci krvi ljudi (294), kao i uzorci fecesa, žuči, jetre i mesa sakupljeni u klanicama od 95 tovljenika i 50 prasadi.

Prisustvo specifičnih antitela IgG klase protiv hepatitis E virusa dokazano je kod svinja na sve tri ispitujuće farme. Primenom *in house* ELISA testa ustanovljena je seroprevalencija od 37% na farmi A, 31% na farmi B i 54% na farmi C, dok je primenom komercijalnog ELISA testa utvrđeno 40% seropozitivnih svinja na farmi A, 41% na farmi B i 65% na farmi C. Uporednom analizom rezultata dobijenih sa oba ELISA testa, ustanovljena je prosečna seroprevalencija od 40,66% *in house* ELISA testom, odnosno 48,66% komercijalnim ELISA testom.

Sprovedena su i istraživanja prisustva specifičnih antitela IgG klase protiv HEV u krvnim serumima dobrovoljnih davalaca krvi i kod pacijenata. Primenom *in house* ELISA testa utvrđena je seroprevalencija od 15% kod dobrovoljnih davalaca krvi, dok su uzorci

krvi pacijenata bili seronegativni. Testiranjem komercijalnim ELISA testom kod dobrovoljnih davalaca krvi pozitivan serološki nalaz je ustanovljen kod 17,86% dobrovoljnih davalaca krvi (pregledani su serumi koji su u *in house* testu dali pozitivan ili sumnjiv nalaz, kao i određen broj seronegativnih uzoraka), a kod pacijenata 2,12%.

Kao tzv. „zlatni standard“ za definisanje rezultata sa sumnjivim serološkim nalazom čije su ekstinkcije bile blizu cut off vrednosti u *in house* ELISA testu, korišćen je Western blot metod. Pozitivan rezultat je potvrđen kod 6 od ukupno pregledanih 11 uzoraka krvi svinja, odnosno od ukupno pregledanih 11 uzoraka seruma ljudi, pozitivan nalaz je ustanovljen kod 7 uzoraka.

Uzorci sa klanica pregledani su real-time RT-PCR metodom, a HEV RNK je dokazana u fecesu (54%), žuči (26%), jetri (16%) i mesu (10%) prasadi. Kod tovljenika prisustvo HEV RNK je potvrđeno samo u fecesu (7,27%), dok su svi uzorci tkiva bili negativni.

Patahistološkim pregledom dokazane su mikroskopske lezije II stepena kod 3 uzorka (11,53%) jetri prasadi od ukupno pregledanih 26 uzoraka sa pozitivnim RT-PCR. Imunohistohemijskim pregledom uzoraka jetre prasadi nije dokazano prisustvo antigena hepatitis E virusa.

Definisani su protokoli laboratorijskog ispitivanja hepatitis E infekcije kod svinja i ljudi, kao i u uzorcima mesa i jetri svinja u klanicama.

Ključne reči: Hepatitis E virus, infekcija, dijagnostika, svinje, ljudi

Development and application of different laboratory methods for the diagnosis of hepatitis E virus infection in pigs and humans

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute hepatitis E infection in humans. HEV is transmitted through contaminated water and is responsible for the outbreaks of many large-scale epidemics in the developing countries of Asia and Africa. Swine HEV was first isolated in 1997, and HEV was later detected in other animal species, such as: wild boar, deer, rabbits, rats, birds and more.

The first investigations of HEV infection in domestic and wild pigs in Serbia were carried out in 2008. HEV RNA was detected in 30% of faecal samples and 45% of the tissue samples (Petrovic et al., 2008). Analysing the blood samples of backyard pigs, the seroprevalence of 34,6% was determined (Lupulovic et al, 2010). The aim of this study was to investigate the prevalence of HEV infection in pigs on farms in Vojvodina, as well as testing the HEV seroprevalence in humans.

The methods used for this study were: non-commercial ELISA (*in house* ELISA), the commercial ELISA, Western blot method, real-time RT-PCR and immunohistochemical method for the detection of HEV antigen.

Material for the study were: blood samples of pigs (300) from 3 farms on the territory of South Backa and Srem and blood samples of people (294), as well as faeces, bile, liver and meat collected in slaughterhouses from 95 fatteners and 50 piglets.

The presence of specific IgG antibodies against the hepatitis E virus in pigs has been detected on all three examined farms. Upon the application of *in house* ELISA, the seroprevalence of 37% was established on farm A, 31% in farm B and 54% on farm C, while using a commercial ELISA, 40% of seropositive pigs were detected on farm A, 41% of farm B and 65% Farm C. The comparative analysis of the results obtained with both ELISA, determined the average seroprevalence of 40,66% by *in house* ELISA and 48,66% by commercial ELISA.

The research of the presence of specific IgG antibodies against HEV in the serum of blood donors and patients were also conducted. Upon the application of *in house* ELISA, the seroprevalence of 15% were recorded in blood donors, while blood samples of patients were seronegative. Testing by commercial ELISA, positive serological findings

were diagnosed in 17,86% of blood donors (serums with positive or suspicious results in *in house* ELISA and a number of seronegative samples were tested), and in patients 2, 12%.

As so-called "gold standard" for defining the serological results with suspicious serological findings, which extinctions were close to cut off values in *in house* ELISA, we used the Western blot method. The positive result was confirmed In 6 of 11 blood samples of pigs, while in 11 tested human serums, the positive result was established in 7 samples.

Samples from slaughterhouses were examined by real-time RT-PCR method, and HEV RNA has been detected in feces (54%), bile (26%), liver (16%) and meat (10%) of piglets. In fatteners, the presence of HEV RNA was confirmed only in feces (7.27%), while all tissue samples were negative.

Pathohistological examination has proved the presence of microscopic lesions grade II, which were detected in 3 piglet liver samples (11,53%) of 26 tested samples with positive RT-PCR result. The HEV antigen was not identified in liver samples of piglets by immunohistochemical examination.

The laboratory protocols were defined for hepatitis E infection in pigs and humans, as well as in meat and liver samples of pigs in slaughterhouses.

Key words: Hepatitis E virus, infection, diagnostic, pigs, humans

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Istorijat	3
2.2. Etiologija	4
2.2.1. Taksonomija	4
2.2.2. Morfologija, organizacija genoma i replikacija	6
2.2.3. Osobine virusa	9
2.3. Epidemiologija	11
2.3.1. HEV infekcija kod ljudi	11
2.3.2. Životinje kao rezervoari HEV	12
2.4. Transmisija HEV	17
2.4.1. Transmisija putem vode	17
2.4.2. Eksperimentalna transmisija virusa među vrstama	17
2.4.3. Zoonotska transmisija virusa	17
2.4.4. Transmisija putem krvi	19
2.4.5. Perinatalna transmisija	20
2.4.6. Transmisija HEV putem transplantacije organa	20
2.4.7. Transmisija putem hrane	21
2.4.8. HEV kao zagađivač životne sredine	24
2.5. Patogeneza i imunološki odgovor	24
2.6. Klinička slika	29
2.7. Patomorfološke promene	32
2.8. Dijagnostičke metode	36
2.8.1. Serološki testovi - ELISA testovi	37
2.8.2. Molekularna metode - RT PCR i real-time RT- PCR	40
2.8.3. Western blot tehnika	44
2.8.4. Imunohistohemijska metoda	45
2.8.5. <i>In situ</i> hibridizacija	45
2.8.6. Imunofluorescentna mikroskopija (IFE)	46
2.8.7. Imunoelektronska mikroskopija (IEM)	46
2.8.8. Izolacija virusa	46
2.9. Terapija i profilaksa	46

3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	51
4.	MATERIJAL I METODE	52
4.1.	Materijal	52
4.1.1.	Uzorci fecesa na farmama	52
4.1.2.	Uzorci krvi svinja i ljudi	52
4.1.3.	Uzorci u klanicama	54
4.2.	Metode	55
4.2.1.	Nekomercijani imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod svinja	55
4.2.2.	Komercijani imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod svinja	59
4.2.3.	Nekomercijani imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod ljudi	60
4.2.4.	Komercijani imunoenzimski test za dokazivanje specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod ljudi	61
4.2.5.	Western blot	62
4.2.6.	Real-time RT-PCR	68
4.2.7.	Patohistološko i imunohistohemijsko ispitivanje	73
4.2.8.	Utvrđivanje postojanja epidemioške povezanosti između infekcija kod svinja i ljudi i nalaz HEV RNK u uzorcima na klanicama	75
4.2.9.	Statistička obrada podataka	75
5.	REZULTATI ISPITIVANJA	77
5.1.	Rezultati ispitivanja prisustva HEV RNK u fecesu svinja	77
5.2.	Rezultati seroloških ispitivanja krvnih seruma svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV	78
5.2.1.	Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma svinja <i>in house</i> ELISA testom	78
5.2.2.	Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma svinja komercijalnim ELISA testom	83
5.2.3.	Uporedni prikaz seroloških ispitivanja krvi svinja na prisustvo spec. antitela protiv HEV <i>in house</i> i komercijalnim ELISA testovima	88
5.3.	Rezultati seroloških ispitivanja krvnih serua ljudi na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV	90
5.3.1.	Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi <i>in house</i> ELISA testom ..	90
5.3.2.	Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi komercijalnim ELISA testom	93
5.3.3.	Uporedni prikaz seroloških ispitivanja krvi ljudi na prisustvo spec. antitela protiv HEV <i>in house</i> i komercijalnim ELISA testovima	94
5.4.	Rezultati ispitivanja krvnih seruma svinja i ljudi Western blot metodom	96
5.5.	Rezultati detekcije HEV RNK u organima i fecesu svinja	97
5.6.	Patohistološko i imunohistohemijsko ispitivanje jetri svinja	99

5.7. Protokol laboratorijskog ispitivanja	102
5.8. Rezultati utvrđivanja epidemiloške povezanosti između infekcija kod svinja i ljudi	103
6. DISKUSIJA	105
6.1. Utvrđivanje prisustva HEV RNK u fecesu svinja na farmama	105
6.2. Serološko ispitivanje prisustva spec. antitela protiv HEV kod svinja	106
6.3. Serološko ispitivanje prisustva spec. antitela protiv HEV kod ljudi	111
6.4. Westen blot analiza krvnih seruma svinja i ljudi	116
6.5. Detekcija HEV genoma real-time RT-PCR metodom u uzorcima svinja u klanicama	117
6.6. Utvrđivanja epidemiloške povezanosti između infekcija kod svinja i ljudi	119
6.7. Patohistološko i imunohistohemijsko ispitivanje jetri svinja	120
7. ZAKLJUČCI	122
8. LITERATURA	124

1. UVOD

Hepatitis E virus (HEV) izaziva infekciju kod ljudi sa kliničkim znacima akutnog hepatitisa. HEV se prvenstveno prenosi putem zagađene vode i naročito su ugrožene zemlje u razvoju u Aziji, Srednjem i Dalekom Istoku i Africi, u kojima su higijenski i sanitarni uslovi na niskom nivou. Prvi objavljeni podaci o pojavi epidemije datiraju iz 1955-1956 godine. Međutim, zabeležena je relativno vioka HEV seroprevalencija i kod ljudi u razvijenim zemljama Evrope, u USA i Japanu, koje nisu endemska područja, tako da se pojavila sumnja da životinje mogu biti rezervoari virusa. Nakon dokaza i prve izolacije hepatitis E virusa kod svinja (Meng et al., 1997), HEV je dokazan i kod divljih svinja, jelena, ptica, pacova, i dr. Ubrzo je potvrđen i zoonotski potencija virusa, što je i dokazano nakon infekcije ljudi koji su kozumirali nedovoljno termički obrađeno meso i jetre jelena i divlje svinje (Tei et al., 2003; Li et al., 2005; Masuda et al., 2005).

HEV pripada porodici Hepeviridae, rodu Hepevirus. Do sada su opisana četiri genotipa sisara (HEV 1- 4). Genotipovi 1 i 2 izazivaju epidemije samo kod ljudi u zemljama u razvoju, dok su genotipovi 3 i 4 dokazani i kod ljudi i kod životinja i odgovorni su za sporadične slučajeve infekcije u celom svetu.

Klinička slika oboljenja kod ljudi se manifestuje znacima žutice, abdominalnim bolovima, povišenom temperaturom, povraćanjem i mučninom. Mortalitet je uglavnom nizak(0.2-3%), ali je kod trudnica u trećem trimestru trudnoće smrtnost izuzetno visoka (15-25%). Kod svinja bolest protiče asimptomatski.

Patogeneza HEV infekcije kod ljudi se karakteriše inkubacionim periodom od 2 nedelje do 2 meseca sa prosekom od 40 dana. Viremija je kratkotrajna i nestaje sa pojavom kliničkih simptoma bolesti. Fekalno izlučivanje virusa započinje nekoliko dana pre pojave žutice (najčešće 5 dana) i traje još oko 2-3 nedelje. Kod svinja se infekcija najčešće javlja u uzrastu od 2-3 meseca, odmah nakon prestanka zaštitnog dejstva maternalnih antitela. Inficirane svinje imaju prolaznu viremiju u trajanju od 1-2 nedelje i izlučuju virus u fecesu oko 3-7 nedelja. Kod odraslih svinja se virus ređe javlja u fecesu, ali su ove životinje značajne kao rezervoari virusa i izvor infekcije.

Hepatitis E virus se pominje i kao značajan uzročnik kontaminacije hrane. Virus lako ulazi u lanac ishrane putem inficiranih svinja na liniji klanja. Postoje nalazi HEV u

uzorcima jetre, žuči i fecesa svinja u klanicama, odnosno u jetrama i kobasicama u mesarama (Berto et al., 2012; Feagins et al., 2007).

Zbog gore navedenih podataka, odlučili smo da ispitamo raširenost HEV infekcije kod svinja u industrijskom načinu uzgoja, kao i seroprevalencu kod dobrovoljnih davalaca krvi i pacijenata u Vojvodini. Deo ispitivanja se odnosi na i na analizu uzoraka organa svinja i prasadi na liniji klanja. Značajan naučni doprinos ovog istraživanja predstavlja razvoj novih laboratoriskih tehnika koje će naći primenu u rutinskoj dijagnostici. Rezultati ispitivanja treba da omoguće nova saznanja o hepatitis E virusu, potencijalnom riziku koji ima kao uzročnik kontaminacije hrane, kao i prisustvo infekcije kod dobrovoljnih davalaca krvi, što ima direktni uticaj na javno zdravlje.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ISTORIJAT

Prvi dokumentovani zapisi o pojavi infekcije kod ljudi izazvane hepatitis E virusom (HEV) potiču iz 1955-1956. godine (Vishwanathhan, 1957). Uzrok izbijanja velike epidemije, koja je tada pripisana uzročniku hepatitisa A a tek kasnije potvrđena kao hepatitis E infekcija (Purcell and Emerson, 2001), bila je zagađena reka Jumna u Indiji, čija se voda koristila za navodnjavanje obradivog zemljišta. Za vreme te epidemije je obolelo više od 30.000 ljudi. U Kini je do sada potvrđeno izbijanje najmanje 11 epidemija izazvanih hepatitis E virusom. Jedna od najvećih epidemija desila se u periodu od 1986. do 1988. godine, kada je obolelo više od 119.000 hiljada ljudi, a 700 je umrlo (Smith, 2001).

Balayan i saradnici 1983. godine su prvi identifikovali uzročnik hepatitis E infekcije. Ispitivanje je obuhvatalo volontere-dobrovoljce koji su zaraženi oralnim putem ekstraktom fecesa pacijenata obolelih od uzročnika izazivača žutice, za koji je potvrđeno da nije pripadao ni A ni B hepatitisu. Kod volontera su se razvili znaci akutne žutice sa epigastričnim bolovima, povraćanjem, groznicom, tamnom mokraćom i žutim prebojavanjem kože i beonjača. U fecesu dobrovoljaca je elektronskim mikroskopom detektovana virusna čestica dijametra oko 27 nm. Isti istraživači su takođe uspeli da intravenoznom inokulacijom ekstrakta fecesa obolelih ljudi od HEV infekcije inficiraju i *cinomolpus majmune*.

Tokom 1989. godine Tam i saradnici su eksperimentalno inficirali macaque majmune virusom hepatitisa E i uspeli po prvi put da kloniraju i sekvenciraju virusni genom iz fecesa obolelih životinja.

Prvi pokušaj da se potvrdi postojanje HEV kod svinja izvršili su Balayan i sar. 1990 godine. U svom eksperimentu uspeli su da inficiraju svinje uzročnikom HEV ljudi, ali je kasnije potvrđeno da je taj uzročnik najverovatnije bio poreklom od svinja (Lu et al, 2004).

Kod svinja su nalazi specifičnih antitela protiv HEV, kao i virusne RNK prvi put opisani u Nepal (Clayson et al, 1995), ali uzročnik nije izolovan. Meng i saradnicu su 1997. godine prvi put identifikovali virus hepatitisa E kod svinja u Americi. Ispitan je veliki broj svinja na komercijalnim farmama u Americi i ustanovljeno je da virus prirodno cirkuliše kod većine odraslih jedinki, kod kojih su ustanovljena antitela protiv HEV. Virus hepatitisa E svinja je izolovan i sekvenciran. Dokazano je da se hepatitis E virus svinja značajno razlikovao od do data potvrđenih humanih sojeva izolovanih prethodno u Aziji

(genotip 1) i u Meksiku (genotip 2). Izolovani HEV kod svinja definisan je kao genotip 3. Od tada je prisustvo HEV infekcije kod svinja potvrđeno u mnogim zemljama, kao što su: Španija, Holandija, Novi Zeland, Francuska, Japan, Kanada, Portugalija, Nemačka, Srbija i dr.

Pojavila su se i prva upozorenja da HEV infekcija može biti i zoonoza. Specifična antitela protiv HEV detektovana su kod obolelih ljudi u razvijenim, industrijalizovanim zemljama koji nisu putovali u ugrožena, endemska područja niti su imali kontakt sa svinjama. U istraživanju koje je obuhvatalo normalnu populaciju ljudi i dobrovoljnih davaoca krvi u SAD, koja ne predstavlja endemsko područje, ustanovljen je visok nivo anti-HEV antitela. Kod dobrovoljnih davalaca krvi taj procenat je iznosio 21,3% (Thomas et al., 1997). Dokazano je da veterinari, uzgajivači svinja i ljudi u kontaktu sa svinjama imaju takođe visok nivo anti-HEV antitela (Hsieh et al., 1999; Meng et al., 2002.; Drobeniac et al., 2001).

Iako je već bilo opisano da su svinje rezervoari bolesti, pojavila se sumnja da i druge životinjske vrste mogu biti nosioci virusa. Prvi slučaj infekcije pacova HEV virusom u Sovjetskom Savezu opisali su Karenyi i saradnici 1993. godine. Nakon toga, antitela protiv HEV dokazana su kod zečeva, zatim kod divljih svinja i drugih domaćih životinja kao što su ovce, goveda, mačke, konji i živina (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2010; Saad 2007; Bilam et al., 2005)

Usledili su i dokazi da su sporadični slučajevi akutnog hepatitisa E kod pacijenata u Japanu posledica konzumiranja sirovih ili nedovoljno termički obrađenih jetri svinja i mesa divljih svinja (Yazaki et al., 2003; Li et al., 2005). Tai i sar. (2003) su opisali akutnu HEV infekciju kod ljudi koji su takođe jeli nedovoljno termički obrađeno meso jelena.

Hepatitis E virus je na taj način potvrđen kao zoonozni uzročnik, koji predstavlja potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje. Sve više pažnje je bilo usmereno ka daljem istraživanju ovog virusnog agensa.

2.2. ETIOLOGIJA

2.2.1 Taksonomija

Virusni hepatitis E izazivaju inflamatorne poremećaje jetre. Do sada su opisani hepatitis A, B, C, D i E čiji su uzročnici virusni agensi. Nomenklatura hepatitis E virusa se tokom prethodnog perioda veoma često menjala. Na osnovu svoje sličnosti u morfologiji i organizaciji genoma sa calicivirusima, HEV je najpre svrstan u familiju Caliciviridae (Tam

et al, 1991). Daljim ispitivanjem uočeno je da HEV na 5' kraju genoma poseduje ne-strukturni cap protein koji je veoma sličan ne-strukturnom proteinu alphavirusa, pa je premešten u familiju *Togaviridae* (Koonin et al, 1992). Međutim, ubrzo je primećeno, da iako ima neke slične osobine sa sa ovom familijom virusa, poseduje dovoljno svojstva koja su ovaj virus klasifikovala u poseban rod *Hepevirus* u okviru nove familije *Hepeviridae* (Emerson et al., 2004).

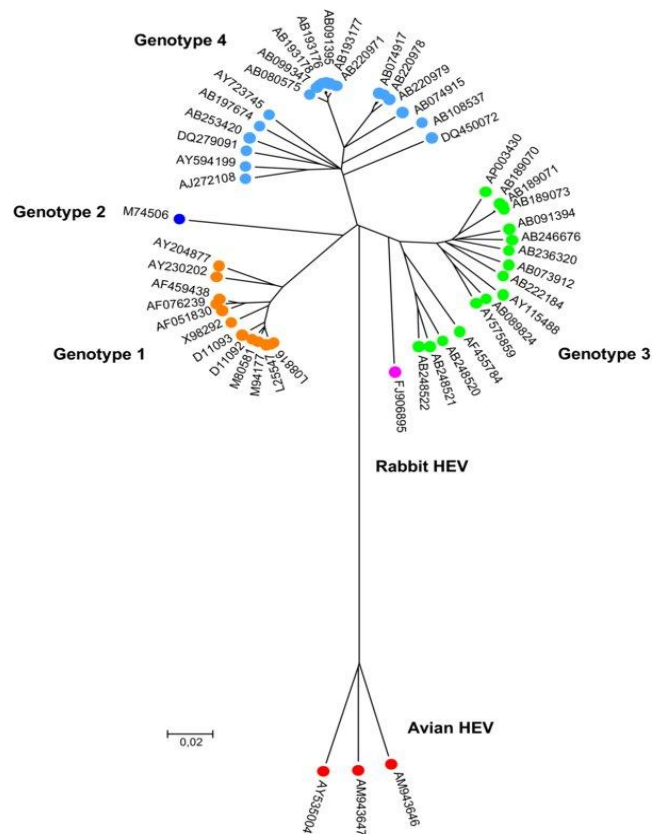
Na osnovu do sada utvrđenih sekvenci hepatitis E virusa, postoje najmanje 4 genotipa sisara (1-4) i jedan genotip ptica (Schlauder et al., 1999; Meng et al., 2009; Haqshenas et al., 2001). Genotip 1 i genotip 2 su humani genotipovi koji izazivaju hepatitis E kod ljudi. Najčešće su uzročnici velikih epidemija u endemskim područjima gde glavni izvor infekcije predstavlja zagađena voda. Genotip 1 (Burmese soj) se javlja u zemljama u razvoju u Aziji i Africi, a genotip 2 je otkriven u Meksiku i nekim delovima Afrike (u Nigeriji i Čadu). Genotipovi 3 i 4 su identifikovani i kod ljudi i kod životinja, kao što su: domaće svinje, divlje svinje, jeleni, goveda i dr. Kod ljudi, HEV genotip 3 je odgovoran za sporadične slučajeve hepatitisa E u industrijalizovanim zemljama Evrope, SAD i Japana, dok je genotip 4 identifikovan uglavnom u nekim azijskim zemljama (Kina, Japan i Indija). Genotip 3 svinja do sada je opisan kod svinja u Evropi, a genotip 4 izolovan je kod svinja u Aziji. Nedavno je zabeležen i prvi slučaj infekcije svinja sa HEV genotip 4 i u Evropi (Hakze-van der Honing 2011). U područjima gde su izolovani HEV genotipovi 3 i 4 i kod svinja i kod ljudi, ustanovljeno je da su izolati međusobno genetski bili slični i da dele veći broj zajedničkih nukleotidnih sekvenci u odnosu na izolate svinja iz drugog geografskog područja. Hepatitis E genotipovi 1, 2, 3 i 4 su podeljeni, na osnovu svojih nukleotidnih razlika u 24 podtipa, obeleženih abecednim redom: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f i 4g (Lu et al., 2006). Iako postoje različiti genotipovi, za sada je ustanovljeno da postoji samo jedan serotip.

Kod ptica je dokazan HEV virus koji predstavlja jedini zasebni species - *Avian HEV* u okviru roda *Hepevirus*.

Nedavno su izolovani novi sojevi HEV virusa kod zečeva u Kini i iz fecesa pacova u Nemačkoj (Zhao et al., 2008; Johne et al., 2009).

Filogenetsko stablo hepatitis E virusa prikazano je na slici 1.

Slika 1: Filogenetsko stablo hepatitis E virusa

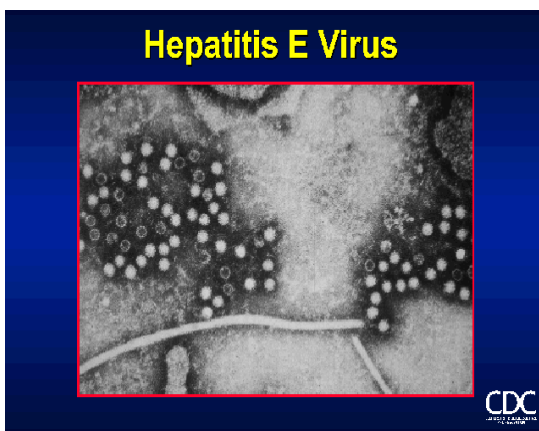


Slika preuzeta iz rada: Pavio et al: Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks (Vet.Res.2010)

2.2.2 Morfologija, organizacija genoma i replikacija

HEV virusna čestica je sferičnog, ikosohedralnog oblika, bez omotača, dijametra od 32-34 nm. Genom HEV sisara čini jednostruka, pozitivno-orijentisana RNK, molekularne mase od 7.2 kb (Slike 2 i 3).

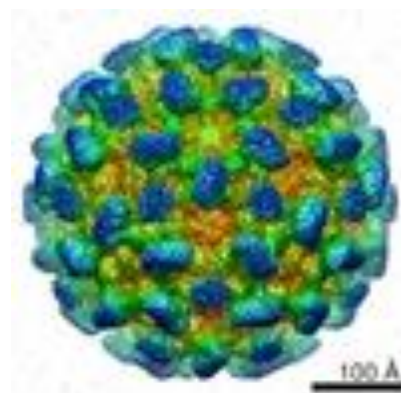
Slika 2: Izgled HEV - elektronski mikroskop



Slika preuzeta sa : www.virology-online.com

(pristupljeno Internetu:23.05.2013)

Slika 3: Ikosohedralna struktura HEV

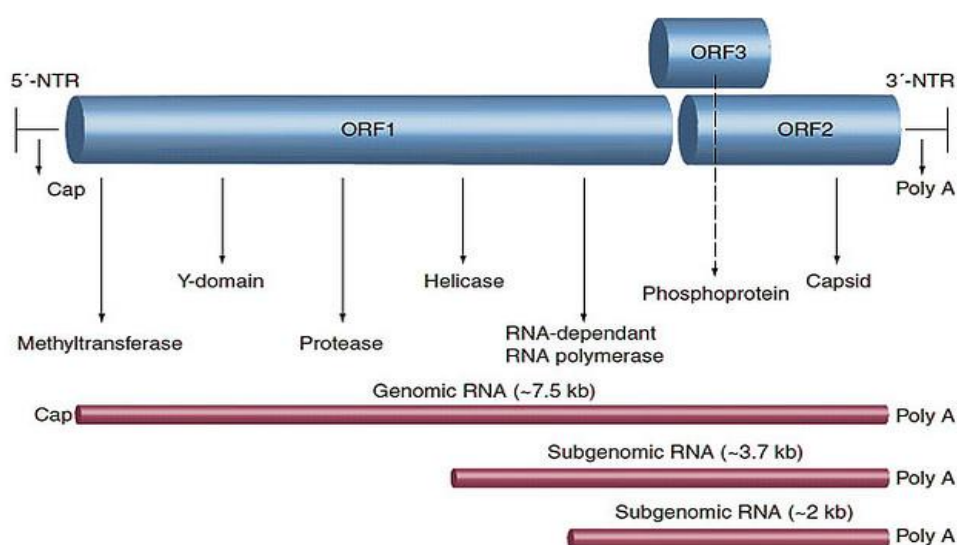


Slika preuzeta sa: EM Data Bank/5173

(pristupljeno Internetu:23.05.2013)

Genom HEV čini RNK i se sastoji od 3 otvorena rama za čitanje (*Open reading frames*) ORF 1, ORF 2 i ORF 3; kratkog 5' kraja na kojem se nalazi nekodirajući region (5' NCR) i 3' kraja sa nekodirajućim regionom (3' NCR). Na 5' kraju virusnog genoma je ustanovljena i cap struktura za koju se predpostavlja da igra ulogu u započinjanju HEV replikacije. ORF 2 region preklapa ORF 3, ali nikad ne prelazi preko ORF 1 (Slika 4).

Slika 4: Struktura genoma hepatitis E virusa



Slika preuzeta sa: www.microbiologybytes.com/virology/HEV

(pristupljeno Internetu: 24.05.2013)

ORF 1 se nalazi na 5' kraju i čini skoro 2/3 celokupnog genoma. Ima ulogu da kodira nestrukturane proteine koji učestvuju u virusnoj replikaciji. U ORF 1 su otkriveni i mnogobrojni funkcionalni domeni, kao što su: methyltransferaze, cistein-proteaze slične papainu, helikaze i RNK-zavisna RNK polimeraza. Aktivnost helikaze i proteaze do danas nije poznata. ORF 2, koji se nalazi na 3' kraju, kodira sintezu kapsidnog proteina od oko 600 aminokiselina dužine. Ovaj protein ima 3 glikozidna imunogena epitopa i indukuje stvaranje neutralizacionih antitela i podsticanje imunološkog odgovora. Zhang i sar. (2008) su otkrili da aminokiselinske rezidue Leu477 i Leu613 u kapsidnom proteinu imaju važnu ulogu u formiranju neutralizacionih antitela. ORF 3 protein je najmanji HEV protein. U genotipovima 1, 2 i 3 poseduje samo 123 aminokiseline a u genotipu 4 samo 114 aminokiseline. ORF 3 region kodira mali fosfoprotein, čija uloga za sada nije poznata, ali

se pretpostavlja da može imati ulogu u virusnoj replikaciji. N kraj ORF 3 regiona je bogat cisteinom, vezuje se za HEV RNK i formira kompleks sa kapsidnim proteinom. C kraj ORF 3 proteina ima više značajnih uloga i smatra se da je uključen u morfologiju i patogenezu virusa. ORF 3 antigen je korišćen za stvaranje prvog ELISA testa za detekciju HEV antitela (Herremans et al., 2007). Veliki napredak u istraživanju morfologije virusa HEV od strane više istraživačkih grupa čini otkrivanje 3D kristalne strukture. Ova istraživanja su otkrila da je kapsid virusne čestice sastavljen od kapsomera, koje čine homodimeri. Ove kapsomere se nalaze na površini viriona i reaguju sa ćelijama domaćina tako što se vezuju za ćelijske receptore i iniciraju virusnu infekciju (Meng, 2010). Takođe je otkriveno da kapsidni protein HEV ORF2 svinja deli 79-80% identičnih nukleotidnih sekvenci i 90-92% amino-kiselinskih sekvenci sa HEV ORF2 ljudi, dok HEV ORF 3 svinja ima 83-85% istih nukleotidnih sekvenci i 77-82% amino-kiselina identičnih sa HEV ljudi (Meng et al., 1997).

Virus avijarnog hepatitisa E se razlikuje od HEV sisara. Genom avijarnog HEV virusa je samo 6,6 kb dugačak, što znači da je za 600 bp kraći od genoma HEV sisara.

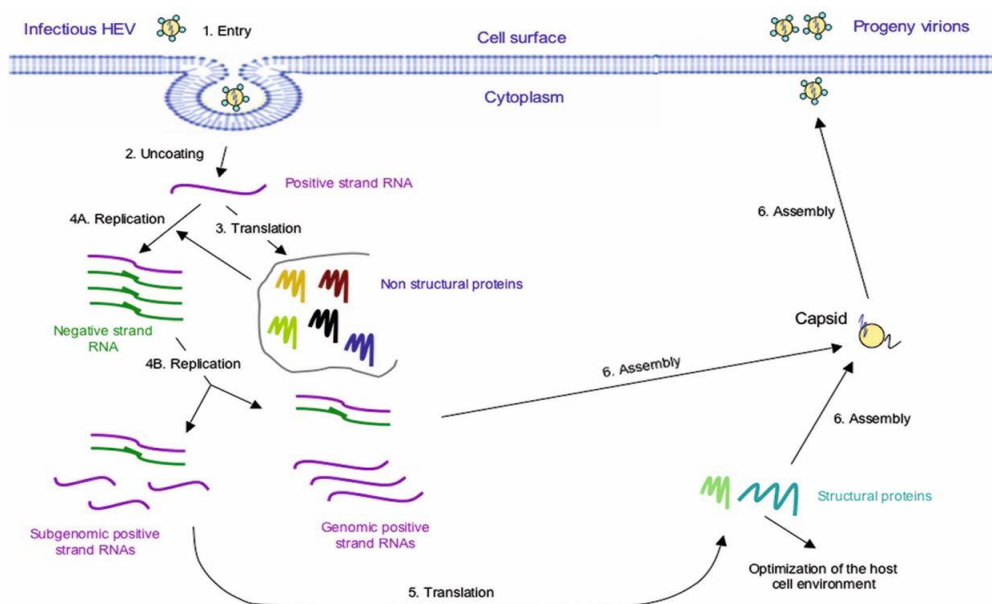
Do sada nije pronađena adekvatna ćelijska kultura koja je pogodna za rast i umnožavanje HEV virusa, tako da su mnogobrojni mehanizmi replikacije, transkripcije i translacije virusa i dalje nepoznati. Testirane su razne ćelijske kulture kao što su: MRC5 i VERO koje predstavljaju ne-hepatotropne ćelije, kao i hepatotropne kulture ćelija HCCM, WRL 68, Hep G2 i PLC/PRF/5. Najbolji HEV signal detektovan PCR tehnikom zapažen je u ćelijskoj kulturi PLC/PRF/5 (Meng et al., 1996). U svom istraživanju, autori Takahashi i sar. (2010) su uspeali da po prvi put umnože HEV poreklom iz fecesa obolelih ljudi u kulturama PLC/PRF/5 i A549. Iste ćelijske kulture su zatim korišćene i za uspešno umnožavanje HEV virusa poreklom iz krvnog seruma 23 pacijenta obolelih od HEV genotip 1, 3 i 4. Ovi rezultati su ohrabrujući i daju mogućnost rasvetljavanja nepoznatih činjenica o mehanizmu virusne replikacije.

Takođe su nedovoljno proučeni i virusni receptori, kao i način prodora virusa u ćeliju. Nedavno je dokazano da peptid p29 ORF 2 formira partikle veličine 23 nm koje se vezuju i penetriraju u ćelije Hep G2, Huh-7, PLC/PRF5 i A549 (He et al 2008).

Model replikacije i ekspresije gena je sačinjen na osnovu poznatih činjenica o replikaciji ostalih pozitivno orijentisanih RNK virusa (slika5). Nakon ulaska u prijemčivu ćeliju (korak 1), virusni genom RNK se olobađa (korak 2) i započinje translacija u citosolu inficirane ćelije i produkcija nestrukturnog polyproteina nsP, koji kodira ORF1 (korak 3). Virusna replikaza vrši replikaciju pozitivne RNK u negativnu RNK (korak 4A). Ovo čini uzorak na osnovu kojeg se vrši sinteza ostalih mnogobrojnih kopija genoma pozitivne

RNK, kao i subgenomskih pozitivnih RNK (korak 4B). Zatim se vrši translacija subgenomske RNK u strukturne proteine (korak 5). Kapsidni proteini pakuju virusni genom i formiraju progeni virion (korak 6), koji napušta ćeliju kroz izlaz u ćeliji koji još uvek nije poznat (Chandra et al., 2008).

Slika 5: Replikacija hepatitisa E virusa



Slika preuzeta iz rada: Chandra V. et al: Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus; *J. Biosci* (2008)

2.2.3 Osobine virusa

Osobine HEV virusa, kao što su: gustina, otpornost na visoke i niske temperature i na jonizujuće zračenje, su opisane od strane nekolicine istraživača. Gustina HEV virusne čestice u CsCL iznosi $1,40 \text{ g/cm}^3$, a u glicerolu $1,29 \text{ g/cm}^3$. Dokazano je da virusna aktivnost ne preživljava dejstvo jonizujućih dezinfekcionih sredstava (Purcell i Emerson, 2001). Literaturni podaci o dejstvu visokih i niskih temperatura na uništavanje HEV virusa su veoma značajni sa stanovišta bezbednosti hrane i konzumiranja jetri i mesa svinja inficiranih HEV agensom. Istraživači Emerson i sar. (2005) su upoređivali termostabilnost Hepatitis E i A virusa. Za ispitivanje je korišćena suspenzija humanih fecesa obolelih ljudi od HEV i HAV virusnih infekcija. Nakon toplotne inaktivacije, ćelijska kultura hepatocita HepG2/C3A je inficirana virusnom suspenzijom. Inficirane ćelije su posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom. Istraživanja su pokazala da je HAV otporniji na visoke

temperature od HEV. Hepatitis A virus je bio oko 50% inaktivisan na temperaturi od 60°C posle 1h, a potpuno je bio uništen na temperaturi od 66°C. Akluj soj HEV genotip 1 je bio 50% inaktivisan na temperaturi od 45° i 50°C, a skoro sve virusne čestice su bile uništene na 56°C. Uočene su i razlike u termostabilnosti i otpornosti između pojedinih HEV genotipova. U ispitivanjima je dokazano da Mex soj HEV genotip 2 pokazuje veću termostabilnost od Akluj soja i na temperaturi od 56°C nije bio inaktivisan, ali je čak 80% virusa bilo inaktivisano na 60°C. Sar55 HEV genotip 1 je pokazao veću termostabilnost od Mex 14 soja, pošto je samo 50% virusnih čestica bilo inaktivisano na temperaturi od 56°C, a 96% na temperaturi od 60°C. Međutim, 1% virusnih čestica i dalje je ostalo infektivno posle kuvanja od 1h na temperaturi od 56°C. Feagins i sar. (2008) su ustanovili da je hepatitis E virus iz jetri inficiranih svinja i dalje stabilan na temperaturi od 56°C i posle 1h kuvanja. Virus je u jetrama svinja bio potpuno uništen kuvanjem i pečenjem na visokim temperaturama. Schielke i sar. (2011) su ispitivali termostabilnost HEV virusa molekularnom metodom real-time RT-PCR. Uzorke suspenzije jetri divljih svinja, koje su sadržavale nemački izolat HEV genotip 3i, su podelili u količine od po 100µL i podvrgnuli raznim temperaturnim uslovima: zagrevanju na temperaturama od 56° do 95° C u različitom vremenskom trajanju; temperaturi od 37 C; sobnoj temperaturi od 22 C i temperaturi frižidera od 4 C. Iz uzoraka je nakon izlaganja različitim temperaturnim uticajima, izolovana virusan RNK i testirana real-time RT-PCR metodom. Virus je na temperaturi od 56° C u trajanju od 30 minuta bio inaktivisan 99,99% (-4,4 log₁₀), na temperaturi od 56° C u trajanju od 15 minuta 74% (-0,59 log₁₀), a na 60° C u trajanju od sat vremena 99,94% (-3,25 log₁₀). Nedovoljna redukcija virusne aktivnosti je zabeležena kod podvrgavanja uzoraka temperaturama od 4°C, 22°C i 37°C, što potvrđuje da je HEV virus sposoban da preživi u prirodi niske temperature. Virusna redukcija log₃ i 4 katagorisane su kao mali rizik od infekcije alimentarnim putem posle kuvanja inficiranog mesa. U ovom istraživanju redukcija log₃ postignuta je posle kuvanja na 90° C u trajanju od 1 minut, a redukcija log₄ na 95° C u trajanju od takođe 1 minut.

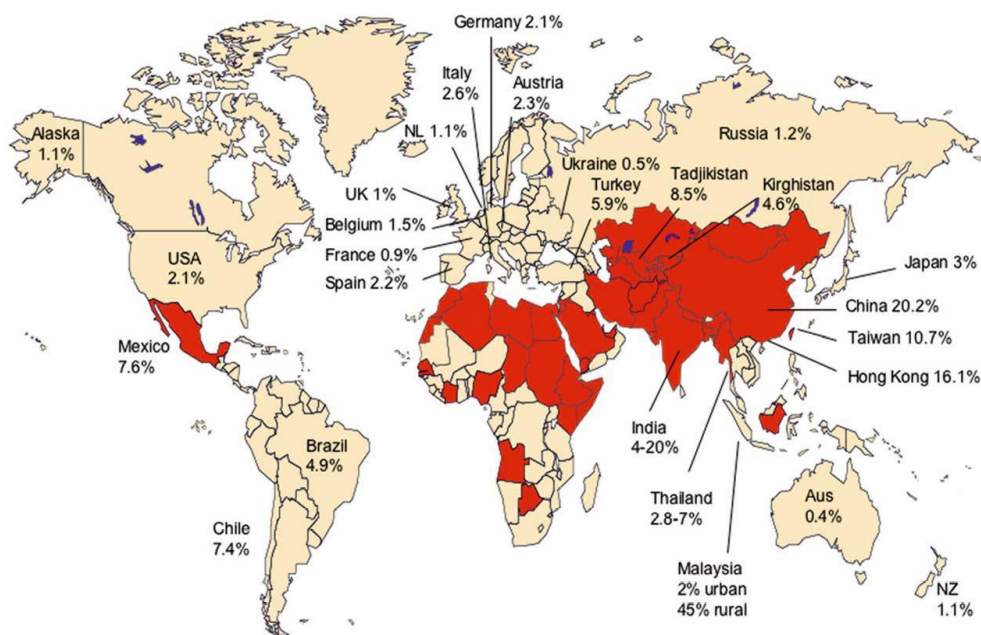
Smatra se da je HEV otporan i na inaktivaciju kiselinama i slabim bazama u digestivnom traktu, pa se na taj način može objasniti i prenošenje virusa fekalno-oralnim putem (Purcell i Emerson, 2001).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA

2.3.1 HEV infekcija kod ljudi

Velike epidemije izazvane hepatitis E virusom javljaju se uglavnom u nerazvijenim zemljama i zabeležene su u Nepal, Burmi, Pakistanu, Indiji, Borneu, Somaliji, Sudanu, Alžiru, Gani, Kini i Meksiku (Bradly et al., 1990) (Slika 6).

Slika 6 : HEV endemična područja i seroprevalencija



Legenda: Crvenom bojom su označena područja u kojima više od 25% akutnih virusnih hepatitisa nastaje usled HEV infekcije (Slika preuzeta iz rada: Chandra et al: Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus; *J. Biosci* 2008)

Kao uzrok infekcija pominje se zagađena pijaća voda i nedovoljni higijenski uslovi života. Jedna od prvih i najbolje dokumentovanih HEV epidemija zabeležena je u Somaliji tokom 1988. i 1989. godine. Od 245.312 ljudi iz 142 sela, kod 11.413 obolelih osoba su primećeni znaci žutice, a 146 ljudi je umrlo. Visok procenat mortaliteta zabeležen je kod trudnica i iznosio je 13.8% (Mushahwar et al., 1993). Indija je endemsko područje gde su već nastajale velike epidemije hepatitis E infekcije, pa su tu izvršena obimna istraživanja seroprevalencije. Anti-HEV antitela su samo sporadično detektovana kod dece uzrasta do 3 godine, ali seropozitivnost se povećavala sa starošću, tako da je kod odraslih ljudi seroprevalencija iznosila 33-40%. (Arankalle et al., 1995). Fix i sar. (2000) su u jednom istraživanju koje je vršeno u Egiptu, ispitali serume ljudi iz dve velike ruralne oblasti. Ova zemlja se smatra endemskim područjem usled nepovoljnih higijenskih uslova za život. Kod

dece uzrasta do 5 godina ustanovljena je HEV seroprevalenca od 91,8%, a zatim se taj procenat smanjivao i kod dece starije od 5 godina je iznosio 64,7%. Kod odraslih ljudi je iznosio 50-60%. Uprkos ovim podacima, velike epidemije hepatitis E infekcije u Egiptu nisu zabeležene.

Dugo se smatralo da su povremeni registrovani slučajevi HEV infekcije kod pacijenata u industrijalizovanim zemljama posledica boravka u rizičnim endemskim područjima. Međutim, posle potvrde o postojanja svinjskog hepatitis E virusa 1997. godine, izolovani su i mnogi autohtoni sojevi od obolelih ljudi sa znacima akutnog hepatitisa. Genetskom analizom HEV genoma dokazano je da su izolati svinja i ljudi sa istog područja međusobno slični, što je potvrdilo pretpostavku o zoonotskoj transmisiji HEV virusa. U Švedskoj i Danskoj je ustanovljeno prisustvo HEV genotip 3 kod 29 pacijenata koji su se inficirali u Evropi, a HEV genotip 1 kod obolelih ljudi koji su putovali u inostranstvo (Norder et al., 2009). Autohtoni HEV genotip 3 zabeležen je kod pacijenata u Španiji (Fogeda et al., 2009). HEV genotip 3 je potvrđen kod obolelih ljudi i u drugim evropskim zemljama: Italiji, Grčkoj, Austriji, Nemačkoj, Engleskoj, Francuskoj, Portugaliji, itd.

2.3.2 Životinje kao rezervoari HEV

a) HEV infekcija kod svinja

Epidemiološka istraživanja rasprostranjenosti hepatitis E infekcije kod svinja na farmama pokazala je da je HEV ubikvitaran u industrijski razvijenim zemljama kao i u zemljama u razvoju. Nivo seroprevalencije bio je različit od zapata do zapata i od oblasti do oblasti. Takođe, seroprevalencija se razlikovala u zavisnosti od uzrsta i kategorija životinja. Meng i sar. (1997) su testirali veliki broj prasadi na farmama u SAD i zaključili da infekcija započinje u uzrastu od 2 do 4 meseca, a znatno viši nivo antitela je zabeležen kod svinja starijih od 4 meseca. Mnogobrojni do sada objavljeni rezultati istraživanja se međusobno razlikuju u zavisnosti od načina i metode istraživanja. Ispitivanja krvnih seruma na prisustvo anti-HEV IgM i IgG antitela vršena su komercijanim i nekomercijalnim ELISA testovima, a za detekciju virusne RNK u serumima, fecesu, jetri ili intestinalnim organima korišćen je klasični i real-time RT-PCR. Infekcija hepatitis E virusom ispitana je u jednoj od prvih pilot studija na manjem broju uzoraka svinja u Australiji i ustanovljena seroprevalencija je iznosila 30% (12/40). Kod prasadi starih 9 nedelja detektovani nivo antitela je iznosio 6%, dok je taj procenat bio znatno viši kod

životinja starih 16 nedelja i iznosio je 95%. (Chandler i sar., 1999). U Kanadi su istraživači Yoo i sar. (2001) ispitali prisustvo anti-HEV antitela kod 998 uzoraka tovljenika uzrasta 6 meseci, i utvrdili da je prosečna seroprevalencija iznosila 59,4 %. Seroprevalencija je bila viša u Quebecu (8,8%) i Ontariu (80,1%) u poređenju sa regionom Alberta i Saskatchewan (38,3%). Na Novom Zelandu je procenat seropozitivnih životinja iznosio 91% kod kategorija uzrasta svinja 20 nedelja (Garavenko et al., 2001). Danski istraživači Breum i sar. (2010) su ispitivali seroprevalenciju kod 213 krmača i ustanovili da je HEV infekcija kod ove kategorije životinja iznosila 91,5%. U Mađarskoj su Forgach i sar. (2010) ustanovili prisustvo HEV infekcije na 39% ispitanih farmi, a najviša seroprevalencija od 36% je zabeležena kod prasadi uzrasta od 11-16 nedelja. Velika retrospektivna serološka studija incidencije HEV infekcije kod svinja u Španiji u periodu od 1985. do 1997. godine potvrdila je da je HEV virus odavno bio prisutan među populacijom industrijski uzgajanih svinja. Ispitivanje je vršeno na uzorcima poreklom sa 208 farmi i ukupno je pregledano 2.871 krvi životinja. Kod 48,45% (1390/2871) testiranih jedinki je zabeleženo prisustvo antitela protiv HEV virusa (Casas et al., 2009). Druga grupa istraživača iz Španije (Jimenez de Oya et al., 2011) su ispitali prisustvo HEV infekcije u 1.141 uzorku seruma svinja iz 85 farmi u 6 provincija. Utvrđeni prosečni nivo anti-HEV antitela iznosio je 20,4% i bio je viši kod odraslih životinja (30,2%) u poređenju sa prasadima mlađim od 6 meseci (15,5%). U Nemačkoj su Bachlein i sar. (2010) testirali prisustvo HEV infekcije kod 1.072 svinje na farmama i utvrdili da je prosečna seroprevalencija iznosila 49,8%. U Francuskoj je 215 seruma prasadi uzrasta od 3 do 6 meseci ispitano na prisustvo anti-HEV antitela. Kod uzrasta od 3 meseca seroprevalencija je inosila 42%, a kod 6 meseci starih svinja 41% (Kaba et al., 2009). U Kini je veliki broj istraživača vršio ispitivanja zastupljenosti HEV infekcije kod svinja i ostalih vrsta životinja, pošto ovaj region predstavlja endemsko područje. Specifična antitela protiv HEV su detektovana u krvnom serumu svinja u 78,8% uzoraka (Wang et al., 2002).

Virusna HEV RNK dokazana je u fecesu svinja poreklom sa 10 farmi u Engleskoj. Seroprevalencija je varirala od 5-35% sa srednjom vrednošću od 21,5%, a najviša ekskrecija virusa je bila kod životinja uzrasta 10-12 nedelja (44,0%) (McCreary et al., 2008). Do sličnog zaključka su došli i španski istraživači Fernandez-Barredo et al (2006). Oni su dokazali da je virusna ekskrecija u fecesu bila najveća kod prasadi uzrasta od 13-16 nedelja. U Holandiji je ispitivanjem obuhvaćeno 97 zapata svinja, uzrasta 20 nedelja, a u 53 zapata (55%) je detektovana najmanje jedna životinju kod koje je dokazano prisustvo virusa (Rutjes et al., 2007). Najnoviji podaci istraživača iz Portugalije (Berto et al., 2012)

ukazuju na prisustvo HEV genotip 3 kod svinja u farmskom uzgoju. Pregledano je po 10 uzoraka fecesa svinja iz četiri različite proizvodne kategorije sa 5 farmi, poreklom iz 5 različitih oblasti Portugalije. Ustanovljena HEV prevalencija je varirala od 10-30%, a po kategorijama je iznosila: 32% kod svinja u odgoju, 20% u predtovu, 32% kod tovljenika i 4% kod krmača.

Svi do sada opisani genotipovi izolovani kod svinja u različitim delovima sveta pripadaju HEV genotipovima 3 i 4. Nedavno je po prvi put detektovan HEV genotip 1 kod svinja u Kambodži, gde je ovaj genotip pre toga bio dokazan samo kod humane populacije (Caron et al.,2006). U različitim istraživanjima koja su do sada vršena u Evropi, u fecesu svinja je ustanovljen samo HEV genotip 3. Istraživači iz Holandije i Belgije su po prvi put ustanovili i prisustvo HEV genotip 4c u uzorcima fecesa svinja na klanicama u Belgiji (Hakze-van der Honing et al, 2011).

U Srbiji su Petrović i sar. objavili 2008. godine rezultate prvog preliminarnog ispitivanja prisustva HEV infekcije kod svinja. Ukupno je pregledano 30 zbirnih uzoraka fecesa sa 3 farme, 10 zbirnih uzoraka fecesa divljih svinja, 20 zbirnih uzoraka tkiva svinja sa 2 farme i 15 zbirnih uzoraka tkiva svinja individualnih proizvođača sa 3 različita epizootiološka područja. Kod 30% (9/30) pregledanih uzoraka fecesa i 45% (9/20) uzoraka tkiva svinja sa industrijskih farmi ustanovljeno je prisustvo genoma hepatitis E virusa molekularnom metodom RT-PCR. Hepatitis E infekcija je identifikovana na 4 od 5 pregledanih farmi svinja. U uzorcima tkiva divljih svinja i 15 zbirnih uzoraka tkiva svinja individualnih proizvođača HEV infekcija nije dokazana. Prvo serološko ispitivanje seroprevalencije kod domaćih svinja u Srbiji izvršeno je 2010. godine (Lupulovic et al., 2010). Ukupno je pregledano 315 seruma svinja individualnih proizvođača, uzrasta 3-4 meseca, poreklom iz 63 zapata iz 28 gradova i sela sa 4 različita epizootiološka područja Vojvodine. Uzorci su testirani *in-house* ELISA metodom, a detektovani nivo antitela iznosio je 34,6% (109/315).

b) HEV infekcija kod divljih svinja i jelena

Nekoliko istraživanja prisustva HEV virusa kod divljih svinja i jelena sprovedeno je u Evropi i Japanu. Izvor infekcije kod ovih divljih životinja do sada nije poznat. Smatra se da se uzročnik nalazi u kontaminiranoj vodi u šumama, travi ili se prenosi putem fecesa drugih zaraženih životinjskih vrsta. Nivo ustanovljene seroprevalencije kod divljih svinja se veoma razlikuje i kreće od 9 do 71%, a kod jelena od 2 do 35%. Pored dobijenih raznolikih nivoa antitela, u ovim istraživanjima je korišćen relativno mali broj uzoraka

krvi, jetri i žuči što predstavlja i otežavajući faktor za dobijanje realne slike zastupljenosti HEV infekcije kod divljih životinja. Do sada dokazana infekcija kod divljih svinja pripada HEV genotipu 3, ali je nedavno otkriven i genotip 4, kao i novi nepoznati genotip. Izolovani genotipovi divljih svinja su genetski slični izolatima ljudi i domaćih svinja sa istog geografskog područja (Pavio et al., 2010; Takahashi et al., 2011). U Australiji su istraživači Chandler i sar. (1999) ukupno testirali *in-house* ELISA testom i Western blot metodom 59 uzoraka krvi divljih svinja i ustanovili kod 15 (17%) životinja prisustvo antitela protiv HEV virusa. U jednom ispitivanju u Holandiji, od ukupno pregledanih 1.029 uzoraka krvi divljih svinja i 38 uzoraka krvi crvenog jelena ELISA testom kod 12% divljih svinja, odnosno 5% jelena su pronađena anti-HEV antitela (Rutjes et al., 2010). Adloch i sar. (2009) su istraživali rasprostranjenost HEV infekcije kod divljih svinja u Istočnoj i Zapadnoj Nemačkoj. Ustanovljena seroprevalencija je iznosila 29,9% korišćenjem ELISA testa, dok je u uzorcima jetre i žuči metodom qRT-PCR analize u 68,2% uzoraka utvrđena HEV RNK. Japanski istraživači Michitaka i sar (2007) su kod 25,5 % divljih svinja ustanovili prisustvo HEV infekcije. U Španiji je ukupno pregledano 150 uzoraka krvi divljih svinja *in-house* ELISA testom i kod 42,7% su detektovana antitela protiv HEV virusa.

c) HEV infekcija kod glodara i ostalih životinjskih vrsta

Nedavno je izolovan novi soj HEV virusa kod zečeva u Kini (Zhao et al., 2008). Sa dve farme zečeva je sakupljeno 335 seruma i pregledano na prisustvo HEV virusa. Seroprevalencija anti-HEV antitela je iznosila 57%. Na osnovu genetske analize ustanovljeno je da genom zečeva ima čak 82% homolognih sekvenci sa HEV genotip 3, što ukazuje na mogućnost da je to samo jedna od varijanti genotipa 3. Trenutno, nema mnogo informacija o virusu HEV kod zečeva, ali postoji pretpostavka da ima zoonotski potencijal i može preskočiti barijeru vrste. Prisustvo HEV infekcije potvrđeno je i kod divljih pacova u Nemačkoj i Nepal u i kod pacova u urbanim sredinama u Americi (Johns et al., 2010, He et al., 2002; Favorov et al., 2000). Analize do sada urađenih parcijalnih sekvenci utvrdile su da HEV pacova ima 59,9% sličnosti sa HEV ljudi i 49,9% sa HEV ptica, tako da najverovatnije predstavlja zaseban genotip u okviru roda Hepevirus. Još uvek nema podataka o tome da li HEV pacova može da inficira ljude, ali je sigurno da ove životinje predstavljaju rezervoar virusa, naročito u gradskim sredinama.

Postoje dokazi i o postojanju infekcije čiji je uzročnik HEV virus kod konja u Egiptu. Saad i sar (2007) su ispitali 200 uzoraka krvi konja ELISA testom i ustanovili

prisustvo IgG anti-HEV antitela kod 13% ispitanih konja. Filogenetska analiza seruma kod kojih je potvrđeno prisustvo HEV RNK je pokazala 97-100% identičnih nukleotidnih sekvenci sa humanim izolatima iz Egipta. Ovaj rezultat predstavlja još jedan dokaz o mogućnostima prenošenja infekcije među vrstama.

Batts i sar. (2011) su nedavno otkrili novu vrstu virusa Cutthroat trout virus (CTV) kod jedne vrste pastrmki u Kaliforniji. Genom ovog virusa je po svojoj organizaciji i veličini veoma sličan HEV virusu sisara, ptica i pacova. Genetskom analizom je dokazano da CTV virus sa HEV virusom sisara i ptica deli samo 13, odnosno 27% zajedničkih sekvenci, što bi moglo da ovaj novootkriveni virus svrsta u potpuno novi rod.

Postoje izveštaji i o detekcije antitela protiv HEV virusa kod pasa u Vijetnamu i Indiji, kod krava u Americi, Somaliji, Tadžikistanu, Turkmenistanu i Ukrajini i kod ovaca u Turkmenistanu (Tien et al., 1997; Arankalle et al., 2001)

d) HEV infekcija kod ptica

Na farmi u Australiji prvi put je 1999. godine izolovan virus iz uvećanih jetri i slezine živine i nazvan je BLSV virus (*Big liver and spleen virus*) (Payne et al., 1999). Bolest je takođe potvrđena u SAD i Kanadi gde je nazvana Sindrom uvećane jetre i slezine (*Hepatitis - splenomegaly syndrome HS*). Predpostavlja se da virus koji izaziva HS sindrom i BLSV virus međusobno dele 80% nukleotidnih sekvenci, što ukazuje na činjenicu da predstavljaju dve varijante jednog istog virusa. (Haqshenas et al, 2001; Meng et al., 2008). Iako je ovaj virus morfološki i genetski sličan HEV virusu sisara, genetskom analizom je ustanovljeno da novootkriveni virus deli 50-60% nukleotidnih sekvenci sa HEV virusom ljudi i svrstan je u poseban rod unutar familije Hepeviridae: avijarni HEV virus (*avian HEV*). Do sada je dokazano da postoje najmanje 3 genotipa avijarnog HEV virusa, koji su povezani sa geografskim područjima na kojima se pojavljuju: Australija, SAD i Evropa (do sada potvrđen u Španiji i Mađarskoj) (Marek et al, 2010).

Ustanovljeno je da u je u SAD infekcija ubikvitarna među živinom. Tokom jednog istraživanja pregledano je ukupno 1.276 uzoraka krvi živine *in-house* ELISA testom i utvrđeno je da je 71% zapata i 30% testirane živine bilo seropozitivno na prisustvo HEV virusa. Anti-HEV antitela su ustanovljena kod 17% živine mlađe od 18 nedelja, dok je taj procenat iznosio 36% kod živine starije od 18 nedelja (Huang et al., 2002). Utvrđeno je da najčešće oboljevaju nosilje rase Leghorn, ali se infekcija može javiti i kod brojlerskih nosilja. Bolest uglavnom prolazi subklinički, a morbiditet i mortalitet je najčešće nizak. U nekim slučajevima se javlja pad nosivosti jaja do 20% i povećani nedeljni mortalitet nosilja

od 0,3% do najviše 1%. Patomorfološkom analizom zabeleženo je povećanje jetre i slezine, hemoragije i subkapsularni hematomi (Meng et al., 2008).

2.4 TRANSMISIJA HEV

2.4.1 Transmisija putem vode

Epidemije hepatitis E infekcije se najčeće javljaju za vreme pojave jakih kiša, poplava i monsuna u oblastima Azije i Afrike. Tada dolazi do kontaminacije vode fekalijama. Velike poplave bile su i uzrok epidemije koja je izbila 50-tih godina u Indiji. Prirodni izvori vode mogu takođe biti izvori infekcije, naročito u zemljama sa nedovoljno razvijenim higijenskim i sanitarnim uslovima života. Korišćenje neprokuvane vode iz reka je dovelo takođe do izbijanja epidemija izazvanih virusom HEV. Izbeglice i ljudi koji žive u kolektivnim kampovima su izloženi većem riziku prenošenja infekcije putem zagađene vode. Jedna od najvećih epidemija zabeležene je u izbegličkom kampu u Sudanu, gde je za 6 meseci obolela 2.661 osoba, a 45 osoba je umrlo, uključujući i 19 trudnica. (A. Bosch, 2007).

2.4.2 Eksperimentalna transmisija virusa među vrstama

Usmanov i sar. su još 1994. godine uspeli da inficiraju jagnjad HEV virusom ljudi i kod životinja se razvila klinička slika bolesti. Rhesus majmuni i šimpanze se mogu u eksperimentalnim uslovima inficirati HEV virusom svinja genotip 3 i 4. Kod zaraženih životinja je zabeležena serokonverzija HEV antitela, povišen nivo enzima jetre i izlučivanje virusa putem fecesa. Veštačka infekcija SPF svinja (*specific- pathogen- free swine*) humanim virusom HEV genotip 3 i 4 je kod životinja izazvala viremiju i povišen nivo anti-HEV antitela, što je bio dokaz da se svinje mogu zaraziti humanim tipom HEV virusa. Infekcija svinja humanim HEV genotipom 1 i 2 nije uspela (Meng et al., 2008; Feagins et al., 2008).

2.4.3. Zoonotska transmisija virusa

Meng i sar. su 1997 godine prvi izolovali HEV virus svinja. Kasnijim analizama genoma utvrđeno je da HEV svinja i izolati HEV ljudi u Americi (US-1 i US-2) dele 97% identičnih nukleotidnih sekvenci. Posle ovih prvih nalaza, HEV je izolovan kod svinja i ljudi u mnogim zemljama i prepoznat kao uzročnik zoonozne infekcije.

Analiza seroprevalencije kod ljudi koji su profesionalno izloženi kontaktu sa svinjama, kao što su: uzgajivači svinja, farmeri, veterinari i radnici u klanicama pokazala je da je nivo specifičnih antitela protiv HEV virusa viši kod ljudi koji su u kontaktu sa svinjama nego kod ostale populacije. Hsieh i sar. (1999) su otkrili da je 27% radnika na farmama svinja bilo HEV seropozitivno u poređenju sa 8% seropozitivnih ljudi u kontrolnoj grupi. U Moldaviji je *in-house* ELISA testom ispitano 264 uzgajivača svinja i 255 ljudi koji nisu izloženi kontaktu sa svinjama. Prevalencija HEV infekcije bila je viša kod uzgajivača nego kod kontrolne grupe (51,1% prema 24,7%) (Drobeniuc et al., 2001). U osam država SAD vršeno je ispitivanje HEV seroprevalencije kod 468 veterinara koji su radili na svinjarskim farmama. Ispitivanja su vršena ELISA testom gde je kao antigen korišćen američki izolat HEV genotip 3 svinja i HEV genotip 1 ljudi Sar-55. Kod oko 23% veterinara je ustanovljeno prisustvo antitela protiv antigena HEV svinja, odnosno kod 26% protiv antigena HEV ljudi (Meng et al., 2002). Whitters i sar. (2002) su utvrdili da su radnici na farmama svinja u Severnj Karolini (SAD) imali 4,5 puta viši nivo IgG antitela protiv HEV u odnosu na kontrolnu grupu. Istraživači Olsen i sar. (2006) su ispitali seroprevalenciju anti-HEV antitela kod 115 radnika na farmama svinja u Švedskoj i ustanovili da je 13% radnika bilo inficirano. U Holandiji su ispitani uzorci krvi 3 subpopulacije ljudi: 49 veterinara koji su rade na farmama svinja, 153 ostalih veterinara i 644 osobe različitih zanimanja. Seroprevalencija je iznosila: 11%, odnosno 6% i 2% (Bouwknegt et al., 2008). Na Tajlandu je istraživanjem obuhvaćeno ukupno 408 zdravih osoba, a kao dijagnostička metoda je korišćen komercijalni ELISA set kit. Visok nivo anti-HEV antitela detektovan je kod radnika na farmama svinja (27,9%), nešto niži procenat je zabeležen kod radnika na farmama živine (24,5%), a najmanji kod službenika (16,7%) (Pourpongporn et al., 2009). U Gani, koja se smatra endemskim područjem, prosečan detektovani nivo antitela protiv HEV virusa kod radnika na farmama svinja iznosio je 34,84%, od čega su 19,26% činili imunoglobulini IgG klase, a 15,58% IgM. U Austriji su istraživači Forgach i sar. (2007) ispitivali zastupljenost HEV infekcije kod radnika na farmama svinja i živine. Ukupno je pregledano 478 uzoraka krvi. Seroprevalencija kod radnika na farmama svinja je iznosila 25,49% za IgM i 28,42% za IgG anti-HEV antitela, dok je kod radnika na živinarskim farmama iznosila 36,6% za IgG i 27,37% za IgM antitela. U pojedinim istraživanjima zabeleženi su i rezultati u kojima je bila niska seropozitivnost kod ljudi koji su u stalnom kontaktu sa svinjama. Meader i sar. (2010) su prvi ispitali seroprevalenciju kod 413 ljudi zaposlenih na farmama svinja u Engleskoj. Detektovan je nizak nivo anti-HEV antitela od 2,4%.

Kao jedinstven slučaj, u Francuskoj je dokazana HEV infekcija kod osobe koja se najverovatnije zarazila od svog kućnog ljubimca, patuljastog praseta vijetnamske rase. Kod pacijenta su se javili znaci žutice i detektovana su antitela protiv HEV virusa. Iz krvnog seruma obolele osobe i praseta izolovanje je HEV RNK, a homologija nukleotidnih sekvenci je inosila 92% (Renou et al., 2007).

2.4.4. Transmisija putem krvi

HEV infekcija zabeležena je i kod dobrovoljnih davalaca krvi u industrijalizovanim i razvijenim zemljama. Ustanovljena seroprevalencija se razlikovala od zemlje do zemlje i iznosila je: 4% na Novom Zelandu, 3,2% u Francuskoj, 2,3% u Brazilu, 2,8% u Španiji, 2,5% u Holandiji, 3,2% u Japanu, 4,9% u Švajcarskoj itd. (Dalton et al., 2007; Boutrouille et al., 2007; Bortolierio et al., 2006; Mateos et al., 1998; Bouwknecht et al., 2007; Sakata et al., 2008, Kaufmann et al., 2011). Pored prethodno navedenih niskih vrednosti seroprevalencije, pojedini istraživači su ustanovili da je HEV infekcija široko rasprostranjena u SAD i Engleskoj kod dobrovoljnih davalaca krvi. U Americi, Meng i sar. (2002) su ispitali 400 uzoraka krvi dobrovoljnih davalaca i ustanovili seroprevalencu koja je iznosila 18%, a u Engleskoj su Bendall i sar. (2010) ustanovili prevalencu od 16,2% analizom 500 uzoraka krvi dobrovoljnih davalaca. Kod dobrovoljnih davalaca krvi u zemljama endemskog područja zabeležen je viši nivo antitela protiv HEV virusa u odnosu na razvijene industrijske zemlje. U Iranu, istraživanje je sprovedeno na 400 dobrovoljnih davalaca krvi. Specifična antitela protiv HEV su dokazana kod 11,5% testiranih osoba (46/400) (Assarehzadegan et al., 2008). Prvo istraživanje prisustva HEV antitela kod dobrovoljnih davalaca krvi u Saudijskoj Arabiji potvrdilo je visok nivo anti-HEV antitela kod 16,9% pregledanih uzoraka krvi, u Koreji 11,9% , a u Albaniji 12,1% (Abdelaal et al., 1998 ;Ahn et al., 2005; Kondili et al., 2006). Detaljna analiza krvi 44. 816,00 dobrovoljnih davalaca u Kini potvrdila je da je HEV infekcija prisutna, a prosečna seroprevalencija je iznosila za IgG antitela 32,60% i za IgM antitela 0,94% (Guo et al., 2010). U našoj zemlji su prva istraživanja prisustva HEV infekcije kod ljudi objavili su Delić i sar. (2003). Ispitivanje je obuhvatilo nekoliko rizičnih grupa: homoseksualci, prostitutke, i.v. narkomani, hematološki bolesnici i dobrovoljni davalaci krvi, a prosečna seroprevalencija je iznosila 16,9% (35/206).

Posle dokaza prisustva HEV virusa u krvi dobrovoljnih davalaca, zabeleženi su i slučajevi HEV infekcije kod ljudi putem transfuzije krvi. Kod pacijenta koji je putem transfuzije primio krv zaraženu HEV virusom javili su se znaci akutnog hepatitisa E,

povišen nivo alanin aminotransferaze (ALT) i detektovana su anti-HEV antitela. Analizom krvi davaoca ustanovljeno je takođe prisustvo antitela protiv HEV virusa. Davaoc krvi je konzumirao svinjsko meso pečeno na roštilju, a njegov otac je dva meseca posle večere preminuo od fulminantnog oblika hepatitisa E. (Matsubayashi et al., 2008). Pored navedenog slučaja, postoje podaci o mnogobrojnim dokazanim HEV infekcijama nastalim kao posledica transfuzije krvi (Boxall et al., 2006; Colson et al., 2007; Tamura et al., 2007;)

2.4.5 Perinatalna transmisija

Iako se smatra da je mogućnost prenošenja HEV infekcije sa majke na dete vertikalnim putem veoma mala u razvijenim zemljama, procenat prenošenja infekcije na ovaj način u zemljama u razvoju nije zanemarljiv. U istraživanjima sprovedenim u Indiji i Argentini, kod 23,3% (Kumar et al., 2004) odnosno 33,3-50% (Sookoian, 2006) novorođene dece detektovana su antitela protiv HEV. U drugom istraživanju sprovedenom u Indiji, 468 trudnica je testirano i 28 (30%) je bilo HEV RNK pozitivno. Kod 12 žena od 28 su se razvili klinički znaci bolesti, a dve žene su preminule pre porođaja. Sva deca rođena od HEV pozitivnih majki su imali kliničke znake akutne HEV infekcije. (Kumar et al., 2001; Mushahwar 2008)

2.4.6 Transmisija HEV putem transplantacije organa

Hepatitis E virus može izazvati nastajanje hroničnog oboljenja jetre i cirozu kod pacijenata sa imunosupresijom kojima je izvršeno presađivanje jetre. U Holandiji je ispitano ukupno 274 pacijenata kojima je presađena jetra i kod 11 osoba je utvrđen povišen nivo anti-HEV antitela. Jedna osoba (1%) je obolela sa znacima hepatitisa E infekcije posle transplantacije (Haagsma et al., 2009). U Francuskoj je vršeno istraživanje kod 226 pacijenata kojima je presađena jetra i kod 10 (4%) osoba su detektovana antitela, a dve osobe su obolele od hepatitisa E infekcije (Pischke et al., 2010c). Iz 17 medicinskih centara u Evropi i SAD uzeti su podaci o istoriji bolesti 85 pacijenata sa HEV infekcijom koji su bili podvrgnuti operaciji transplantacije jetre. Kod 56 pacijenata (65,9%) je dijagnostikovana hronična ciroza jetre, a HEV RNK je dokazana u serumu ili fecesu obolelih ljudi (Kamar et al., 2011). Od 108 testiranih seruma pacijenata kojima je presađena jetra ili bubreg kod 3 osobe su ustanovljena anti-HEV antitela u istraživanju koje su sproveli Buti i sar. (2010) u Španiji. Zabeleženi su i slučajevi pojave hroničnog hepatitisa i povišenog nivoa aminotransferaza kod dece kojima je izvršena transplantacija

jetre (Halac et al., 2012). Istraživači Schlosser i sar. (2011) opisali su slučaj starije osobe koja je preminula od ciroze jetre sa znacima septičkog šoka 15 meseci posle presađivanja jetre. U serumu preminule osobe detektovana su anti-HEV IgM i IgG antitela i izolovana je HEV RNK. I u uzorku jetre donora utvrđena je visoka koncentracija HEV RNK. Objavljeni podaci ukazuju da postoji opasnost od HEV infekcije kod imunosupresivnih pacijenata kojima je izvršena transplantacija jetre, ali je taj procenat veoma nizak. Ove osobe bi trebale da izbegavaju konzumiranje nedovoljno termički obrađenog mesa i na taj način bi izbegle mogućnost zoonotske re-infekcije.

Pored opasnosti od inficiranja HEV virusom putem presađivanja ljudske jetre i drugih organa, veća mogućnost zaražavanja postoji prilikom xenotransplantacije (transplantacija životinjskih organa na ljude). Svinje predstavljaju dobre donore organa, pre svega jetre, zbog svojih anatomskih i metaboličkih karakteristika koje su slične ljudskim. Međutim, otkrivanjem postojanja HEV infekcije svinja, pojavljuje se i rizik od xeno-zoonozne infekcije (Williams et al., 2001).

2.4.7 Transmisija putem hrane

Nakon uspešnog eksperimentalnog prenošenja HEV infekcije sa ljudi na svinje, izolacije HEV virusa kod svinja i eksperimentalnog inficiranja majmuna svinjskim HEV virusom, postavilo se pitanje zoonotskog potencijala virusa i mogućnosti inficiranja ljudi putem zaraženog mesa. Nekoliko slučajeva pojave akutnih HEV infekcija kod ljudi dovede se u vezu sa konzumiranjem zaraženih namirnica.

Matsuda i sar. (2003) su opisali dva slučaja oboljevanja ljudi u Japanu sa znacima akutnog hepatitisa E, koji je nastao nakon konzumiranja jetri divljih svinja. Pacijenti su jeli u više navrata termički neobrađene jetre u sirovom stanju, što je uobičajna navika u Japanu. Jedna osoba je preminula sa znacima hepaticne kome. U drugom izveštaju navodi se da je 10 ljudi obolelo od akutnog oblika HEV infekcije u periodu od 2001 do 2002 godine u Hokaidu u Japanu. Devet osoba (90%) je konzumiralo termički neobrađene jetre svinja ili jetre pečene na roštilju. Ispitano je i 363 uzoraka jetri iz mesara i u 7 (1,9%) uzoraka je potvrđeno prisustvo virusne RNK HEV genotip 3 i 4. Jedan izolat svinja iz pakovanja j imao je 100% identične nukleotidne sekvence kao i HEV RNK izolovana iz krvi 86-godišnjeg pacijenta. Druga dva izolata iz jetri svinja su imali 98,5%, odnosno 100 % identične sekvence sa izolatom dobijenim od 44-godišnjeg pacijenta (Yazaki et al., 2003). Dva pacijenta takođe sa znacima akutnog hepatitisa primljena su u jednu bolnicu u Japanu. Nakon analiza, utvrđeno je prisustvo anti-HEV IgM i IgG antitela, i dokazana je

HEV RNK. Otkrivanjem istorije slučaja, ustanovljeno je da su oboleli ljudi jeli nedovoljno pečene kobasice sačinjene od mesa divljih svinja. Filogenetskom analizom genoma virusa utvrđeno je da pripada HEV genotipu 3 (Tamada et al., 2004). Još nekoliko slučajeva inficiranja ljudi koji su jeli sirovo meso divljih svinja je opisano u Japanu i dovodi se u vezu sa navikama u ishrani u tom delu sveta (Tei et al., 2004; Li et al., 2005; Masuda et al., 2005) (Slika 7). Zabeležena je i HEV infekcija kod pacijenata koji su jeli zaraženo sirovo meso jelena. Prvi znaci bolesti javili su se posle 6-7 nedelja od konzumiranja mesa. Nukleotidne sekvence HEV RNK kod pacijenata i iz mesa jelena bile su identične (Tei et al., 2003). U Francuskoj, na Korzici, je opisano 8 slučajeva infekcije kod osoba koje su jele kobasice pripremljene od sirovih svinjskih jetri. Izvršena je genetska analiza 7 uzoraka kobasica iz supermarketa i ustanovljena genetska sličnost između HEV RNK sekvenci izolovanih iz kobasica i iz krvi ljudi (Colson, 2010). Osim svinjskih jetri i mesa divljači, kao uzročnik alimentarnih infekcija HEV virusom pominju se i zaražene ostrige, koje su bile uzročnik pojave nekoliko akutnih slučajeva hepatitisa HEV infekcije kod pacijenata na Siciliji (Cacopardo et al., 1997). Zabeležena je pojava HEV infekcije koja je izbila na prekookeanskom brodu-kruzeru. Na brodu je bilo 789 osoba, a 33 (4%) osobe su obolele sa znacima akutne infekcije. Kao izvor infekcije navodi se konzumacija zaraženih ostriga (Said et al., 2009).

Slika 7: Transmisija HEV virusa moguća je putem konzumacije sirove jetre domaćih i divljih svinja



Slika preuzeta sa: www.cfs.gov.hk (Pristupljeno Internetu: 25.05.2013)

Nakon mnogobrojnih rezultata istraživanja u kojima je potvrđeno da je HEV virus zoonozni patogen i da su se ljudi inficirali zaraženim mesom i jetrama, započela su ispitivanja prisustva HEV virusa u jetrama svinja na klanicama, u marketima i mesarama. Yazaki i sar. (2003) su sprovedi jedno od prvih ispitivanja prisustva zaraženosti svinjskih jetri u mesarama i potrdili prisustvo hepatitis E virusa kod 2% uzoraka. U 127 ispitanih uzoraka jetri kupljenih u marketu u SAD, u 14 (11%) uzoraka je molekularnom metodom detektovana HEV RNK. Filogenetska analiza genoma je pokazala da svih 14 pomenutih izolata pripada HEV genotip 3 (Feagins et al., 2007). U Holandiji je ispitano 62 uzoraka jetri i u 4 (6,5%) je potvrđeno prisustvo HEV RNK. Utvrđene su genetske sekvence i dokazano je da pripadaju HEV genotip 3. Izolovani HEV virus iz jetre imao je 93% homolognih nukleotidnih sekvenci sa humanim HEV virusom i 97% sa svinjskim HEV virusom prethodno potvrđenim u Holandiji. (Bouwknegt et al., 2007). Od 35 uzoraka jetri koje su sakupljeni iz dve klanice u Kini, u 3 (8,57%) uzorka je dokazano prisustvo HEV RNK genotip 4 (Wang et al., 2007). Druga grupa kineskih istraživača ispitala je 127 uzoraka jetri sa klanica i u 4 uzorka (3,5%) su detektovali prisustvo HEV RNK, a daljim analizama je potvrđeno da genetske sekvence pripadaju HEV genotip 4. Takođe je potvrđeno da izolat HEV iz svinjskih jetri deli 96,1-96,4% sekvenci sa izolatima pacijenata sa akutnom infekcijom hepatitisa E izolovanih iz iste oblasti Kine (Li et al., 2009). Autori Kulkarni i Arankalle (2008) istraživali su prisustvo HEV infekcije u 240 uzoraka jetri svinja poreklom sa pijace i u dva uzorka (0,83%) detektovali HEV genotip 4. Analiza nukleotidnih sekvenci je pokazala sličnost od 90-91% sa izolatima HEV svinja u Indiji. U jednoj klanici u Kanadi sakupljeni su limfni čvorovi, uzorci jetri, žuči, žučnih puteva, fecesa, tonzila i krvi od ukupno 43 životinje. Kod 14 životinja od 43 pregledane je utvrđeno prisustvo HEV genoma u različitim organima (Leblanc et al., 2010). Ispitivanje uzoraka jetri u klanicama i mesarama vršeno je i u Brazilu i u Nemačkoj, a virusna HEV RNK ustanovljena je u 9,6%, odnosno 4% uzoraka (Santos et al., 2011; Wenzel et al. 2011). Do sada izneti rezultati istraživanja prikazali su prisustvo HEV virusa u jetrama svinja u relativno niskom procentu koji se kretao od 0,85% do najviše 11%. Suprotno ovim nalazima, u jednoj nedavno sprovedenoj studiji u Italiji ispitano je 48 uzoraka jetri, a čak u 64,6% uzoraka je detektovana virsna HEV RNK. U jetrama prasadi uzrasta 3-4 mesaca HEV RNK je dokazana u 95% uzoraka u odnosu na uzorke jetri svinja starih 9-10 meseci, gde je taj procenat iznosio 42,9%. Genetska analiza sekvenci potvrdila je da svi izolati pripadaju HEV genotip 3 (Di Bartolo et al., 2011). Nedavno su publikovani prvi rezultati

istraživanja prisustva hepatitis E virusa na klanicama u Češkoj, gde je u 2.5% uzoraka mesa i 5% uzoraka jetri detektovana HEV RNK (di Bartolo et al., 2010).

2.4.8 HEV kao zagađivač životne sredine

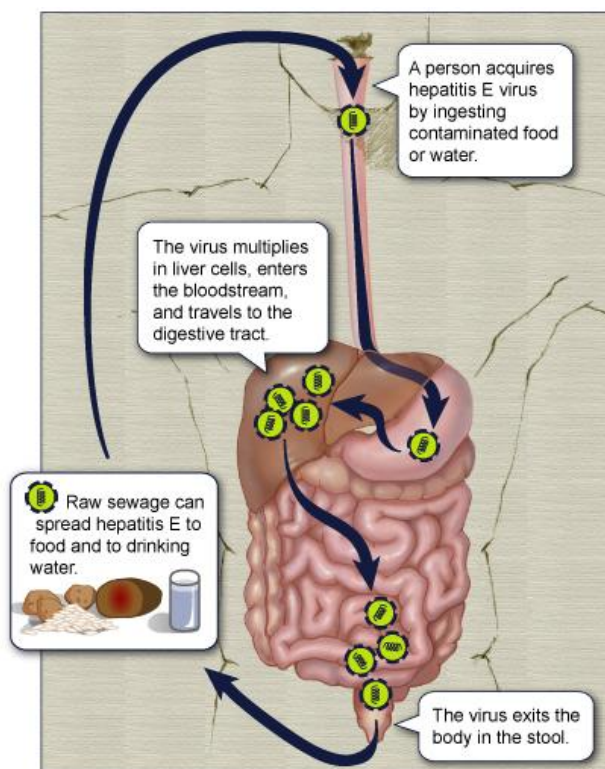
Zaražene životinje, kao rezervoari virusnog agensa, predstavljaju izvor HEV infekcije. Virus se u akutnoj fazi bolesti izlučuje putem fecesa i dospeva u vodene tokove i zemljište. Velike epidemije koje su se pojavljivale u zemljama u razvoju u Aziji i Africi, vezane su za korišćenje kontaminiranih izvora vode. U zemljama sa niskih higijenskim uslovima života, neprečišćena voda iz prirodnih izvora reka i jezera koristi se za kupanje, piće i navodnjavanje. Takođe je hepatitis E virus dokazan i u uzorcima vode iz kanalizacije, otpadnim vodama na farmama svinja i klanicama, kao i u stajnjaku (Purcell et Emerson, 2001; Kasorndorkbua et al., 2005; Meng, 2010). U jednom istraživanju sprovedenom u Holandiji HEV genotip 3 svinja dokazan je u 17% ispitanih uzoraka površinskih voda (Rutjes et al., 2009b). Pina i sar. (2000) ispitali su 12 uzoraka otpadnih voda u klanicama u Španiji i u njima dokazali prisustvo HEV virusa. Analiza nukleotidnih sekvenci je pokazala sličnost od 92-94% sa humanim izolatima HEV virusa sa istog područja. U Sloveniji je ispitano 60 uzoraka površinskih voda i u 2 (3,3%) uzorka je utvrđeno prisustvo HEV genotip 3. Jedan od pozitivnih uzoraka poticao je iz vodenih tokova blizu farme svinja (Steyer et al., 2011). Neprečišćena otpadna voda se u nekim ruralnim oblastima koristi za navodnjavanje polja i predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. U Turskoj su istraživači Ceylan i sar. (2003) ispitali seroprevalenciju HEV infekcije kod radnika u poljima koja se navodnjavaju neprečišćenom vodom. U istraživanju je učestvovalo 46 farmera i 45 osoba kao kontrolna grupa. Anti-HEV antitela su detektovana kod 34,8% radnika u odnosu na 4,4% kod kontrolne grupe ljudi koji nisu radili na poljima. U Indiji je HEV seroprevalencija kod radnika koji su radili na čišćenju kanalizacije iznosila 57%, a kod kontrolne grupe 19% (Vaidya et al., 2003).

2.5 PATOGENEZA I IMUNOLOŠKI ODGOVOR

Patogeneza i imunološki odgovor HEV infekcije su više izučavani kod ljudi, dok podataka o razvoju bolesti kod svinja nema dovoljno. Hepatitis E virus se prvenstveno prenosi fekalno-oralnim putem. Osoba se može inficirati unošenjem kontaminirane hrane ili vode. Kao rezultat umnožavanja u jetri, HEV virus se dalje prenosi putem žuči kroz žučne kanale do tankih i debelih creva i izlučuje preko fecesa. Fekalna ekskrecija virusa

započinje oko nedelju dana pre pojave simptoma bolesti i traje još najmanje 2 do 3 nedelje posle prestanka simptoma oboljenja (Slika 8). Često infekcija može da prođe i asimptomatski, bez znakova bolesti. Osobe sa asimptomatskom kliničkom slikom predstavljaju rezervoare bolesti i mogu dugo da izlučuju virus i na taj način učestvuju u lancu prenošenja infekcije daljim zagađivanjem hrane i vode (Worm et al., 2002.; Bouweknecht et al., 2009).

Slika 8: Patogeneza HEV infekcije kod ljudi



Slika preuzeta sa: www.niaid.nih.gov

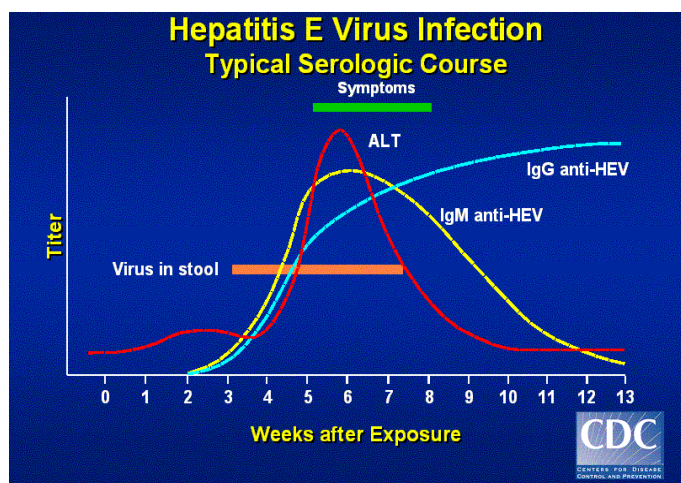
(Pristupljeno Internetu: 25.05.2013)

Pojavu i razvoj imunološkog odgovora kod HEV infekcije proučavali su Tokita i sar. (2003) kod pacijentkinje kod koje se razvila akutna slika bolesti. Uzorci seruma su sakupljeni u periodu od 6. dana pojave simptoma bolesti do 281. dana. Serumi su pregledani ELISA testom na prisustvo anti-HEV IgA, IgG i IgM antitela. IgA i IgM antitela su imali najviši nivo 9. dana od početka bolesti i paralelno su počeli naglo da opadaju, ali su se mogli detektovati u krvi do 6 meseci. Najviši titar IgG antitela zabeležen je 145. dana i od tada se beleži postepeni pad, ali su antitela u krvi pacijentkinje mogla se se detektuju još 7-8 godina. Posle 6 dana od početka bolesti, iz krvi je izolovan RNK, koji

se zadržao do 23. dana od pojave simptoma bolesti. Nivo ALT enzima je bio visok od 3-23. dana posle pojave simptoma.

Istraživači Takahashi i sar. (2005) su kod 15 pacijenata pratili nivo IgM i IgA antitela, kao i prisustvo HEV RNK. Virusna HEV RNK je mogla da se detektuje od 7-40. dana u serumu od početka pojave simptoma bolesti. Anti-HEV IgA i IgM antitela su mogla da se detektuju do 37., 55. i 62. dana od pojave simptoma bolesti kod 3 pacijenta, ali su se kod 12 osoba mogla detektovati i do kraja perioda observacije (do 144. dana). U proseku, IgM antitela dostižu svoj maksimum za vreme simptomatskog perioda i počinju naglo da opadaju i ne mogu se više detektovati posle 3-6 meseci. IgG antitela se pojavljuju posle 3-4 nedelje od početka infekcije, za vreme najvišeg nivoa ALT enzima. Nivo IgG antitela raste za vreme simptomatske faze i ova antitela se mogu detektovati i u fazi rekovalescencije i još nekoliko godina posle prestanka infekcije (Mushahwar, 2008) (Slika 9)

Slika 9: Razvoj humoralnog imunološkog odgovor HEV infekcije kod ljudi



Slika preuzeta sa : www.pathmicro.med.sc.edu/virol/HEPE-CD1.gif (Pristupljeno Internetu:24.05.2013)

Celularni imunološki odgovor za vreme HEV infekcije je veoma malo izučavan. Srivastava i sar. (2007) su ispitivali pomoću protočne citometrije pojavu CD4+/CD8+ T ćelija u perifernoj krvi pacijenata nakon stimulacije sa HEV ORF 2 proteinom. Ove ćelije su zadužene za sekreciju interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis faktora (TNF- α) i interleukina 4 (IL-4). Iako je ukupan broj CD4+ ćelija bio povećan kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu, odnos CD4+/CD69+ i CD8+/CD69+ koje proizvode interferon gama, tumor necrosis factor i interleukin-4 ostao je nepromenjen i nakon *in vitro* stimulacije sa HEV ORF-2 proteinom. Međutim, nakon stimulacije sa HEV ORF2 proteinom u

supernatantu stimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMCs) zabeležen je povećan nivo IFN- γ i TNF- α . Ovaj detektovani ograničeni imunološki odgovor u perifernoj krvi može biti posledica migracije ćelija ka jetri, kao centralnom organu odvijanja HEV infekcije.

Kao što je već istaknuto, patogeneza HEV infekcije kod svinja nije dovoljno izučavana. Predpostavlja se da se HEV svinja prenosi takođe fekalno-oralnim putem. Primarni organ umnožavanja virusa nije poznat, ali se predpostavlja da se virus najpre umnožava u gastrointestinalnom traktu, a zatim se putem krvi, za vreme primarne viremije, širi do target organa - jetre. Williams i sar. (2001) su dokazali da se replikacija HEV virusa odvija i ekstrahepatično. Nakon veštačke infekcije SPF svinja virusom HEV svinja i ljudi, detektovana je HEV RNK, koja je odgovorna za replikaciju virusa, u tankim crevima, limfnim čvorovima, debelom crevu i jetri. U jednom drugom istraživanju autora Nilsa de Deus i sar. (2007), prisustvo HEV RNK dokazano je u uzorcima žuči, mezenterijalnih limfnih čvorova i jetre prasadi uzrasta 1-4 meseca, što ukazuje na činjenicu da se virus u ovim organima intezivno umnožava i akumulira.

Podaci o nastanku i trajanju viremije, izlučivanju virusa putem fecesa i pojavi humoralnog imunološkog odgovora kod svinja su različiti, u zavisnosti od toga da li su rezultati dobijeni u uslovima eksperimentalnog inficiranja životinja ili putem prirodne infekcije. Istraživači Meng i sar. (1997) su ispitali veći broj svinja na farmama u SAD i utvrdili da se infekcija uglavnom javljala kod prasadi uzrasta 2-3 meseca. Period inkubacije, od momenta inficiranja do početka izlučivanja virusa putem fecesa, trajao je od 1-4 nedelje. Inficirane svinje pokazivale su znake prolazne viremije koja je trajala 1-2 nedelje. Fekalno izlučivanje virusa počelo je 2-3 nedelje od momenta inficiranja i trajalo je 3-7 nedelja. Odrasle svinje, krmače i nerastovi, iako su uglavnom bili seropozitivni, nisu izlučivale virus putem fecesa. Istraživači Nakai i sar. (2006) su ispitali izlučivanje ekreciju? HEV virusa putem fecesa svinja na farmama u Japanu. Kod 75%, odnosno 100% prasadi sa dve farme uzrasta 1-3 meseca ustanovljeno je prisustvo HEV RNK u fecesu, dok je taj procenat iznosio 7% kod odraslih životinja uzrasta 5-6 meseci. U istraživanju Nilse de Deus i sar. (2008) HEV virus se prvi put mogao detektovati u fecesu prasadi u uzrastu od 9 nedelja. Sa 12-15 nedelja života sva prasada su izlučivala virus putem fecesa. Kanai et al., 2010 su utvrdili da se kod životinja inficiranih prirodnim putem, HEV virus mogao detektovati u fecesu prasadi uzrasta 30-110 dana, dok svinje uzrasta od 120 dana nisu više izlučivale HEV virus putem fecesa, a viremija je zabeležena kod prasadi starih 40-110 dana. U nedavno sprovedenom istraživanju Bouwknegt i sar. (2009) pratili su patogenezu i

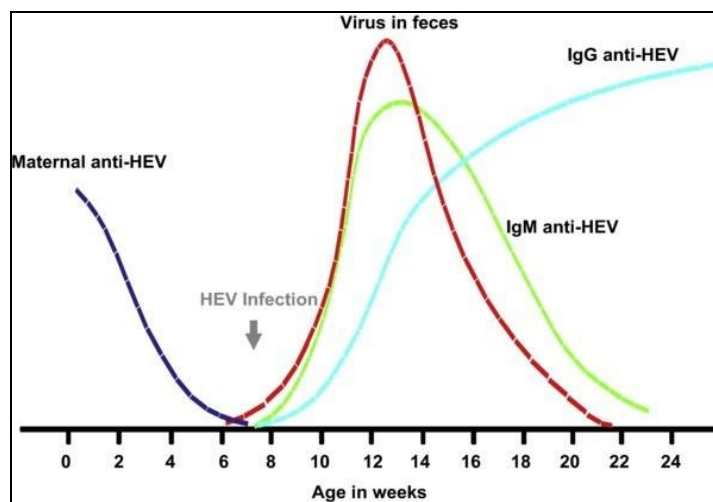
transmisiju HEV virusa kod svinja inficiranih putem prirodnog kontakta ili *i.v.* inokulacijom virusa. Ustanovili su da fekalna ekskrecija? izlučivanje virusa kod kontakno-inficiranih svinja počinje u proseku 7. dana od momenta inficiranja i traje 23 dana. Viremija se javila posle 13 dana od početka fekalnog izlučivanja i trajalo je u proseku 11 dana. Vreme nastanka fekalne ekskrecije? i viremije kod *i.v.* inficiranih svinja je bilo znatno kraće. Interesantan je podatak da osim što je HEV RNK detektovana u različitim organima, potvrđena je i u mesu, u sledećim mišićima: Longissimus, Biceps, Femoris i Iliopsoas. Virusna HEV RNK je izolovana kod kontakno inficiranih svinja iz 20 od 39 pregledanih uzoraka mesa, što predstavlja 51,28%. Dokaz HEV virusa u mesu svinja predstavlja potencijalnu opasnost za preradu i proizvodnju zdravstveno bezbedne hrane.

Pored detekcije HEV RNK u fecesu ili u krvi za vreme faze viremije, kod svinja je ispitan i razvoj imunološkog odgovora nakon HEV infekcije. Nilsa de Deus i sar. (2008) su istraživali perzistenciju imuniteta kod prasadi poreklom od seropozitivnih krmača i utvrdili da su se IgG anti-HEV maternalna antitela u cirkulaciji prasadi poreklom od izrazito serološki pozitivnih majki mogla detektovati do uzrasta od 9 nedelja, dok su prasad poreklom od HEV slabo pozitivnih krmača bila seropozitivna 1-3 nedelje. Sa prestankom delovanja maternalnog imuniteta, prasad su se inficirala i sa 12 nedelja su se kod svih prasadi mogla detektovati IgA i IgM antitela. IgA antitela su trajala u cirkulaciji 4 nedelje, a IgM od 5-7 nedelja. Nivo IgA i IgG antitela je počeo da opada sa 18 nedelja. Sa 15 nedelja su detektovana IgG antitela koja su se dugo zadržala i mogla pratiti do kraja ogleada, do 22. nedelje života. Rezultati istraživača Kanai i sar. (2010) prikazali su da su se u krvi prasadi poreklom od HEV seropozitivnih majki IgA i IgG antitela mogu detektovati prvog dana života i njihov nivo je naglo opadao do 50. dana. Prasad, koja su rođena od seronegativnih majki imala su izuzeto nizak nivo maternalnih anti-HEV antitela koji se zadržao do 50. dana života. Serokonverzija je kod prasadi koja potiču od seropozitivnih majki počela 60. dana, a kod prasadi poreklom od seronegativnih majki 50. dana. Nivo antitela IgG je kod obe grupe životinja bio najviši 70-90. dana, a zatim je počeo polako da opada i zadržao se u cirkulaciji do kraja ogleada koji je trajao 200 dana.

U proseku, u krvi obolelih svinja najpre se detektuju IgM antitela koja se kratko zadržavaju, a zatim IgG antitela koja dugo ostaju u cirkulaciji. Prasad rođena poreklom od seronegativnih majki su seronegativna do uzrasta od 2 nedelje, kada se inficiraju i nivo IgG antitela raste. Prasad poreklom od seropozitivnih majki putem kolostruma dobijaju maternalna antitela, koja se zadržavaju u krvi 7-9 nedelja. Kada prestane dejstvo maternalnih antitela, nastaje serokonverzija, prasad se inficira i stvara svoj sopstveni

imunitet u periodu od 14-21. nedelje života. U tom periodu se mogu detektovati IgM antitela, koja su dokaz nastanka HEV infekcije. Nivo IgM antitela je najviši oko nedelju dana pre pojave IgG antitela i veoma brzo opada u periodu od 1-2 nedelje sa pojavom IgG antitela u cirkulacij (Meng et al., 1997) (slika 10).

Slika 10: Humoralni imunološki odgovor i ekskrecija HEVvirusa kod svinja



Slika preuzeta iz rada: Pavio et al: Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks, Vet.Res. (2010)

Kada je u pitanju avijarni hepatitis E virus, dokazano je da živina može predstavljati dobar model za istraživanje replikacije i patogeneze virusa, pošto je živinu moguće lako inficirati oralnim putem, što je u eksperimentima sa svinjama i primatima bilo veoma teško. Takođe, postoje dokazi da se avijarni HEV virus može vertikalno prenositi, pošto je prisustvo virusa dokazano u jajima. Dejstvo avijarnog HEV virusa je ograničeno. Virus može inficirati ćurke, ali veštačka infekcija svinja i rhesus majmuna avijarnim HEV virusom nije uspela (Billam et al., 2005; Huang et al., 2004).

2. 6 KLINIČKA SLIKA

Prvi pouzdani i tačni podaci o patogenezi i kliničkoj slici HEV infekcije kod ljudi dobijeni su na osnovu dva ispitivanja u kojima su eksperimentalno zaražene osobe koje su pojele prečišćen uzorak stolice pacijenata obolelih od HEV infekcije. U prvom ogledu, Balayan i sar. (1983) su opisali da su se prvi simptomi bolesti razvili 36. dana posle veštačke infekcije sa znacima abdominalnog bola, nauzeje, vomitusa, anorexije, groznice,

tamne mokraće i uvećene jetre, a posle nekoliko dana javila se i žutica. Simptomi bolesti su trajali 60 dana. Nivo enzima jetre ALT i AST bio je povišen za vreme trajanja bolesti i smanjio se na normalu sa prestankom znakova oboljenja. U drugom ispitivanju, takođe, sprovedenom na volonteru-dobrovoljcu (Chauhan et al., 1993) simptomi anorexie, tamne mokraće, epigastričnih bolova i groznice javili su se posle 30 dana od inficiranja, a posle 8 dana javila se žutica koja je trajala do 120. dana. Nivo ALT enzima je počeo da raste 30. dana od nastanka infekcije i dostigao je svoj maksimum 46. dana, a zatim se postepeno smanjivao i vratio na normalne vrednosti do 130. dana infekcije. Ekskrecija virusa putem fecesa zabeležena je od 30-46. dana od inficiranja. HEV RNK je detektovana u serumu 22. dana i trajala je do 46. dana. Antitela protiv HEV virusa su zabeležena 41. dana i mogla su se detektovati u krvi još 2 godine posle završetka infekcije

U proseku, period inkubacije traje oko 40 dana, sa rasponom od 15 do 60 dana. Povišen nivo enzima jetre amino-alanin transferaze (ALT) nastaje posle 30. dana infekcije i traje do 120. dana. Viremija je prolaznog karaktera, javlja se uglavnom za vreme prodromične faze i nestaje sa pojavom kliničkih simptoma bolesti. Klinička slika je karakteristična za akutne virusne hepatitis sa pojavom žutice, tamne mokraće, uvećane i osetljive jetre, abdominalnim bolovima, mučninom, povraćanjem i groznicom (Slika 11).

Slika 11: Simptomi žutice kod obolele osobe



Slika preuzeta sa [:www.webanswers.com](http://www.webanswers.com) (Pristupljeno Internetu:24.05.2013)

Međutim, klinička slika može varirati i zabeleženi su različiti rasponi težine bolesti, od subkliničke, asimptomatske forme do perakutnog (fulminatnog) toka. Hepatitis E virusna infekcija je prevashodno oboljenje mladih osoba i ljudi srednjih godina, starosti od 15 do

40 godina. Mortalitet izazvan HEV virusom iznosi od 0,2 do 3%. Međutim, kod inficiranih trudnica u trećem trimestru gestacije javlja se fulminantni tok bolesti i mortalitet može da iznosi 15-25%. (Purcell et Emerson, 2001; Smith 2001; Skidmore 2002). Najčešće komplikacije za vreme trudnoće predstavljaju smrt majke i ploda, pobačaji, rađanje nedonoščadi ili smrt novorođenih beba posle porođaja (Patra et al., 2007). Za vreme epidemije koja je izbila u Kašmiru, 17,3%, 19,4% i 18,6% žena u prvom, drugom i trećem trimestru trudnoće je imalo kliničku sliku HEV infekcije u poređenju sa 2,1% inficiranih žena koje nisu bile trudne i 2,8% inficiranih muškaraca (Khuroo et al., 1981). Međutim, rezultati nedavno objavljenog dvadesetogodišnjeg istraživanja (Bhatia et al., 2008) pokazali su da kod pojave fulminantnog oblika hepatitisa nema razlike u stopi mortaliteta kod trudnih žena u odnosu na devojke i žene koje nisu bile trudne, kao i u odnosu na muškarce. Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 1.015 pacijenata sa akutnom oboljenjem jetre izazvano hepatitis E virusom, koji su lečeni u jednom medicinskom centru u Indiji, u periodu od 1986. do 2006. godine. Od tog broja, 249 su bile trudnice, 341 pacijent su bile devojke i žene koje nisu bile trudnice i 425 muškaraca. Stopa mortaliteta kod trudnica je iznosila 53,8% i bila je slična stopi mortaliteta kod devojaka, koje nisu bile trudne (57,2%) i muškaraca (57,9%). Autori su zaključili da HEV infekcija ne predstavlja uvek veliku pretnju za trudnice, kao što se do nedavno predpostavljalo. Do sada nisu utvrđeni razlozi zbog kojih postoje razlike u prethodno opisanim stopama mortaliteta, izazvanoj HEV infekcijom kod trudnica. Smatra se da osim virusnog agensa, znatan uticaj na težinu kliničke slike imaju HEV genotip, količina virusa, druge koinfekcije, imunološki i hormonski faktori za vreme trudnoće, socio-ekonomski status i dr. (Kar et al., 2008). Genotipovi 1 i 2 su više patogeni za ljude od genotipova 3 i 4. Koliko je poznato, do sada nije opisan fulminantni tok hepatitis E infekcije kod trudnica izazvan sa HEV genotip 3 (Andersson et al., 2008). U jednoj studiji u Japanu, pacijenti oboleli od HEV genotip 4 infekcije imali su težu kliničku sliku bolesti i viši nivo ALT enzima od pacijenata inficiranih sa HEV genotip 3 (Ohnishi et al., 2006).

Visok nivo morbititeta i mortaliteta se može javiti i kod imunosupresovanih osoba kod kojih je izvršena transplantacija organa ili kod pacijenata sa hroničnim oboljenjem jetre kod kojih je došlo do superinfekcije HEV virusom. Opisani su i slučajevi HEV infekcije sa kliničkom slikom koji nemaju manifestaciju oboljenja jetre, kao što su: pankreatitis, trombocytopenija, hemoliza, autoimuni fenomeni, meningoencephalitis i druge neurološke pojave. Ove pojave su opisne samo u poradičnim slučajevima kod nefulminantnog oblika bolesti (R. Aggarwal, 2011).

Kod svinja koje su se inficirale prirodnim putem, infekcija prolazi asimptomatski i nema kliničke slike oboljenja (Meng i sar., 1997; Meng i sar., 1998). U istraživanju koje su sprovedi Halbur i sar. (2001), jedna grupa SPF svinja je inficirana virusom hepatitisa E svinja, druga grupa US2 HEV humanim sojem a treća grupa su bile kontrolne svinje koje nisu inficirane. Klinički znaci bolesti se nisu razvili ni kod jedne grupe životinja. Oba virusa su se umnožavala u svinjama, pošto je kod inficiranih svinja zabeležena serokonverzija, a HEV RNK je mogla da se detektuje u fecesu, žuči, serumu i jetri zaraženih jedinki. Povišeni nivo enzima ALT i AST i bilirubina nije zabeležen ni kod jedne životinje.

Takođe, u eksperimentalnim uslovima, gravidne krmače koje su inficirane intravenski HEV virusom svinja u različitim stadijumima gestacije nisu imale kliničku sliku oboljenja, niti su pobacile. Infekcija HEV virusom nije uticala na broj prasadi u leglu i vitalnost prasadi. Nivo enzima jetre takođe nije bio povišen (Kasornorkubua et al., 2003). Slično ovom ogledu, Tsarev i sar. (1995) su inficirali humanim HEV virusom gravidne rhesus majmune i nije došlo do manifestacije kliničke slike bolesti, koja je karakteristična kod trudnih žena.

2.7 PATOMORFOLOŠKE PROMENE

Patomorfološke promene izazavane hepatitis E infekcijom kod ljudi uglavnom nastaju u jetri i žučnim putevima. Predpostavlja se da promene na jetri nastaju direktnim dejstvom imunološkog mehanizma ili produktima genske ekspresije u hepatocitima, kao i dejstvom virusnog kompleksa antigen/antitelo. Kod blažih oblika infekcije izazavane hepatitis E virusom, biopsijom jetre ili nisu zabeležene značajne inflamatorne promene na jetri ili su postojali znaci staze žuči (cholestatička forma). Histopatološke promene su bile prolaznog karaktera i nestale su za 3-6 meseci (Anderson and Shrestha, 2002). Osim opisanih blagih patomorfoloških promena, postoje i objavljeni podaci o značajnim oštećenjima jetre i žučnih puteva. U istraživanjima Peron i sar. (2007) izvršana su histološka ispitivanja jetre kod 11 pacijenata u jugozapadnoj Francuskoj, koji su imali znake sporadičnog akutnog oblika hepatitisa E. Oboljenje je najpre dijagnostikovano na osnovu povišenog nivoa transaminaza, dokaza specifičnih antitela i HEV RNK u serumu i/ili fecesu. Kod 9 pacijenata opisane su nekrotično-inflamatorne promene na jetre. Kod 5 slučajeva je bio prisutan konfluentni oblik nekroze. Cholangitis je zabeležen kod 9, a cholestaza kod 8

pacijenata. Karakteristični patološki znaci akutnog hepatitisa E su bili: intralobularna nekroza, polimorfna inflamacija i akutni cholangitis sa brojnim neutrofilima. Istraživači Wendum i sar. (2005) su zabeležili i pojavu destruktivnog oblika cholangitisa sa histološkom slikom oštećenja epitela žučnih puteva izazvanih dejstom HEV.

Kod svinja inficiranih HEV nisu uočene značajnije makroskopske promene, osim blagog povećanja jetre i limfnih čvorova. Mikroskopske promene se uglavnom odnose na inflamatorne promene sa infiltracijom limfocita i blaže nekrotične promene. U jednom ogledu Meng i sar. (1997) su 4 praseta, koja su se inficirala hepatitis E virusom svinja prirodnim putem, žrtvovali za vreme akutne faze bolesti. Patomorfološkim pregledom nisu zabeležene veće lezija na jetri niti u drugim organima i tkivima. Mikroskopski, kod sva 4 praseta su opisane promene od blagog do srednjeg multifokalnog i periportalnog limfoplazmatičnog hepatitisa sa blagom fokalnom hepatocelularnom nekrozom. Takođe, kod svih prasadi je zabeležen limfoplazmatični enteritis, a kod 3 praseta blagi multifokalni limfoplazmatični intersticijalni nefritis. U drugom istraživanju, ista grupa autora je pod eksperimentalnim uslovima inficirala SPF prasadi. Prvu grupu prasadi inficirali su hepatitis E virusom svinja, a drugu grupu prasadi sa US2 humanim izolatom HEV. Nisu zabeleženi simptomi kliničke slike bolesti niti kod jedne grupe, ali je kod obe grupe inficirane prasadi uočeno blago povećanje jetre i mezenterijalnih limfnih čvorova od 7-55 dana posle inokulacije. Kod prve grupe prasadi zabeležene su blage mikroskopske lezije jetre. Kod druge grupe prasadi zabeležene su teže promene u jetri, koje su odgovarale multifokalnom limfoplazmatičnom hepatitisu i uočena je fokalna hepatocelularna nekroza. HEV RNK je detektovana u fecesu, jetri i žuči inficirane prasadi 3-27 dana posle inokulacije (Halbur et al., 2001).

U jednom istraživanju u Južnoj Koreji, pregledano je ukupno 40 svinja sa 19 farmi. Kod 22 (55%) životinja RT-PCR metodom je otkrivena HEV RNK u jetri, ali velike patološke lezije nisu potvrđene. U pojedinim slučajevima uočavalo se blago povećanje jetre sa pojedinačnim žutim prebojavanjima. Kod svih RT-PCR pozitivnih jetri mikroskopskim pregledom je uočen fokalni limfoplazmatični hepatitis. Kod blažih slučajeva zabeležena je fokalna infiltracija limfocita, plazma ćelija i makrofaga u portalnom delu. Kod težih slučajeva je opisana veća portalna inflamacija i teži oblik limfoplazmatičnog hepatitisa. U mnogobrojnim hepatocitima se mogla uočiti vakuolarna degeneracija i nekrotične promene (Lee et al., 2007).

Istraživači de Deus i sar. (2007) kod prasadi inficiranih prirodnim putem nisu zabeležili vidljive makroskopske promene na jetri i mezenterijalnim limfnim čvorovima.

Kod 22 od 69 (31,9%) prasadi primećene su blage i srednje mikroskopske promene sa znacima hepatitisa. Nakupljanje mononuklearnih ćelija (makrofaga, limfocita i plazma ćelija) uočeno je u periportalnoj oblasti ili su bile razbacane po parenhimu jetre. Opisani su i znaci blage multifokalne hepatocelularne nekroze. Od 26 životinja koje su bile HEV RT-PCR pozitivne, kod 15 (57,7%) je zabeleženo prisustvo hepatičnih lezija. Sledeće ispitivanje istih autora sprovedeno je 2008. godine, i odnosilo se takođe na utvrđivanje toka i promena izazvanih HEV infekcijom kod prirodno inficiranih prasadi na farmama. Histopatološke lezije I i II stepena su registrovane kod 17 (60,7%), odnosno 6 (21,4%) životinja. Lezije I stepena uključuju blage, multifokalne limfocitne infiltrate u portalnom delu jetre ili razbacane po jetri. Promene II stepena predstavljaju srednje do intenzivne limfocitne inflamacije portalnog dela sa nakupljanjem mononuklearnih inflamatornih ćelija u parenhimu jetre.

U eksperimentu istraživača Bouwknegt i sar. (2009), praćen je razvoj HEV infekcije kod 24 svinje. Prva grupa od 10 svinja su veštački inficirane *i.v* putem, 12 životinja je inficirano tokom oglada, kontaktom sa zaraženim životinjama, a 2 svinje su već prethodno bile zaražene prirodnim putem. Posle žrtvovanja životinja izvršeno je histopatološko ispitivanje jetre i drugih tkiva i organa i poređenje dobijenih rezultata. Nisu zabeležene velike patološke promene ni kod jedne grupe životinja. Mikroskopskim pregledom zapažen je blagi multifokalni histiocitni hepatitis kod sve tri ogledne grupe. Takođe je opisana i blaga infiltracija limfocitnih ćelija u subepitelu žučnih puteva, a u ileumu blaga i srednja hiperplazija Peyerovih ploča. Blaga i srednja hiperplazija je zabeležena i u limfnim čvorovima. Nisu uočene lezije u slezini i pankreasu. Međutim, autori su naglasili da u ogledu nije bila uključena i kontrolna grupa, tako da se pomenute promene u jetri svinja ne mogu isključivo pripisati delovanju hepatitis E virusa. U jednom drugom ogledu, gde su *i.v* veštačkim putem inficirane svinje (Lee et al., 2009), patoanatomskim pregledom jetri žrtvovanih svinja takođe nisu zabeležene veće patološke promene i lezije. Nije bilo kliničke slike bolesti, osim kod jedne životinje, kod koje se 3 dana posle inokulacije pojavila dijareja. Mikroskopskim pregledom jetri se mogla uočiti blaga limfoplazmatična infiltracija i fokalne nekrotične lezije, kao i hepatocelularna vakuolizacija. U ostalim tkivima nisu zabeležene histopatološke promene.

Kurelješić i sar. (2010) su ispitali jetre 12 svinja sa linije klanja i ustanovili patohistološke promene koje odgovaraju multifokalnom limfocitnom hepatitisu u portalnom delu jetre ili su inflamatorne promene bile nepravilno raspoređene u parenhimu jetre. Infiltrat su činile mononuklearne ćelije. Uočena je i nekroza hepatocita. U

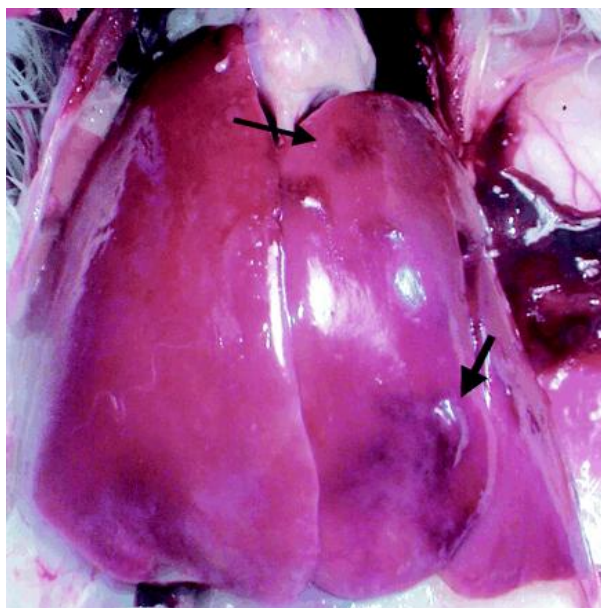
istraživanju koje su sproveli Lipaj i sar. (2010) pregledani su uzorci žuči i jetri 37 tovljenika RT-PCR metodom. HEV RNK je detektovana kod 3 (8,1%) svinje. Kod sve tri životinje zabeležen je limfoplazmatični hepatitis. Uočene su blage inflamatorne promene u periportalnom delu i intersicijumu, centrilobularna nekroza i degeneracija hepatocita sa blagom limfoplazmatičnom infiltracijom.

U pojedinim istraživanjima, autori ističu i drugačije rezultate. Casas i sar. (2011) su pregledali 96 jetri svinja na liniji klanja i kod 6 životinja utvrdili prisustvo HEV RNK. Kod HEV pozitivnih životinja nije bilo značajnih makroskopskih lezija, a samo jedna životinja (1,7%) je imala promene koje odgovaraju blagom periportalnom hepatitisu. Istraživači su zaključili da se ne može ustanoviti korelacija između oštećenja jetre i prisustva HEV RNK u jetri svinja.

Martin i sar. (2007) su u svom istraživanju želeli da ispituju da li HEV deluje samostalno ili u sadejstvu sa nekim drugim agensom, kao što je np. Circovirus svinja, koji je uzročnik oboljenja nazvanog Sindrom slabljenja odbijene prasadi (PMWS). Ukupno je pregledano 156 životinja. Kod 44 (28,2 %) svinje je utvrđeno prisustvo genoma HEV, a od tog broja 25 životinja je imalo simptome PMWS bolesti, dok 19 nije. Kod obe grupe životinja, u uzrcima jetri u kojima je potvrđena HEV RNK, uočen je i hepatitis. Seroprevalenca HEV antitela je bila nešto viša kod životinja sa hepatitisom u odnosu na svinje bez hepatitisa (51,9 % vs. 36,1 %). Svinje sa blagim oblikom hepatitisa su bile HEV seropozitivne, dok su svinje, koje su imale teže inflamatorne promene u jetri, bile HEV seronegativne. Na osnovu rezultata ovog istraživanja autori su zaključili da najverovatnije HEV i Circovirus nezavisno jedan od drugog izazivaju pojavu hepatitisa kod svinja. Takođe, dejstvo HEV virusa kod svinja ne zavisi od PMWS statusa životinja.

Kao što je već navedeno, avijarni hepatitis E virus je uzročnik Sindroma uvećane jetre i slezine (HS sindrom), oboljenja koje je dijagnostikovano kod brojlera i komercijalnih nosilja u SAD. Bolest se karateriše povećanom smrtnošću živine, padom nosivošću jaja i lezijama na jetri i slezini. Kod obolelih ptica javlja se hepatomegalija i splenomegalija. Jetra je najčešće uvećana sa subkapsularnim hemoragijama. Mikroskopski se mogu uočiti limfocitni periphlebitis i phlebitis i hepatocelularna nekroza. U portalnom delu zapaža se infiltracija limfocita, plazma ćelija i heterofila. U jetri i slezini je zabeleženo taloženje amiloida. (Haqshenas et al., 2001; Billam et al., 2005; Agunos et al., 2006; Morrow et al., 2008) (Slika 12)

Slika 12: Subkapsularne hemoragije na jetri živine obolele od HS sindroma



Slika preuzeta iz rada : Bilam et al.: *Systematic Pathogenesis and Replication of Avian Hepatitis E Virus in Specific-Pathogen-Free Adult Chickens*; J. Virol (2005)

2.8. DIJAGNOSTIČKE METODE

Infekcija izazvana hepatitis E virusom slična je drugim tipovima akutnih virusnih hepatitisa ljudi. Klinička slika i simptomi bolesti se ne mogu međusobno razlikovati i zato je dijagnostika zasnovana pre svega na laboratorijskim ispitivanjima. Uglavnom se prisustvo HEV markera testira kod pacijenata kod kojih su prethodne analize dale negativne rezultate, kao što su: IgM antitela protiv hepatitis A virusa; detekcija antigena hepatitis B virusa, IgM antitela protiv hepatitis B virusa i DNK za hepatitis B virus; antitela i DNK za hepatitis C virus; IgM antitela protiv Cytomegalovirusa i Epstein Barr virusa. Trenutno je dijagnostika HEV infekcije ljudi zasnovana prvenstveno na ELISA tehnici i molekularnim metodama: RT-PCR i real-time RT-PCR. Kod svinja infekcija protiče bez simptoma bolesti i u subkliničkoj formi, pa se za dijagnostiku takođe koriste serološke i molekularne tehnike.

Osim navedenih metoda, u upotrebi su i: Western blot metoda, imunohistohemijka metoda, *in situ* hibridizacija, imuna elektronska mikroskopija i imuna fluorescentna mikroskopija. Izolacija virusa za sada nije moguća zbog nedostatka adekvatne ćelije

kulture za rast i umnožavanje hepatitis E virusa, koja bi se manifestovala pojavom citopatogenog efekta.

2.8.1 Serološki testovi - ELISA testovi

Imunoenzimski testovi - ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) su glavno dijagnostičko sredstvo za detekciju IgA, IgM i IgG antitela protiv HEV u krvnom serumu. Ovi testovi se najviše koriste pošto su visoko osetljivi, brzi i jeftini. Predstavljaju dijagnostičko sredstvo izbora kod pacijenata sa znacima žutice i hepatitisa u poznatim endemskim oblastima. Pozitivan rezultat za anti-HEV IgM antitela i desetostruko povišen nivo ALT enzima ukazuju da je prisutna akutna hepatitis E infekcija. Testiranje je potrebno izvršiti u toku akutne faze bolesti, jer se na taj način mogu izbeći lažno negativni rezultati. Lažno pozitivni anti-HEV IgM rezultati su retki, ali se mogu javiti kod autoimunih bolesti i reumatoloških oboljenja. U toku akutne faze se osim anti-HEV IgM antitela može detektovati i prisustvo visokog nivoa ili rastućeg titra IgG antitela protiv HEV. Ukoliko je infekcija završena i nastupila je faza rekoalescencije, u serumu se može utvrditi samo prisustvo IgG antitela.

U prvim serološkim testovima korišćeni su različiti HEV antigeni različitog porekla: veštački sintetisani peptidi (Dawson et al., 1992), proteini dobijeni ekspresijom gena i iz strukturalnog i iz nestrukturalnog regiona koji kodiraju ORF2 i ORF3 (Goldsmith et al., 1992), korišćenje „virus-like particles“ (čestice koja liče na virus) (Li et al., 1997), itd. Ovi prvi testovi su pokazali veliku specifičnost, ali nisku osetljivost, tako da nisu bili pouzdani za detekciju antitela u rekoalescentnoj fazi. Mogu se koristiti samo kao dodatni testovi za potvrdu rezultata dobijenih u drugim ELISA testovima ili za isključivanje ne-specifičnih reakcija.

Savremeni ELISA testovi su zasnovani na korišćenju rekombinantnih proteina kao antigena. Tsarev i sar. su 1993. godina konstruisali prvi rekombinantni baculovirus koji je sadržao kompletni ORF2 region humanog hepatitis E virusa. Zatim su inficirali ćelije insekata ovim rekombinantni baculovirusom i u inficiranim ćelijama se sintetizovao protein koji je imao veličinu kompletnog ORF2 produkta. Istraživači Meng i sar. (1997) su ispitali *in-house* ELISA testom seroprevalenciju HEV svinja na farmama u SAD. Kao antigen u testu korišćen je rekombinantni protein, dobijen postupkom inficiranja ćelija insekata rekombinantnim baculovirusom koji je sadržao kapsidni gen ORF2 sekvence Pakistanskog izolata HEV genotip 1 ljudi - Sar55. Dokazano je da je ovaj rekombinantni kapsidni protein humanog HEV virusa specifično reagovao sa antitelima protiv HEV

svinja. Takođe su rekombinantni kapsidni proteini HEV genotip 3 svinja i HEV genotip 1 ljudi (Sar55) uspešno korišćeni u ELISA testu za detekciju seroprevalencije kod ljudi, odnosno kod veterinara koji rade sa svinjama i kod dobrovoljnih davalaca krvi u SAD (Meng et al., 2002). Nakon što je potvrđeno da se rekombinantni kapsidni protein ORF2 HEV svinja (Meng soj) razlikuje od Sar55 humanog HEV virusa samo 5% na nivou aminokiselina, Engle i sar. (2002) su želeli da uporede međusobnu osetljivost i specifičnost ELISA testova u kojima se kao antigen koristi rekombinantni protein HEV svinja ili HEV ljudi. Prvo su testirani uzorci krvi veštački inficiranih šest rhesus majmuna i dve šimpanze sa humanim HEV virusom. Njihovi krvni serumi su ispitani prvo ELISA testom gde je kao antigen korišćen Sar55 humani HEV virus, a zatim ELISA testom sa antigenom HEV svinja. Komparacijom rezultata oba testa dokazano je da se rezultati slažu u 98%. Zatim su testirana 792 krvna seruma svinja i 882 seruma veterinara i dobrovoljnih davaoca krvi, takođe sa oba ELISA testa. Kod ispitivanja krvi svinja, rezultati oba testa su se poklapali u 93%, a kod seruma ljudi čak 99%. Zaključeno je da nema razlike u detekciji antitela protiv hepatitis E virusa svinja i ljudi korišćenjem oba antigena u ELISA testovima, što potvrđuje da HEV svinja i ljudi ima iste imunodominantne epitope. Za sada ne postoje serološki testovi koji mogu da razlikuju infekciju izazvanu hepatitis E virusom svinja ili hepatitis E virusom ljudi, pošto se HEV genotipovi 3 i 4 svinja i ljudi genetski gotovo uopšte ne razlikuju (Meng, 2010).

Antigenski domeni ustanovljeni su kod sva tri HEV ORF proteina: 12 antigenskih domena u ORF1, 6 antigenskih domena u ORF2 i 3 antigenska domena u ORF3 (Khudyakov et al., 1999). U savremenim ELISA testovima za detekciju IgM i IgG antitela protiv HEV virusa najviše se koriste rekombinantni proteini dobijeni iz C-kraja ORF2 i ORF3 domena ili iz većeg ORF2 segmenta, kao i od celog ORF3 domena. Trenutno je prihvaćeno mišljenje da su testovi koji sadrže rekombinantne ORF2 proteine osetljiviji i pouzdaniji od testova sa rekombinantnim ORF3 proteinom (Ghabrah et al., 1998). Za ispitivanje anti-HEV IgM, IgA i IgG antitela kod ljudi je razvijeno nekoliko *in-house* i komercijalnih testova (Mushahwar, 2008). Sačinjena je i veoma praktična i korisna ELISA, zasnovana na prečišćenom rekombinantnom proteinu ORF2 HEV genotip 1, koja je efikasna u detekciji neutralizacionih antitela protiv HEV virusa svih genotipova sisara-1, 2, 3 i 4 (Zhou et al., 2004). Upotreba ovog testa bi mogla biti korisna u budućnosti za kvantifikaciju humoralnog imunološkog odgovora kod testiranja hepatitis E vakcina.

Do nedavno, serološko ispitivanje HEV infekcije kod svinja se moglo vršiti samo u istraživačkim laboratorijama koje su razvile sopstvene *in-house* ELISA testove, pošto

komercijalni testovi nisu bili dostupni (Meng et al., 1997; De Deus et al., 2008; Casas et al., 2009; Peralta et al., 2009). Istraživači iz Španije, Jimenez de Oya i sar. (2009a, 2009b) su laboratorijski proizveli rekombinantni protein ORF2 HEV genotip 3 i dokazali da se uspešno može koristiti kao antigen u *in-house* ELISA testu za dijagnostiku anti-HEV IgG antitela kako kod svinja, tako i kod ljudi. Antigen je dobijen inficiranjem *Trichoplusia ni* larvi insekata sa rekombinantnim baculovirusom, u kojem je prethodno izvršena ekspresija proteina HEV genotip 3 ORF2. Uporedno je ispitano 66 seruma svinja i 40 seruma ljudi *in-house* ELISA testom i komercijalnim testom. Komercijalni humani test za detekciju anti-HEV antitela ljudi je modifikovan za korišćenje u detekciji antitela kod svinja. Izmena se odnosila na korišćenje konjugovanih anti-svinjskih IgG antitela umesto konjugovanih humanih IgG antitela, što je možda uticalo na dobijene rezultate ispitivanja.. Osetljivost *in-house* testa je iznosila 100% za humane serume, a 96,9% za serume svinja. Komercijalni test je pokazao osetljivost za humane serume 83,3% a za serume svinja 75%. Specifičnost *in-house* testa je iznosila 96,4% i 100% za serume svinja i ljudi, dok su kod komercijalnog kita te vrednosti iznosile 96,4% i 88,2. Nemački istraživači Baechlein i sar. (2010) razvili su novi ELISA test (TiHo-ELISA). Kao antigen u testu koristili su sintetički peptid koji se sastoji od 30 aminokiselinskih rezidua ORF2 proteina i 29 aminokiselinskih rezidua ORF3 proteina, koji oba potiču od humanog HEV genotipa 1 (Burmise tip). Nedavno je proizveden i prvi komercijalni ELISA test za detekciju HEV infekcije kod svinja (Prionics, Švajcarska), ali još uvek nema dovoljno objavljenih rezultata istraživanja ovim testom.

Potrebno je istaći činjenicu da je vršena komparacija različitih humanih ELISA testova, komercijalnih i nekomercijalnih, u kojima su testovi pokazali različitu osetljivost. Mast i sar. (1998) su poredili rezultate ispitivanja 12 testova u kojima su ispitani poznati pozitivni serumi, a dokazana osetljivost testova se kretala u rasponu od 17-100%. Takođe su ispitani i serumi dobrovoljnih davalaca krvi i rezultati ispitivanja su se poklapali u rasponu od 49-94% (srednja vrednost: 69%). Postoje i podaci o različitoj osetljivosti testova za detekciju HEV kod svinja. Prethodno pomenuti istraživači Baechlein i sar. (2010) su upoređivanjem dobijenih rezultata sa dva testa za detekciju anti-HEV antitela kod svinja (novi TiHo ELISA test i komercijalni test Microgen zasnovan na Western blot tehnologiji), zaključili da se dobijene vrednosti međusobno poklapaju u samo 56,1%. Sa druge strane, istraživači Myint i sar. (2006) su ispitivali osetljivost i specifičnost 5 komercijalnih testova u vreme izbijanja HEV epidemije u Indoneziji. Dokazali su da se rezultati dobijeni u testiranju sa dva IgM anti-HEV komercijalna ELISA testa poklapaju 81%, a poređenjem rezultata tri IgG i jednog total IgG anti-HEV ELISA testa pokazali su

da su se vrednosti detektovanih antitela poklapale u 85%. Svi izneti rezultati istraživanja i poređenja različitih testova ukazuju na potrebu standardizacije seroloških testova za detekciju HEV infekcije kod svinja i ljudi.

Osim pomenutih ELISA testova za detekciju antitela, razvijen je i indirektni sandwich ELISA test za detekciju HEV antigena u humanim serumima. Vezana antitela na ploči predstavljaju kombinaciju 3 monoklonska antitela. Ova antigen ELISA je sačinjena tako da može da detektuje kapsidne proteine HEV genotipova 1 i 4. HEV antigen se može detektovati pre porasta nivoa ALT enzima u slučaju akutne infekcije. Test može imati primenu za dijagnostiku HEV infekcije pre pojave serokonverzije (Zhang et al., 2006).

2.8.2 Molekularna metode - RT PCR i real-time RT-PCR

Savremene molekularne tehnike, kao što su nested RT-PCR (reverzna transkripcija polimeraza lančane reakcije) i real-time RT-PCR (koji se još naziva i kvantitativni RT PCR - *qRT PCR*), postale su metoda izbora za detekciju HEV virusne RNK. Kod ljudi se koriste se za utvrđivanje virusnog genoma u serumu, žuči i uzorcima fecesa. PCR testiranje je važno izvršiti što pre, u početnoj fazi bolesti, pošto viremija i fekalno izlučivanje traju kratko. Virusna RNK se u krvi obolele osobe može detektovati 6-40 dana od momenta izlaganja kontaktu sa virusom, a u fecesu izlučivanje započinje oko nedelju dana pre pojave simptoma oboljenja i traje još oko 2 nedelje posle prestanka simptoma oboljenja. U nekim slučajevima, kod pacijenata sa subkliničkom formom bolesti, detekcija HEV RNK može biti jedini dokaz prisustva infekcije. Takođe, u zemljama koje nisu endemska područja kod obolelih ljudi često postoji slab imunološki odgovor koji se ne može utvrditi ELISA testom pa su molekularne metode neophodne. Osim dijagnostičke uloge, molekularne metode omogućavaju i karakterizaciju različitih genotipova hepatitis E virusa (Worm et al., 2002; Mushahwar, 2008; Pino et Saiz, 2007)

Molekularne tehnike se koriste i za dokazivanje HEV genoma u kliničkim uzorcima seruma, fecesa i organa domaćih svinja i drugih životinjskih vrsta, kao što su: divlje svinje, jeleni, živina, pacovi i dr. Sa aspekta zaštite životne sredine, molekularni metodama detekcije ispituju se uzorci pijaće vode i otpadnih voda poreklom sa svinjarskih farmi i klanica (Vasickova et al., 2007).

Pokazalo se da je za dokazivanje HEV infekcije serološko ispitivanje krvi svinja ELISA testovima nedovoljno, pošto se IgG antitela mogu detektovati najranije dve nedelje od momenta nastanka infekcije. Viremija i izlučivanje virusa putem fecesa se može javiti

kod inficiranih životinja mnogo pre pojave imunološkog odgovora, što znači da i seronegativne svinje mogu biti inficirane HEV virusom. Pošto je viremija prolaznog karaktera i traje samo 1-2 nedelje, a putem fecesa se virus duže izlučuje- 3-7 nedelja, feces se preporučuje kao najbolji uzorak za ispitivanje prisustva HEV RNK kod svinja. Prethodno je pomenuto da se HEV genotipovi 3 i 4 svinja i ljudi genetski gotovo ne mogu razlikovati, tako da nije neophodan razvoj posebne molekularne tehnike za detekciju HEV svinja. (Meng et al., 1998; Meng, 2010; Pavo et al., 2010)

RT-PCR metoda je kvalitativna metoda i služi za utvrđivanje prisustva ili odsustva virusne HEV RNK u biološkim uzorcima. Ova tehnika se sastoji od dva ili tri koraka. Prvi korak predstavlja reverzna transkripcija u kojoj se koriste specifični prajmeri, da bi se virusna RNK prepisala u cDNK (komplementarna DNK). U drugom ili trećem stepenu PCR ili nested PCR metode koriste se specifični prajmeri koji služe da bi se umnožili segmenti virusne RNK. Do sada su u svetu razvijeni mnogobrojni *in-house* RT-PCR testovi. Prvo je razvijen test koji je bio specifičan samo za jedan genotip HEV izolata svinja (Meng, 1998), a zatim su američki istraživači Huang i sar. (2002) razvili univerzalni RT-PCR metod sa degenerativnim HEV prajmerima kojima se mogu detektovati različiti genotipovi hepatitis E virusa. Ovim RT-PCR testom ispitano je 80 uzoraka fecesa i 16 seruma prasadi uzrasta od 2 do 4 meseca sa 37 različitih farmi svinja u SAD. Oko 35% (34/96) ispitanih svinja i 54% (20/37) zapata je bilo sa pozitivnim nalazom na prisustvo HEV RNK, a unutar ORF2 gena HEV virusa je determinisana sekvenca od 348bp. U istraživanju autora de Deus i sar. (2007) korišćen je nested RT-PCR sa degenerativnim prajmerima koji su služili za umnožavanje HEV ORF2 segmenta. Ovim testom su ispitani uzorci seruma, žuči, jetre, limfnih čvorova i fecesa kod 69 prasadi i svinja uzrasta od jedne nedelje do 4 meseca. Virusna RNK je detektovana u najmanje jednom uzorku kod 26 životinja od ukupno 69 ispitanih. Najčeće HEV RNK pozitivan uzorak je bila žuč. Detektovana sekvenca je iznosila 212 bp.

Nedostatak klasičnog RT-PCR metoda je to što je podložan kontaminaciji i što se ne može ustanoviti količina virusa u uzorku (Vasickova et al., 2007). Zbog toga je razvijen kvantitativni ili tzv. real-time RT-PCR test. Ovaj test je visoko osetljiv i specifičan. Rezultati se mogu dobiti brzo, u realnom vremenu i može se izvršiti kvantifikacija virusne RNK u uzorku (količina virusa u 1 ml biološkog uzorka). U upotrebi su dve vrste real-time RT-PCR metode za detekciju genoma hepatitis E virusa: SYBR Green RT-PCR i TaqMan RT-PCR. Obe metode, međutim, imaju i svoje nedostatke. U SYBR Green metodi se koristi cDNK umesto virusne RNK koja potiče direktno iz uzorka, što može dovesti do

pojave slučajne greške. Takođe, ova tehnika pokazuje i manju specifičnost. Drugi metod, TaqMan RT-PCR u početku nije bio dovoljno osetljiv za detekciju male količine virusnog genoma u ranoj fazi razvoja HEV infekcije, što je prikazano u radu Mansuy i sar. (2004a). U jugozapadnom delu Francuske, od ukupno 461 pacijenta sa znacima hepatitisa nepoznate etiologije, kod 46 pacijenata ustanovljeno je prisustvo anti-HEV antitela, dok je u 17 slučajeva dobijena sumnjiva reakcija. Prisustvo HEV RNK je zatim ispitano real-time RT-PCR metodom kod svih testiranih 63 uzoraka krvnih seruma. Kod pacijenata sa potvrđenim visokim titrom anti-HEV antitela nalaz HEV RNK je bio pozitivan, ali u uzorcima koji su dali sumnjivu reakciju u ELISA testu, nije ustanovljeno prisustvo virusnog genoma. Ovi istraživači su u svom radu koristili degenerativne prajmere i degenerativne probe, što je kasnije dokazano da smanjuje osetljivost i specifičnost testa. Drugi nedostatak je bio što su koristili *two-step RT-PCR* metodu (metodu iz dva koraka), koja odvaja RT korak od PCR koraka, što povećava rizik od zagađenja i otežava laboratorijski rad. Dalja istraživanja su išla u pravcu razvijanja osetljivijeg real-time testa zasnovanog na TaqMan tehnologiji. Istraživači iz Južne Koreje (Ahn et al., 2006) su razvili real-time RT-PCR u kojem je izvršena *in vitro* transkripcija cRNK sa klonirane cDNK humanog HEV ORF2 genotip 3. Prajmeri i probe dizajnirani su na osnovu nukleotidnih sekvenci HEV. Osetljivost testa iznosila je 1.68×10^1 kopija po reakciji. real-time RT-PCR je u poređenju sa RT PCR metodom bio osetljiviji, pošto se HEV RNK mogla dokazati i u uzorcima koji su u konvencionanim RT PCR metodama bili negativni. Nedostatak ovog testa je što autori opisuju samo mogućnost detekcije HEV genotip 3, a detekcija ostalih genotipova nije izvršena. Istraživači Jothikumur i sar. (2006) razvili su *One-step TaqMan real-time RT-PCR* za detekciju sva četiri HEV genotipa sisara (1- 4). *One-step* metoda omogućava da se i RT i PCR odvijaju u jednoj tubi, što smanjuje mogućnost kontaminacije i greške prilikom pipetiranja. Prajmeri i probe u ovom testu su dizajnirani na osnovu 27 sekvenci ORF 3 regiona. Za evaluaciju testa korišćeno je 13 HEV izolata koji su predstavljali sva četiri HEV genotipa. TaqMan RT-PCR je identifikovao HEV RNK u svim uzorcima. Francuski istraživači, Enouf i sar. (2006) su dizajnirali *Single real-time TaqMan RT-PCR* test koji koristi samo jedan set prajmera i proba u okviru HEV ORF2 regiona za detekciju sva 4 genotipa HEV virusa. Izvršeno je testiranje dve vrste uzoraka. Najpre je ispitano 52 uzorka fecesa i seruma ljudi i svinja, u kojima je klasičnim RT PCR prethodno potvrđeno prisustvo HEV RNK. Virusna RNK dokazana je u svim uzorcima i real-time metodom. Drugi deo testiranja odnosio se na 120 uzoraka seruma i fecesa ljudi sakupljenih u periodu između 6. i 14. dana od pojave kliničkih znakova bolesti. Real-time RT-PCR testom je

virusna HEV RNK dokazana i u onim uzorcima koji su bili negativni u konvencionalnom RT PCR testu. Na osnovu iznetih rezultata, autori su zaključili da je real-time RT-PCR metoda 10 do 100 puta osetljivija u odnosu na klasičnu RT PCR metodu. Prednost je i mogućnost kvantifikacije veoma male količine HEV virusa: od $1,8 \times 10^1$ do $7,2 \times 10^3$ kopija/ μ l uzorka fecesa i seruma. U Kini su Zhao i sar. (2007) HEV RNK je dokazana u 127 (30,5%) uzorka real-time metodom, a u 83 (20,0%) uzoraka klasičnim RT -PCR testom. Dobijeni rezultati su se poklapali u 80% uzoraka. Na osnovu iznetih analiza, autori zaključuju da je real-time osetljivija metoda od konvencionalnog RT-PCR testa. Specifičnost real-time testa je iznosila 100%, a detektovano je $5,6 \times 10^3$ kopija RNK po reakciji. Prajmeri za real-time RT-PCR su dizajnirani za HEV ORF3 region, a ispitane sekvence HEV virusa su pripadale HEV genotipovima 1 i 4, koji su najviše zastupljeni kod ljudi u Kini.

Istraživači iz Kanade Ward i sar. (2009) su poredili 4 različita TaqMan real-time testa: A (Masuy et al., 2004), B (Enouf et al., 2006), C (Ahn et al., 2006) i D (Jothikumar et al., 2006) sa klasičnim RT-PCR testom (Huang et al., 2002). Ukupno je ispitano 87 uzoraka fecesa i 103 uzoraka krvi svinja. Virusna RNK detektovana je u 31 uzorku fecesa i 5 uzoraka plazme klasičnim RT PCR. Rezultati dobijeni real-time testovima za fecese i serume su bili: 7 i 0 (A), 0 i 0 (B), 12 i 0 (C) i 32 i 4 (D). U ovom eksperimentu TaqMan sistem D (Jothikumar et al., 2006) pokazao je veću senzitivnost i osetljivost za HEV genotip 3, koji je najzastupljeniji u Kanadi, u odnosu na ostale 3 real-time metode. TaqMan test D je bio 10 puta osetljiviji u odnosu na konvencionalni RT PCR, pošto je detektovao HEV RNK u jednom uzorku fecesa više. U ovom testu takođe nije bilo ni lažno pozitivnih rezultata. Ovi autori preporučuju da se u ispitivanjima koriste obe metode, real-time za screening zbog veće osetljivosti, a nested RT PCR sistem za dalju molekularnu karakterizaciju HEV genotipova u uzorcima tkiva, hrane i vode.

Ukazala se potreba za brzom, osetljivom i specifičnom metodom za detekciju HEV virusa u različitim uzorcima, uključujući i uzorke hrane i kontaminirane vode. Sa namerom da odgovore na ove zahteve, Gyarmati i sar. (2007) su razvili dva real-time RT-PCR testa. Jedan je zasnovan na TaqMan metodi, a drugi koristi Primer-Probe Energy Transfer (PriProEt) tehniku. U poređenju sa PriProEt, TaqMan test je pokazao nešto bolje osobine. Međutim, PriProEt bolje podnosi tačkaste mutacije u target nukleinskoj kiselini, što predstavlja prednost za detekciju novih genotipova u budućnosti. Oba testa su visoko osetljiva, sa detekcijom manjom od 20 ekvivalenta virusnog genoma po reakciji, i veoma su specifični, u poređenju sa klasičnim RT PCR. Oba real-time RT-PCR testa mogu da

detektuju sva 4 HEV genotipa u različitim uzorcima tkiva i fekalija. Takođe, rizik od unakrsne kontaminacije (cross-kontaminacija) ne postoji, zato što se PCR tube ne otvaraju za vreme dijagnostičkog procesa. Testovi se odlikuju velikom brzinom izvođenja, pošto se rezultat može dobiti za manje od 4 sata (TaqMan) ili nešto više od 4 sata (PriProEt) od momenta kada uzorak stigne u laboratoriju.

U najnovijem istraživanju čeških autora Vasickova i sar. (2012) opisana je optimizacija *two-tube* triplex kvantitativnog real-time RT-PCR testa za detekciju i kvantifikaciju HEV RNK u različitim uzorcima. Prajmeri i probe dizajnirani su tako da detektuju dva različita lokusa HEV genoma. Ukupno je ispitano 48 uzoraka krvi divljih svinja, 17 jelena i 28 muflona. Kao referentna metoda korišćen je konvencionalni RT PCR. Utvrđeno je da je qRT-PCR više specifičan, pošto je ovim testom HEV RNK detektovana u 5 uzoraka više (jedna divlja svinja i četiri muflona) u odnosu na konvencionalni RT PCR.

2.8.3 *Western blot tehnika*

Western blot tehnika (ili kako se često naziva *protein immunoblot*) je analitička metoda koja se koristi za detekciju i određivanje specifičnih imunoglobulina u uzorcima tkiva ili ispitujućih seruma. Istraživači Hyams i sar. (1992) su koristili Western blot metodu za testiranje 39 seruma dece obolele od hepatitisa E u Sudanu. U 23 (59%) uzorka seruma je utvrđeno prisustvo IgM anti-HEV antitela. Li i sar. (1994) su dizajnirali rekombinantne proteine koji sadrže aminokiselinske sekvence iz regiona ORF 2 i ORF 3 kineskog humanog soja HEV i izvršili fuziju sa glutation S-tranferazom (GST). Proteini su transferisani na nitroceluloznu membranu i izvršena je proba sa serumima ljudi inficiranih HEV virusom ili serumima rhesus majmuna veštački inficirani sa HEV. Anti-ORF antitela su mogla detektovati u serumima većine pacijenata i majmuna do 17 dana infekcije, ali su brzo nestajala i nisu mogla da se detektuju posle 100. dana infekcije. Anti-ORF 2 antitela su se mogla detektovati u isto vreme kad i anti-ORF 3 antitela, ali su se duže zadržala u cirkulaciji. Autori su zaključili da carboxy-terminal regiona ORF 2 HEV sadrži epitope koji mogu da prepoznaju antitela u konvalescentnoj fazi. Western blot tehniku su koristili i istraživači Chandler i sar. (1999), koji su ispitivali prisustvo HEV infekcije kod svinja u Australiji, kao i Yoo i sar. (2001), za dijagnostiku HEV infekcije kod svinja u Kanadi. Razvoj savremene ELISA tehnike, koja je bila brža i jednostavnija za izvođenje, potisnuo je Western blot metodu. Međutim, pošto je osetljivost i specifičnost Western blot metode veća od ELISA tehnike, koristi se i dalje kao tzv. „zlatni standard“. Ova tehnika je pogodna za tačno definisanje rezultata (pozitivno ili negativno), naročito kod seruma kod

kojih se u toku više ponavljanja dobija sumnjivi rezultat u ELISA testu. Istraživači iz Španije (Jimenez de Oya et al., 2009) su poredili rezultate ispitivanja prisustva HEV infekcije u serumima svinja pregledanim komercijalnim i *in-house* ELISA metodom, a zatim su serume kod kojih se rezultati dobijeni u oba testa nisu podudarali proverili Western blot tehnikom. Uzorci 8 svinjskih seruma koji su dali pozitivni nalaz prilikom testiranja *in-house* metodom a negativnu u komercijalnom ELISA testu, su bili pozitivni prilikom provere Western blot metodom. Pet seruma koji su dali pozitivan nalaz u komercijalnom ELISA testu a negativan u *in-house* ELISA testu, su takođe bili negativni u Western blot testu.

Na tržištu postoji, za sada jedini, komercijalni Western blot test za detekciju anti-HEV antitela u serumu ljudi (recomBlot HEV, Microgen, Germany). Istraživači Asimoula i sar. (2009) su modifikovali test i prilagodili ga ispitivanju HEV infekcije kod svinja u Grčkoj. Izmena u testu se odnosila na korišćenje HRP-konjugovanih IgG svinjskih antitela umesto HRP-konjugovanih IgG humanih antitela. Ukupno je pregledano 96 uzoraka krvi svinja, a 76 (80%) je bilo HEV pozitivno.

2.8.4 *Imunohistohemijska metoda*

Imunohistohemijska metoda je tehnika zasnovana na detekciji antigena u ćelijama oisečka tkiva na principu specifičnog vezivanja antitela za antigen u tkivu. Istraživači Ha i Chae (2004) opisali su upotrebu imunohistohemijske metode za ispitivanje HEV antigena u parafinskim blokovima različitih tkiva 30 prirodno inficiranih svinja. Najintenzivniji imunohistohemijski signal zapažen je u citoplazmi hepatocita jetre, dok je u ostalim organima (limfni čvorovi, slezina, bubrg, tonzile i ćelije laminae propria tankih i debelih creva) intezitet obojenosti bio znatno manji.

2.8.5 *In situ hibridizacija*

In situ hibridizacija je metod u kojem se koristi obeležena komplementarna DNK ili RNK (cDNA ili cRNA) da bi se lokalizovala specifična DNK ili RNK sekvenca u delu tkiva. Ovaj metod se razlikuje od imunohistohemijskog metoda, koja lokalizuje antigen u oisečku tkiva. Istraživači iz Južne Koreje Choi i Chae (2003) su metodom *in situ* hibridizacije detektovali hepatitis E virus u jetri i ekstrahepatičnom tkivu 20 prirodno inficiranih svinja, poreklom iz 20 zapata. Životinje su odabrane na osnovu RT-PCR pozitivnih rezultata. Za detekciju HEV u parafinskim oisečcima tkiva korišćena je neradioaktivna digoxigenin-obeležena cDNK. Jak signal se mogao uočiti u hepatocitima i

ćelijama žučnih puteva. Pozitivan signal je bio znatno slabiji u tankim i debelim crevima, limfnim čvorovima, tonzilama, slezini i bubregu. Isti autori (Choi et al., 2003) su poredili rezultate dobijene RT-PCR metodom i *in situ* hibridizacijom u uzorcima parafinskih oisečaka jetri 40 svinja. U svom istraživanju su utvrdili da se rezultati ispitivanja poređenjem obe metode poklapaju 100%.

2.8.6 *Imunofluorescentna mikroskopija (IFE)*

Imunofluorescentna mikroskopija (IFE) je tehnika zasnovana na detekciji antitela koja reaguju specifično sa HEV antigenom semikvanitativno. Anti-HEV antitela blokiraju vezivanje fluorescein-konjugovanih anti-HEV IgG za HEV antigen u smrznutom tkivu (Krawczynski and Bradly, 1989). Ovaj metod je komplikovan i skupa za izvođenje i zbog toga nije našo primenu u rutinskoj dijagnostici.

2.8.7 *Imunoelektronska mikroskopija (IEM)*

Ovom tehnikom se dokazuju HEV virusne partikule (VLP-virus like particles) u uzorcima tkiva (Balayan et al., 1983). HEV partikule precipitiraju sa anti-HEV antitelima. Koncentracija anti-HEV antitela se određuje semikvantitativno na osnovu procene količine vezivanih antitela. Metod je takođe težak za izvođenje i nedovoljno osetljiv za rutinsku dijagnostiku.

2.8.8 *Izolacija virusa*

Trenutno nema dokaza o postojanju ćelijske kulture koja omogućava umnožavanje hepatitis E virusa uz posledični razvoj citopatogenog efekta. Postoje istraživanja u kojima je opisano da se u pojedinim ćelijskim kulturama, kao što su ćelije pluća, bubrega i jetre ljudi (BS, A549, Hep-G2) hepatitis E virus replikuje. Međutim, u ovim ćelijskim kulturama se mogu detektovati samo HEV partikule, a ne i virus. Ove ćelijske kulture pokazuju i slabu reproducibilnost (Tam et al., 1997; Worm et al., 2002; Vasickova et al., 2007)

2.9 **TERAPIJA I PROFILAKSA**

Lečenje pacijenata obolelih od hepatitis E infekcije se uglavnom ne primenjuje, osim u slučajevima komplikacija sa akutnim oštećenjem jetre. Terapija je potporna i odnosi se na ublažavanje simptoma bolova u mišićima, groznice, povraćanja i dr. Kod

pacijenata sa oštećenjem jetre u terapiju se uvode lekovi koji sprečavaju nastanak edema mozga. Novija istraživanja ukazuju na mogućnost nastanka i hroničnih promena na jetri kod imunosupresivnih osoba koje su obolele od HEV i tada je u terapiju potrebno uključiti interferon ili anti-virusne lekove (ribavirin). Važno je naglasiti da se sva dosadašnja iskustva lečenja HEV infekcije anti-virusnim lekovima odnose na HEV genotip 3 (R. Aggarwal, 2011).

Kontrola i prevencija HEV infekcije se, pre svega, odnose na sprovođenje sanitarnih mera, imunoprofilakse i vakcinacije (I. Mushawar, 2008).

Pošto se HEV prenosi fekalno-oralnim putem, unapređenje higijenskih i sanitarnih mera su najvažniji u zemljama u razvoju, u oblastima gde postoji nizak nivo higijene i gde se hepatitis E javlja kao endemska infekcija. Mere koje je potrebno sprovesti odnose se na korišćenje higijenski ispravne vode za piće i navodnjavanje, povećanje lične higijene, pravilno rukovođenje humanim otpadom, higijenska priprema namirnica i izbegavanje konzumacije sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa.

Pasivna imunoprofilaksa se odnosi na zaštitu od HEV infekcije putem infuzije hiperimunog seruma. U ogledu Tsarev-a i sar. (1994), cynomolgus majmunima je putem infuzije aplikovan hiperimuni serum koji je u sebi imao visok nivo anti-HEV imunoglobulina poreklom od obolelih ljudi u rekoalescentnoj fazi bolesti. Posle dva dana izvršen je *challenge* (inficiranje sa visokovirulentnom dozom virusa). Majmuni kojima je aplikovan hiperimuni serum nisu oboleli od HEV infekcije, a značajno je bilo smanjeno izlučivanje virusa putem fecesa. Životinje koje su bile u kontrolnoj grupi, samo su inficirane i nisu prethodno dobile serum i kod njih je zabeležena serokonverzija, viremija i izlučivanje virusa u fecesu. Međutim, hiperimuni serum do sada nije testiran na ljudima i ne postoji u komercijalnom obliku na tržištu.

Komercijalna vakcina protiv hepatits E infekcije još uvek nije dostupna, ali postoji velika potreba, pošto je procenjeno da čak jedna trećina svetske populacije živi u zemljama u razvoju, u neadekvatnim sanitarnim uslovima i u endemskim oblastima gde često nastaju HEV epidemije. Zabeležene su hiljade slučajeva obolelih u Kini, Sudanu, Ugandi i dr. Razvoj atenuirane ili inaktivisane komercijalne vakcine za sada nije moguć, zbog toga što ne postoji adekvatna ćelijska kultura za umnožavanje hepatits E virusa. Zbog toga su istraživanja usmerena na proizvodnju vakcine zasnovane na korišćenju rekombinantnog proteina. Mnogobrojne vakcine su tek u pred-kliničkoj fazi ispitivanja na životinjama, a samo pojedine su prošle testiranja i na ljudima. Ohrabruje podatak da je proizvodnja vakcine moguća, zahvaljujući i činjenici da je do sada otkriven samo jedan HEV serotip

(Emerson and Purcel, 2003; S. Kamili, 2011; Aggarwal, 2008; Teshale and Hu, 2011; Pinto and Saiz, 2007).

Istraživanja ka pronalaženju pogodne HEV vakcine su usmerena u nekoliko pravaca:

- *Hepatitis E vakcine dobijene ekspresijom proteina u bakterijskim ćelijama*

a) trpE-C2 protein

Prva proizvedena HEV vakcina u sebi je posedovala rekombinantni ORF protein genotip 1 (Burmese tip), dobijen postupkom ekspresije proteina u bakteriji *Escherichia coli* (*E.coli*). Rekombinantni protein trpE-C2 je bio sačinjen od 439 aminokiseline smeštene na C kraju ORF2. Ispitivanja su vršena na *Cynomolgus macaques* majmunima. Vakcinacija majmuna nije pokazala punu zaštitu protiv bolesti nakon veštačke infekcije, ali se ovaj ogleđ smatra prvim pokušajem u proizvodnji vakcine za zaštitu protiv HEV infekcije (Purdy et al., 1993).

b) pE2 protein

Mali protein, veličine od 394-607 aminokiselina ORF2 regiona kineskog HEV izolata je takođe proizveden ekspresijom u bakteriji *E.coli*. Ova vakcina je ispitana na rhesus majmunima, gde je utvrđeno de je vakcina proizvela imunološki odgovor kod 2 od 3 vakcinisana majmuna i smanjila ekskreciju virusa putem fecesa, ali nisu objavljeni podaci da li je zaista sprečila i nastanak infekcije (Zhang et al., 2009)

c) HEV 239

HEV 239 je rekombinantni protein koji sadrži 368-606 aminokiselina ORF2 HEV genotip 1 (Kineski soj), dobijen ekspresijom u bakteriji *E. coli*. Posle uspešne vakcinacije majmuna, ova vakcina je testirna i na ljudima. U pred-kliničkim ispitivanjima je bila sigurna i pokazala dobra imunogena svojstva (Li et al., 2005a).

- *Hepatitis E vakcine dobijene ekspresijom proteina u ćelijama insekata*

Proizvedeno je nekoliko vakcina koje su sačinjene od rekombinantnog HEV proteina, dobijenog ekspresijom proteina u ćelijama insekata, a to su : 56-kDa protein, 53-kDa protein i r62-kDa protein. Najveći uspeh u ispitivanju postignut je sa 56kDa vakcinom, koja čini rekombinantni protein soja Pakistan Sar55 HEV (genotip 1), dobijen ekspresijom preko baculovirusa u ćelijama insekata. Ova vakcina je prošla pred-klinička ispitivanja i

ušla u fazu kliničkih ispitivanja na ljudima (Robinson et al., 1998; McAtee et al., 1996; Zhang et al.; 2001).

- *VLP vakcine (Virus-like particles)*

Ekspresijom rekombinantnog ORF2 proteina Burmese HEV soja u ćelijama insekata, dobijene su čestice (VLP) koje imaju ista antigena svojstva kao i prirodne HEV čestice. Osim toga, dokazano je da ove čestice imaju i sposobnost umnožavanja, lako se mogu pripremiti u većim količinama sa velikim stepenom čistoće, tako da predstavljaju pogodne kandidate za razvijanje vakcine protiv HEV infekcije (Li et al., 2004)

- *DNK vakcine*

Proizvodnja DNK vakcine se razlikuje od tradicionalnog načina, pošto se sinteza imunizacionog proteina odvija u ćeliji domaćina i oponaša prirodnu infekciju, indukujući humoralni i celularni imunitet. DNK vakcine takođe imaju prednost zato što su lake za pripremu, bez potrebe manipulacije sa virulentnim patogenom. Njihova proizvodnja nije skupa i istraživanja u pronalaženju efikasne vakcine protiv HEV infekcije će takođe ići u pravcu proizvodnje DNK vakcine (S. Kamili, 2011).

Do danas su samo dve vakcine, kao što je već navedeno, prešle u fazu kliničkih ispitivanja. Najpre su Shresta i sar. (2007) ispitali efikasnost i sigurnost HEV vakcine, koju je činio rekombinantni protein 56kDa, na 1.794 ljudi u Nepal. Jednu grupu je predstavljalo 898 ljudi koji su vakcinisani trokratno rekombinantnom HEV vakcinom (0., 1. i 6. meseca), a drugu grupu 896 ljudi koji su primili placebo vakcinu. Posle trokratne vakcinacije, hepatitis E se razvio kod 66 ljudi koji su bili u placebo grupi, a samo kod troje ljudi koji su primili pravu vakcinu, što je dokazalo da efikasnost vakcine iznosi 95,5%. Autori su zaključili da je vakcina efikasna u prevenciji HEV infekcije. U sledećem značajnom istraživanju, Zhu i sar. (2010) su ispitali efikasnost i bezbednost rekombinantne vakcine HEV 239 na velikom broju učesnika, zdravih muškaraca i žena, starosti od 16 do 65 godina, u 11 gradova kineske provincije blizu Šangaja, u periodu od 2007. do 2009. godine. U ogledu je ukupno učestvovalo 11.604 ljudi, od kojih je 56.302 dobilo tri doze vakcine 0., 1. i 6. meseca, a 56.302 ljudi je činilo placebo grupu. Vakcina je imala protektivno dejstvo od 95, 5% posle prve doze i 100% posle druge i treće doze. Nije zabeležen ni jedan sklučaj obolelih ljudi u vakcinisanoj grupi za vreme od 13 meseci praćena efikasnosti vakcinacije posle aplikacije treće doze vakcine. Iako su obe pomenute

vakcine pokazale veliku efikasnost u toku ispitivanja, nedostatak ispitivanja je što su ogledi trajali veoma kratko. Takođe, mnoga pitanja su ostala nerazjašnjena, kao np.: na koji način vakcina deluje kod bolesnih trudnica i da li može da spreči smrtni ishod kod obolelih pacijenata sa fulminantnim tokom bolesti? Potrebno je svakako nastaviti opsežnija ispitivanja sa ciljem proizvodnje bezbedne HEV vakcine.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Prva preliminarna istraživanja prisustva HEV infekcije u populaciji domaćih i divljih svinja u Republici Srbiji sprovedena su 2008. godine, kada je ustnovjeno da je 30-45% pregledanih uzoraka fecesa i organa svinja sa farmi u Republici Srbiji bilo HEV RNK pozitivno (Petrovic et al., 2008). Nakon toga dokazana su anti-HEV antitela kod domaćih svinja uzgajanih u individualnim gazdinstvima (Lupulovic et al., 2010). Sa namerom da se nastave započeta istraživanja, sprovedi smo serološko ispitivanje raširenosti HEV infekcije kod svinja na farmama na teritoriji Vojvodine i dokazivanje prisustva HEV genoma u uzorcima fecesa, mesa, jetre i žuči kod svinja i prasadi na liniji klanja. Ispitivanja su bila usmerena i na istraživanje HEV seroprevalencije kod ljudi u Vojvodini.

Na osnovu sopstvenih preliminarnih istraživanja , kao i ostalih literaturnih podataka, postavljeni su sledeći ciljevi ispitivanja:

1. Serološko ispitivanje prisustva i raširenosti infekcije izazvane hepatitis E virusom kod svinja na farmama sa industrijskim načinom uzgoja i kod ljudi u Južnobačkom i Sremskom okrugu,
2. Utvrđivanje prisustva genoma hepatitis E virusa u fecesu, mesu, žuči i jetri prasadi i svinja na liniji klanja,
3. Razvoj i uvođenje savremenih laboratorijskih dijagnostičkih metoda: nekomercijalni ELISA testa (*in-house* ELISA), komercijalni ELISA test, Western-blot metoda, real-time RT-PCR i imunohistohemijska metoda za detekciju HEV antigena,
4. Poređenje osetljivosti i specifičnosti laboratorijskih metoda *in house* i komercijalne ELISA tehnike
5. Definisanje protokola laboratorijskog ispitivanja,
6. Utvrđivanje postojanja epidemiloške povezanosti između infekcija kod svinja i ljudi sa istog područja i utvrditi epidemiološki značaj mogućnosti inficiranja ljudi konzumiranjem jetri i mesa inficiranih svinja,
7. Statistička obrada podataka rezultata istraživanja

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. UZORACI FECESA NA FARMAMA

Radi ispitivanja prisustva hepatitis E infekcije na farmama svinja, sa 6 farmi na teritoriji Južnobačkog i Sremskog okruga prikupljeno je po 5 zbirnih uzoraka fecesa, u periodu od oktobra 2010. do januara 2011. godine. Fecesi su prikupljeni od tri proizvodne kategorije životinja: odgoj, predtov i tova. Uzorkovanje je vršeno sterilnim štapićima u količini od oko 10 g fecesa direktno sa poda, sa tri različite strane obora. Uzorci su stavljeni u sterilne, plastične čašice sa poklopcima i vidno obeleženi, a zatim transportovani u frižider torbi sa ledom do laboratorije. U laboratoriji za virusologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ feces je sterilnim špatulama odvajan u sterilne tube za čuvanje uzoraka i zamrzavan na -70°C do pripreme za ekstrakciju RNK ili je odmah vršena obrada i priprema uzoraka za ekstrakciju HEV RNK.

4.1.2. UZORCI KRVI SVINJA I LJUDI

a) Uzorci krvi svinja

Na osnovu rezultata real-time RT-PCR testiranja fecesa sa 6 različitih farmi, za dalja istraživanja seroprevalencije HEV infekcije odabrane su tri pozitivne farme u kojima je dokazano prisustvo HEV RNK. Prikupljanje krvi svinja obavljeno je u periodu od februara do maja 2011. godine.

Sve odabrane ogledne životinje pripadale su rasi švedski Landras i bile su klinički zdrave. Uslovi smeštaja i ishrane su bili u skladu sa industrijskim načinom odgoja svinja. Prasad su, nakon rođenja, bili sa krmačom od 25-30 dana. Nakon 30 dana, krmače se prevode u bukarište radi ponovne oplodnje, a prasad u odgajivalište sa kaveznim sistemom držanja. Prve dve nedelje posle prašenja ishrana krmača je količinski bila umanjena, a zatim se postepeno povećavala uz dodatak antibiotika. U uzrastu od 42-45 dana prasad se vakciniše protiv klasične kuge svinja, Aujeskijeve bolesti i crvenog vetra. U odgajivalištu se prasad zadržava do uzrasta od 70-80 dana. Nakon toga se prebacuju u predtov, gde

ostaju još oko 60 dana do uzrasta od 130-140 dana i težine 50-60 kg. U predtovu se svinje revakcinišu i prebacuju u tovilišta, gde ostaju do uzrasta od 180 dana (oko 6 meseci) i težine od 110-120 kg. Odabiranje nazimica za priplod vrši se kada životinje u tovilištu dostignu telesnu masu od 105-110 kg, a na osnovu tzv. „šaliranja“ (merenje debljine leđne slanine) i genetskih performansi. Izdvojene nazimice se odvajaju za reprodukciju i odvode u poseban objekat sa krmačama, a ostale životinje ostaju u tovilištu do kraja tova. Na farmama su zapažene male razlike među proizvodnim kategorijama životinja u odnosu na uzrast i težinu u zavisnosti od tehnologije i menadžmenta. Ove razlike su bile neznatne i nisu bitno uticale na rezultat ispitivanja.

Ukupno je uzorkovano 300 krvi svinja, po 100 uzoraka sa 3 farme. Sa svake farme krv je sakupljana od po 20 životinja iz 5 različitih proizvodnih kategorija: odgoj, predtov, nazimice, krmače i tovljenici.

Uzorkovanje krvi vršeno je jednokratno, aseptičnom venepunkcijom *v. cave cranialis*. Krv je sakupljana u plastične vakutajnere bez koagulansa, u količini od oko 5 ml. Uzorci su dopremani do laboratorije u ručnom frižideru, rashlađeni na ledu. U laboratoriji se iz uzoraka pune krvi izdvajao serum spontanom koagulacijom na sobnoj temperaturi. Izdvojeni serum je centrifugiran i sakupljan u mikrotube, a zatim zamrzavan na temperaturi od -20°C do ispitivanja.

b) Uzorci krvi ljudi

Uzorci krvi ljudi sakupljeni su u saradnji sa „Zavodom za transfuziju krvi Vojvodine“ i „Zavodom za javno zdravlje Vojvodine“. Ukupno je sakupljeno 200 uzoraka dobrovoljnih davalaca krvi u periodu januar-mart 2010. godine, sa teritorije Južnobačkog i Sremskog okruga. Tokom 2010. godine prikupljena su i 94 uzorka krvi pacijenata obolelih od hepatitisa i rizičnih grupa trudnica (53 trudnice i 41 pacijent Infektivne klinike).

Za potrebe ispitivanja hepatitisa E infekcije kod dobrovoljnih davalaca krvi, sprovedena je anonimna epidemiološka anketa i sakupljeni su podaci neophodni za ispitivanje. Upitnik su popunjavali davaoci krvi prilikom uzorkovanja. Anketni list su činila pitanja koja su se odnosila na: dan, mesec i godinu rođenja, pol, zanimanje, mesto stanovanja, uzgajanje domaćih životinja i kućnih ljubimaca i vrste domaćih životinja. Postavljena su i pitanja u vezi sa preležanim infekcijama izazvanim uzročnicima virusnog hepatitisa (A, B, C ili D) i oboljenjima jetre.

Osim podataka iz anketnog lista, iz Laboratorije za testiranje krvi i Odeljenja za transmisivne bolesti Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine dobijeni su i podaci o prenosivim infekcijama koje se obavezno proveravaju rutinski. Markeri u krvi koji se dokazuju su: hepatitis B površinski antigen (HbsAg), antitela protiv hepatitis C virusa (HCV), antitela i antigen virusa humane imunodeficijencije (HIV) i antitela protiv *Treponema pallidum pallidum* (sifilis).

Krv je prikupljana u vakutajnerima i dopremana u Zavod za transfuziju Vojvodine. Iz krvi se serum spontano izdvajao. Nakon formiranja koaguluma, serum je odvajan u plastične epruvete, centrifugiran na 3000 obrtaja u trajanju od 10 minuta, odvajan u vakutajnere. Iz Zavoda za transfuziju je dopreman u laboratoriju za virusologiju NIV-NS i zamrzavan na -20°C do ispitivanja.

Iz Laboratorije za virusologiju Zavoda za javno zdravlje Vojvodine dobijeni su uzorci iz kolekcije krvnih seruma pacijenata obolelih od hepatitisa, koji su bili hospitalizovani u infektivnoj klinici Kliničkog centra Vojvodine, i rizičnih grupa trudnica. Uzorci su odliveni u plastične minitube u količini od $500\mu\text{l}$ i zamrznuti na -20°C . Sve trudnice su bile u 6-7 nedelji trudnoće i prethodno testirane na prisustvo antitela protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV). Kod obolelih ljudi takođe su prethodno vršena sledeća ispitivanja: prisustvo IgM antitela protiv hepatitis A virusa (HAV IgM), kao i hepatitis B površinski antigen (HbsAg), antitela protiv hepatitis C virusa (HCV) i antitela protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV).

Uzorci ljudskih seruma koji su u našim serološkim ispitivanjima dali pozitivnu ili sumnjivu reakciju na prisustvo antitela protiv HEV, dodatno su testirane u Laboratoriji za biohemiju Zavoda za javno zdravlje Vojvodine na prisustvo enzima jetre: alanin aminottransferaza (ALT) i aspartat aminottransferaza (AST). Određivanje katalitičke aktivnosti ovih enzima značajno je za ispitivanje bolesti jetre pošto je nivo ovih enzima povišen kod virusnih hepatitisa.

4.1.3. UZORCI U KLANICAMA

Uzorci fecesa i tkiva jetre, žuči i mesa sakupljeni su u klanicama, direktno na liniji klanja. Uzorkovanje je vršeno u četiri klanice, na lokalitetu Novog Sada i okoline, u periodu od januara do maja 2012 godine. Dve klanice su bile velikog kapaciteta (industrijske klanice), a dve manjeg kapaciteta (zanatske klanice). Uzorci fecesa i tkiva sakupljeni su od 95 tovljenika, uzrasta 6 meseci i težine oko 100 kg i 50 prasadi, uzrasta od

oko 2 meseca i težine oko 20 kg. Tovljenici su bili poreklom sa 3 farme na kojima je vršeno i uzorkovanje krvi za potrebe seroloških istraživanja, a prasadi poreklom od individualnih proizvođača.

U klanicama se redovno sprovodi veterinarski i sanitarni nadzor. Sve životinje su pre klanja podvrgnute kliničkom pregledu, a nakon klanja (post mortem) se vrši pregled mesa i parenhimatoznih organa na prisustvo parazita i lezija. Sve životinje od kojih su prikupljeni uzorci su bile zdrave, a meso i parenhimatozni organi klasifikovani kao ispravni za ljudsku upotrebu.

Prilikom klanja životinja, u momentu iskrvarenja, prva i poslednja životinja za uzorkovanje u nizu su obeležene zasecanjem uha ili prednje noge. Takođe su evidentirani identifikacioni brojevi životinja i poreklo životinje (farme). Da bi se izbegla unakrsna kontaminacija, uzorkovanje je vršeno potpuno aseptično na liniji klanja u momentu evisceracije unutrašnjih organa. Uzorkovanje tkiva jetre sa žučnom kesom i komada mesa sa trupa vršeno je skalpelom čiji su nastavci menjani posle zasecanja svakog uzorka. Svaki uzorak pojedinačno je stavljan u sterilnu plastičnu vrećicu i obeležen. Uzorci fecesa su uzimani direktno iz debelog creva, nakon zasecanja sterilnim nožićem i skalpelom i sakupljeni u sterilne čašice. Uzorci su u frižider torbi dopremani do laboratorije za virusologiju NIV-NS, gde se vršila dalja obrada. Komadi jetre su deljeni na dva dela: jedan deo je odmah stavljan u 10% formalin i pripreman za kalupljenje za patohistološku i imunohistohemijsku analizu, a drugi deo je sečen sterilnim makazama, stavljan u sterilne kutijice i zamrzavan na - 20°C do obrade. Žuč je sterilnim špricom i iglom aspirirana direktno iz žučne kesice, stavljena u sterilne kutijice i takođe zamrzavana na -20°C. Uzorci fecesa su čuvani na - 20°C do dalje obrade.

4.2.METODE

4.2.1. NEKOMERCIJALNI IMUNOENZIMSKI TEST ZA DOKAZIVANJE SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV HEPATITIS E VIRUSA KOD SVINJA

Nekomercijalni (*in house*) ELISA test je proizveden u laboratorijskim uslovima i služi za detekciju IgG antitela protiv HEV genotip 3 u krvnim serumima svinja. Kao antigen u ovom ELISA testu koristi se rekombinantni baculovirus protein Bac1-Δ-ORF2r,

dobijen inficiranjem *Trichoplusia ni* larvi insekata. Bac1- Δ -ORF2r predstavlja skraćeni i prečišćeni oblik proteina ORF-2 kome nedostaje 111 amino-kiselina na N kraju. Inficiranje larvi i proizvodnja proteina vrši se u laboratoriji biosigurnosnog nivoa 2 u Odeljenju za biotehnologiju, u Nacionalnom Institutu za istraživanja u poljoprivredi i namirnicama (INIA), u Madridu, Španija (*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* INIA). Ukratko, larve je potrebno prvo sedirati inkubacijom na ledu 15 minuta. U njih se injektiraju različite doze (1×10^6 to 3×10^6 PFU/larva) rekombinantnog baculovirus proteina (Bac1- Δ -ORF2r). Ove larve se uzgajaju u inkubatoru na 28°C, uzimaju u različitim periodima postinokulacije i zamrzavaju na -20°C. Zatim se posebnim postupkom maceracije tkiva iz ovih larvi dobija rekombinantni protein koji se koristi u ELISA testu. Rekombinanti HEV Δ -ORF2r protein iz ekstrakta larvi se zatim prečišćava imidazolom. Koncentracija proteina se određuje gel densometrijom, a njegov sastav Western blot metodom.

ELISA RASTVORI

Pre početka izvođenja testa potrebno je pripremiti sledeće rastvore:

Karbonatno-bikarbonatni pufer (pH9,6) (pufer za razređenje i fiksaciju antigena)

- 1,59 g Na₂CO₃
- 2,93 g NaHCO₃
- Dodaje se destilovana voda do 1L
- Čuva se na sobnoj temperaturi ili u frižideru na 4°C

Fosfatno-citratni pufer (pH5) (pufer za pripremu substrata)

- 10,35 g limunske kiseline
- 36,29 g Na₂HPO₄
- Dodaje se destilovana voda do 1L
- Čuva se na sobnoj temperaturi

OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride)-(rastvor substrata)

- 120 mL fosfatno-citratnog pufera
- 1 tableta OPD Sigma (60 mg) P-1063 (0,5mg/ml krajnje razređenje)

- Podeli rastvor u količini od po 6 mL u epruvete i zamrzni na -20°C
- Za jednu ELISA ploču potrebna je jedna epruveta rastvora. Pre postavljanja se dodaje $3,4 \mu\text{L}$ 30% H_2O_2

Sumporna kiselina 3N (STOP rastvor-rastvor za zaustavljanje reakcije)

- 120 mL H_2SO_4
- 10 mL destilovane vode
- Čuva se na sobnoj temperaturi

PBS 10x (koncentrovani rastvor za pripremu rastvora za ispiranje, blocking konjugat)

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 17,2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2,4 g KH_2PO_4
- Dodaje se 800 ML destilovane vode
- Podešava se pH do 7,4
- Dodaje se destilovana voda do 1 L
- Sterilizacija (nije neophodna) u autoklavu
- Čuva se na sobnoj temperaturi

PBS 1x + Tween 0,05 % (rastvor za ispiranje)

- 100 ml PBS 10x
- 900 ml destilovane vode
- 500 ml Tween 20%

3% Mleko u prahu + PBS 1x Tween 0,05 % (rastvor za bloking)

- 3 g mleka u prahu
- 100 ml PBS 1x + Tween 0,05 %

2.5% Mleko u prahu + PBS 1x Tween 0,05 % (rastvor za pripremu konjugata)

- 2.5 g mleka u prahu
- 100 ml PBS 1x + Tween 0,05 %

Procedura testa:

Pre izvođenja testa, potrebno je pripremiti razređenje Δ -ORF2 HEV gt3 proteina u 50 mM rastvoru karbonatno/bikarbonatnog pufera u odnosu 1:1000 (1 μ l antigena+ 999 μ l karbonatno/bikarbonatnog pufera). U mikrotitar ploču sa ravnim dnom (*Nunc, Danska*) u sva polja se nanosi 50 μ l razređenog antigena. Ploča se pokrije i ostavi preko naći u frižideru na 4°C. Ploča se sutradan izvadi i odbaci se sadržaj bez ispiranja. Na mikrotitar ploču se u sva polja nanosi 100 μ l rastvora za bloking i ploča se inkubira u termostatu 1 sat na 37°C. Za vreme inkubacije ploče, potrebno je odmrznuti ispitujuće i kontrolne serume i napraviti razređenja sa rastvorom za bloking u odnosu 1:100. Zatim se mikrotitar ploča ispira sa rastvorom za ispiranje 3 puta. Ostatak sadržaja se odstrani tapkanjem na upijajućoj vati. U bazenčice ploče se nanosi po 50 μ l pozitivnih i negativnih kontrolnih seruma i ispitujućih seruma u duplikatu, po prethodno napravljenoj shemi. Ploča se inkubira 1 sat u termostatu na 37°C, a zatim se ponovo ispira 3 puta sa rastvorom za ispiranje. Neposredno pre nanošenja na ploču potrebno je pripremiti konjugat, tako što se sekundarna anti-svinjska IgG antitela obeležena peroksidazom HRP (proizvođač: *Abcam, Engleska*) razrede u odnosu 1:30.000 sa rastvorom za razređenje konjugata. U sve bazenčice mikrotitar ploče unosi se 50 μ l konjugata i ploča se inkubira 1 sat na 37°C. Posle sat vremena, ploča se ponovo ispira 3 puta i u sve bazenčice se nanosi 50 μ l substrata (OPD+ 3,4 μ l 30% H₂O₂). Ploča sa substratom stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi u tamnoj prostoriji. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 50 μ l stop rastvora (3N H₂SO₄). Absorbanca se očitava na talasnoj dužini od 492 nm u ELISA čitaču. Interpretacija rezultata se vrši poređenjem očitanih vrednosti uzorka sa vrednostima absorbance pozitivne i negativne kontrole.

Interpretacija rezultata:

Kao kontrolni serumi su korišćeni prethodno testirani pozitivni i negativni serumi svinja. Negativnu kontrolu je predstavljao pul od 8 negativnih seruma sa absorbancama nižim od 0.15 (0.05-0.14).

Test je validan ukoliko je srednja vrednost OD_{492nm} pozitivne kontrole dvostruko viša od srednje vrednosti OD_{492nm} negativne kontrole.

Vrednosti absorbance seruma se izražavaju kao P/N odnos (vrednost absorbance test uzorka/ vrednost absorbance negativne kontrole). Uzorci koji imaju absorbancu višu ili jednaku sa cut off vrednosti (P/N \geq 2.5) se smatraju sa pozitivnim, a ispod te vrednosti sa

negativnim nalazom. Ukoliko su vrednosti absorbance blizu cut off vrednosti, uzorke je potrebno ispitati Western blot metodom.

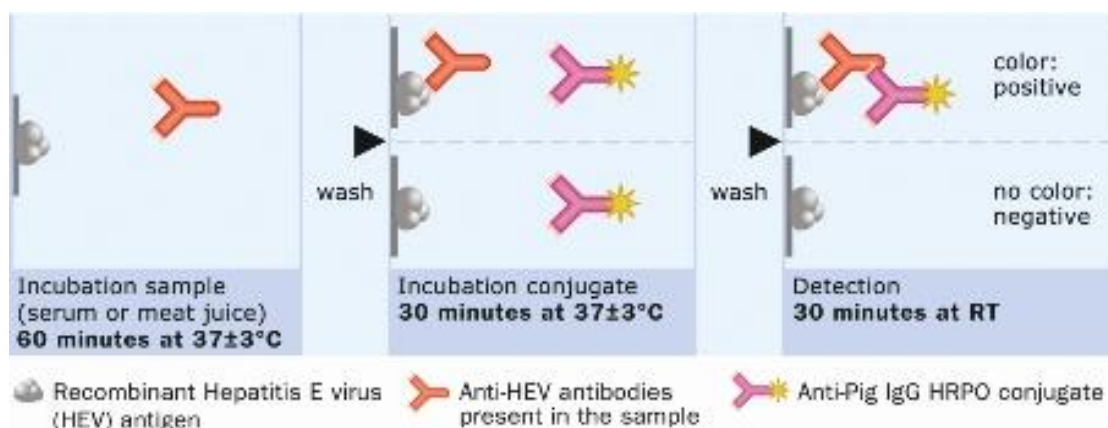
4.2.2. KOMERCIJALNI IMUNOENZIMSKI TEST ZA DOKAZIVANJE SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV HEPATITIS E VIRUSA KOD SVINJA

Za dodatna serološka ispitivanja i poređenje rezultata dobijenih u nekomercijanom *in-house* ELISA testu, koristili smo komercijalni test *PrioCHECK HEV* (*Prionics, Švajcarska*). Ovaj test je dizajniran za detekciju specifičnih antitela protiv Hepatitis E virusa genotip 1 i 3 u uzorcima seruma svinja i zasnovan je na indirektnoj ELISA tehnici.

Princip testa:

Izvođenje ispitivanja upotrebom *PrioCHECK HEV Ab* test kit se sastoji iz 4 koraka: priprema uzorka, inkubacija uzorka, inkubacija sa konjugatom i očitavanje rezultata. Za ELISA ploču vezan je rekombinantni antigen ORF 2 i ORF 3 genotipova HEV 1 i 3. Serumi se inkubiraju na ploči. Anti-svinjsko antitelo obeleženo peroksidazom (konjugat) veže se za rekombinantni HEV antigen i na taj način se vrši detekcija antitela. Nakon toga postavlja se TMB substrat, razvija se boja i meri na talasnoj dužini od 450 nm. Intezitet boje je proporcionalan količini specifičnih antitela protiv HEV u uzorku (Slika 13).

Slika 13: Postupak odvijanja reakcije u ELISA testu



Procedura testa:

Za test se koriste sveži serumi svinja ili odmrznuti serumi koji su se prethodno čuvali na -20°C. Izvođenje ELISA testa se vrši prema uputstvu proizvođača.

Interpretacija rezultata:

Kriterijumi za validaciju testa:

- Srednja vrednost OD_{450nm} pozitivne kontrole minus OD_{450nm} Cut –off kontrole mora biti $\geq 0,3$
- Srednja vrednost OD_{450nm} Cut –off kontrole minus OD_{450n} negativne kontrole mora biti $\geq 0,05$
- Srednja vrednost OD_{450nm} negativne kontrole mora biti $< 0,15$

Izračunavanje Cut off vrednosti uzorka dobija se kada se srednja vrednost OD_{450nm} Cut off kontrole pomnoži sa 1.2:

Srednja vrednost OD_{450nm} Cut off kontrole x 1.2= Cut off

- Rezultat jednak ili veći od Cut off vrednosti se smatra pozitivnim nalazom
- Rezultat između srednje vrednosti OD_{450nm} Cut off kontrole i Cut off vrednosti je sumnjiv i preporučuje se ponovno testiranje. Ukoliko se ponovo dobija sumnjiva reakcija, preporučuje se novo uzorkovanje i testiranje
- Rezultat ispod Cut off vrednosti je negativan

4.2.3. NEKOMERCIJALNI IMUNOENZIMSKI TEST ZA DOKAZIVANJE SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV HEPATITIS E VIRUSA KOD LJUDI

Postupak izvođenja *in house* ELISA testa za detekciju anti-HEV antitela u serumima ljudi je isti kao prethodno iznet postupak za detekciju HEV kod svinja, osim izmena koje se odnose na korišćenje anti-human IgG antitela kao konjugata sa razređenjem 1:10.000 i pozitivnih i negativnih seruma ljudi kao kontrolnih seruma.

4.2.4. KOMERCIJALNI IMUNOENZIMSKI TEST ZA DOKAZIVANJE SPECIFIČNIH ANTITELA PROTIV HEPATITIS E VIRUSA KOD LJUDI

Za dokazivanje ukupnih antitela (IgM i IgG) protiv HEV u uzorcima krvnih seruma ili plazme ljudi, korišćen je komercijalni ELISA set kit *EIAgen HEV Ab*, proizvođača *Adaltis, Italija*. Test je zasnovan na korišćenju sintetičkog imunodominantnog antigena dobijenog iz konzervativnog dela Hepatitis E virusa Meksičkog (genotip 1) i Burnise soja (genotip 2). Ovim testom može se izvršiti kvalitativna detekcija prisustva anti-HEV antitela indirektnom ELISA tehnikom.

Princip testa:

Za mikrotitar ploču vezan je HEV-specifičan sintetički antigen. Kada se na ploču postave razređeni uzorci seruma i ploča inkubira, ukoliko postoje HEV antitela, vezaće se za antigen. Nakon prvog ispiranja ploče, sve preostale komponente iz seruma, koje se nisu vezale za ploču, će se odstrani. U toku druge inkubacije, vezana HEV antitela, IgG i IgM, detektovaće se posle dodavanja konjugata, koji predstavlja poliklonalna specifična anti-HEV IgG i IgM antitela, obeležena peroxidazom (HRP). Dodavanjem TMB (tetrametil benzidin) substrata, u bazenčićima u kojima je nastao antigen-antitelo kompleks detektovan konjugatom, razvije se enzimska reakcija i pojava boje. Intezitet boje je proporcionalan količini anti-HEV antitela u testiranom serumu ili plazmi. Interpretacija rezultata zasnovana je na kvalitativnom određivanju HEV antitela kao pozitivan, sumnjiv ili negativan rezultat.

Procedura testa:

Izvođenje testa se vrši po uputstvu proizvođača.

Interpretacija rezultata:

Test je validan, ukoliko absorbance kontrola i kalibratora zadovoljavaju sledeće kriterijume:

Prazan bazečić	< 0,100 OD _{450nm}
Negativna kontrola	< 0,500 OD _{450nm}
Kalibrator	S/Co > 1
Pozitivna kontrola	> 1000 OD _{450nm}

Izračunavanje *Cut off* vrednosti vrši se po sledećoj formuli:

$$\text{Cut off} = \text{Srednja vrednost negativne kontrole (NC OD}_{450\text{nm}}) + 0.350$$

Interpretacija rezultata predstavlja odnos očitane absorbance seruma OD_{450nm} i *Cut off* vrednosti (S/Co) i prikazana je u sledećoj tabeli:

S/Co	Interpetacija
< 0.9	Negativno
0.9 - 1.1	Sumnjivo
> 1.1	Pozitivno

Negativan rezultat znači da pacijent nije inficiran HEV virusom, a pozitivan da je inficiran i treba sprovesti odgovarajuću terapiju. Ukoliko se dobije sumnjiv rezultat, potrebno je za 1-2 nedelje ponovo uzorkovati krv pacijenta i ponoviti ispitivanje.

4.2.5. WESTERN BLOT

Western blot metoda (poznata i kao imunoblot metoda) je analitička metoda za utvrđivanje količine i prisustva specifičnih serumskih imunoglobulina prema virusnim proteinima u ispitujućem uzorku i predstavlja tzv. „zlatni standard“ za serološku dijagnostiku HEV infekcije. Svi uzorci seruma svinja i ljudi, kod kojih su očitane vrednosti absorbanci nakon višestrukog ponavljanja bile blizu *cut off* vrednosti u *in house* ELISA testu, ispitani su i Western blot metodom.

Princip testa:

Rekombinantni protein ORF2 HEV gt3 (koji je korišćen u *in house* ELISA testu) se prenosi i imobilise na nitroceluloznu membranu, a zatim se nanosi primarno antitelo (ispitujući serum). Ukoliko u serumu postoje antitela protiv HEV, protein ORF2 HEV gt3 na membrani i IgG antitela iz ispitujućeg seruma formiraće kompleks. Zatim se nanosi sekundarno antitelo (anti-svinjska ili anti-ljudska IgG antitela obeležena peroksidazom HRP) koje će se vezati za kompleks. Dodaje se solucija ECL, koja služi za vizualizaciju i reakcija se očitava.

Western blot metod se sastoji iz nekoliko koraka: SDS poliakrilamid gel elektroforeza, tranfer, bloking, detekcija (nanošenje primarnih i sekundarnih antitela) i vizualizacija (razvijanje boje).

SDS poliakrilamid gel elektroforeza

SDS poliakrilamid gel elektroforeza (SDS PAGE) izvođena je na aparaturi za elektroforezu *Bio-Rad Mini Protean* (po metodi: Laemmli, U.K. , 1970)

Reagensi:

- akrilamid/bis (30% T, 2,67% C)
- 1.5M Tris-HCL, pH 8.8
- 0.5M Tris-HCl, pH 6.8
- 10% amonijum persulfat
- 1% TEMED (N,N, N', N' - tetrametiletilendiamin)
- 10% SDS (sodium dodecyl sulphate)
- 4 x Pufer za pripremu uzoraka sa SDS-om, 10 ml:
 - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 0.625 ml
 - 50% Glicerol 4.00 ml
 - 10% SDS 2.00 ml
 - β-merkaptotanol 1.0 ml
 - 1% bromfenol plavo 0.05 mg
 - Destilovana H₂O 3.27 ml
- 5x Elektrodni pufer Tris/Glicin sa 1% SDS-om (Laemmli) pH 8.3, za 1 L
 - 15 g Tris
 - 72 g Glicin
 - 5g SDS
 - voda do 1L

Vrednost pH je oko 8,3 i ne treba je podešavati. Pre upotrebe se razblaži 1:5.

Priprema razdvajajućeg gela (10%):

- Destilovana voda 5.60 ml
- 1.5 M Tris-HCl, pH8.8 2.80 ml

- Akrilamid/bisakrilamid 2.80 ml
- SDS 4% 0.15 ml

Smeša se degasira na vakuum pumpi, a potom se doda:

- amonijum persulfat 56.6 μ l
- TEMED 5.6 μ l

Nakon laganog mešanja tečan gel se sipa između dve staklene ploče predviđene za formiranje gela i ostavi da se polimerizuje između 30minuta i 1 časa.

Priprema koncentrujućeg gela (4%):

- Destilovana voda 1.52 ml
- 0.5 M Tris-HCl, pH 8.8 0.62 ml
- Akrilamid/bisakrilamid 0.32 ml
- SDS 4% 0.15 ml

Smeša se degasira na vakuum pumpi, a potom se dodaje:

- amonijum persulfat 12.5 μ l
- TEMED 2.5 μ l

Nakon polimerizacije razdvajajućeg gela, preko njega se nanosi smeša tečnog koncentrujućeg gela u koji se uranja „češalj“ za formiranje mesta za nanošenje uzoraka. Smeša koncentrujućeg gela se ostavi na sobnoj temperaturi radi polimerizacije 30 minuta.

Priprema uzoraka (denaturacija proteina):

Uzorak za SDS elektroforezu (protein ORF2 HEV gt3) je pripreman prokuvavanjem u toku 5 minuta na 100 °C u puferu za uzorak (razblaženje 1:4). Na gelu ukupno ima 15 mesta za postavljanje uzoraka. Na 1. i 15. mestu, na oba kraja gela, postavljeno je pažljivo Paster pipetom po 6 μ l markera *Western Blot Protein Standard (Serva)*, a u ostalih 13 polja po 12 μ l HEV proteina (odnosno 3 μ l pufera za uzorke + 5 μ l originalnog uzorka ORF2 HEV proteina + 4 μ l vode) (Slika14). Elektroforeza se odvija pri konstantnom naponu električne energije od 30 mA oko 60 minuta.

Slika 14: Nanošenje uzoraka na SDS gel



Imunobloting:

Transfer proteina i imunodetekcija

Western blot je izvođen na elektroblotting aparaturi Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell prema metodi Towbin-u i saradnici (1979) na nitriceluloznoj membrani.

Materijal:

- Elektroblotting aparatura
- Strujni ispravljač
- Whatman 3M filter papir
- Nitrocelulozni papir (Hybond-Amersham)
- Male plastične posude za inkubaciju gela

Reagensi:

Pufer za transfer proteina pH 8.3:

- 25 mM Tris (3.025g)
- 192 mM glicin (14.4g)
- destilovana voda 800 ml
- metanol 200ml

Ponceau S (0.1% (w/v) Ponceau S u 5%(v/v) sirćetnoj kiselini)

10 x PBS (stock solucija)

PBS 1x + Tween 0,05 % (rastvor za ispiranje)

- 100 ml PBS 10x
- 900 ml destilovane vode
- 500 ml Tween 20

Mleko u prahu 5% + PBS 1x Tween 0,05 % (rastvor za blokiranje)

- 5 g mleko u prahu
- 100 ml PBS 1x + Tween 0,05 %
-

Mleko u prahu 1% + PBS 1x Tween 0,05 % (rastvor za pripremu antitela)

- 1 g mleko u prahu
- 100 ml PBS 1x + Tween 0,05 %

Pre pripreme „sendviča“ za transfer na nitroceluloznu membranu, sunđer i filter papiri su potopljeni u pufer za transfer 15-20 minuta. „Sendvič“ za transfer je pripremljen po sledećem redosledu: sunđer-filter papir-nitrocelulozna membrana-gel –filter papir-sunđer. Uklonjeni su svi mehurići vazduha između filter papira i gela, kao i između gela i membrane. Pri stavljanju „sendviča“ u nosač ćelije za transfer treba voditi računa o orijentaciji ANODA/sunđer- filter papir- nitrocelulozna membrana –gel- filter papir-sunđer/KATODA.

Transfer proteina ORF2 HEV gt3 sa gela na membranu je izvršen pri konstantnoj struji od 180 mA u toku 1h i 30 minuta, uz hlađenje. Membrana je zatim potopljena u boju Ponceau S i isečena na stripove (Slika 15).

Slika 15: Protein ORF2 HEV gt3 na membrani nakon transfera obojena sa Ponceau S



Stripovi su isprani rastvorom za ispiranje, potopljeni u rastvor za blokiranje i 1 sat inkubirani na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, stripovi su još jednom kratko ispirani i inkubirani sa primarnim antitelom preko noći na 4°C (primarna antitela su razređenja ispitujućih seruma ljudi ili svinja u odnosu 1:100 sa rastvorom za pripremu antitela uz obavezno postavljanje pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma). Posle inkubacije sa primarnim antitelom, potrebno je isprati stripove 2 puta po 15 minuta. Stripovi su zatim ponovo inkubirani 1 sat sa sekundarnim antitelima koja su konjugovana peroksidazom (razređenje 1: 30.000 za anti-svinjska antitela ili 1:10.000 za anti-ljudska antitela). Ponavlja se korak ispiranja 4 puta po 15 minuta. Posle ispiranja, stripovi su potopljeni 1 minut u ECL soluciju (substrat) uz konstantno mešanje. ECL solucija služi za vizualizaciju reakcije i chemiluminiscentnu detekciju.

Chemiluminiscentna detekcija

Materijal:

ECL solucija (A+B) (BioRad)

Solucija A

- luminol 250mM 1 ml
- cumarin 90mM 0.44 ml
- Tris-HCL 1M pH8.5 10 ml
- Destilovana voda do 100 ml

Solucija B

- H₂O₂ 30% 3.05 µl
- Tris-HCL 1M pH8.5 500 µl
- Destilovana voda do 10 mL

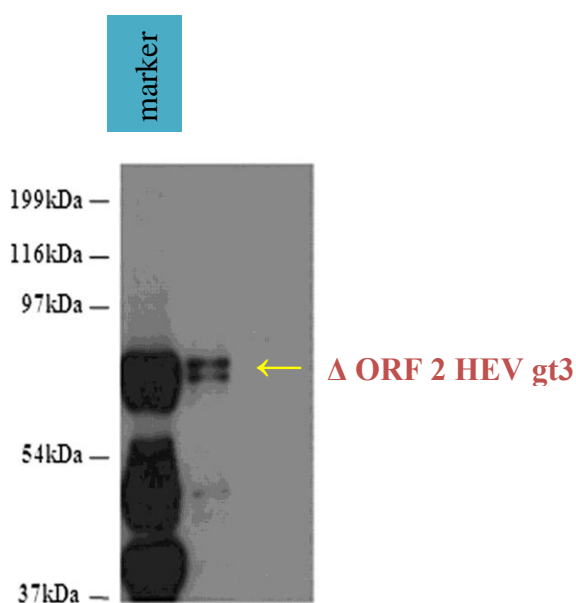
Rasvor A i rastvor B se pomešaju i čuvaju na 4°C najduže mesec dana.

Poboljšana hemiluminiscencija (ECL-enhanced chemiluminescent) je metoda koja omogućava detekciju proteina sa substratom koji luminiscira (svetli) u kontaktu sa sekundarnim antitelom. Stripovi se izvade iz rastvora luminola, postavljaju u čistu posudu i reakcija se očitava u aparatu za razvijanje filma (*BioRad image station*). Slikanje se vrši nekoliko puta (ekspozicija filma na 5 sekundi, 15 sekundi, 1 minut, 5 minuta).

Kompjuterski software odmah obrađuje podatke, pojačava intezitet boje i dobijaju se digitalne fotografije Western blot reakcije.

Pozitivan rezultat u Western blot analizi predstavlja pojava proteina na stripu sa molekulsom masom koja odgovara veličini od 65-68 kDa. Na Slici 16 je žutom strelicom obeležen rekombinantni protein Δ ORF 2 HEV gt3, koji ima molekulska masu od 65-68 kDa. Sa leve strane se nalaze obeležene molekulske mase različitih proteina markera (iz rada autora Nereida Yimenez de Oya, 2009).

Slika 16: Western blot analiza proteina Δ ORF 2 HEV gt3



4.2.6. REAL-TIME RT- PCR

Molekularna metoda One Step real-time RT-PCR (*Reverzna transkripcija polimeraza lančane reakcije u realnom vremenu*) je kvantitativna metoda koja služi za detekciju i određivanje količine HEV RNK u ispitujućem uzorku. Protokol ispitivanja je kreiran na osnovu podataka iz rada istraživača Jothikumar [i sar.](#) (2006.).

Pre izvođenja real-time RT-PCR reakcije potrebno je izvršiti obradu uzoraka i ekstrakciju RNK upotrebom TRIzol reagenta.

Obrada uzoraka:

Uzorke jetre, mesa, žuči i fecesa, koji su bili zamrznuti na -20°C , potrebno je ostaviti na sobnoj temperaturi da se odmrznu pre obrade.

Uzorci fecesa su pripremani tako da se dobije 10% razređenje u fiziološkom rastvoru. Količina od 250 mg uzorka je uzeta sterilnim štapićem i stavljena u sterilnu plastičnu epruvetu, a zatim je dodat fiziološki rastvor u količini od 2.25 ml. Dobijena suspenzija je u trajanju od 1 minut kratko vorteksovana, a zatim centrifugirana na 3000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Dobijeni supernatant je odliven i koristio se odmah za izolaciju nukleinske kiseline ili je zamrzavan na -70°C .

Obrada uzoraka tkiva jetre i mesa se vršila u sterilnim tarionicima, slobodnim od tragova RNK. Od svakakog organa je sterilnim makazama zasecan komadić veličine 1x1cm (oko 1gr) i sitno iseckan u tarioniku uz dodavanje kvarcnog peska. Tkivo je homogenizovano, a zatim je dodato 10 ml fiziološkog rastvora, da bi se dobilo krajnje razređenje od 1:10. Iz tarionika je sadržaj odliven u plastične sterilne epruvete i centrifugiran na 3000 obrtaja 15 minuta. Ovako dobijen supernatant je direktno korišćen za ekstrakciju RNK ili je zamrznut na -70°C .

Uzorci žuči su se za ekstrakciju koristili bez prethodne obrade.

Izolacija RNK upotrebom Trizola:

Reagensi:

- TRIzol® Reagent (U.S. Patent No. 5,346,994 *Invitrogen life technologies*);
- Chloroform (99%) for molecular biology;
- Isopropanol (99%) for molecular biology;
- 75% Ethanol (u DEPC tretiranoj vodi);
- DEPC (diethylpyrocarbonate) tretirana voda (potpuno čista od RNase enzima)

Postupak izvođenja izolacije:

Pre početka ekstrakcije RNK, potrebno je supernatante (jetra, feces i meso) i uzorke žuči izvaditi iz zamrzivača i ostaviti da se odmrznu na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori. Pre početka rada pravi se protokol za izolaciju RNK u koji se unosi redosled uzoraka i kontrola. Negativna kontrola je PCR čista voda, a za pozitivnu kontrolu se uzima suspenzija hepatitis E virusa čije se prisustvo utvrđuje u ispitivanim uzorcima. U odnosu na broj ispitujućih uzoraka uzimaju se PCR čiste mikrotube („ependorfice“) od 1,5 ml uz dodatak za jednu pozitivnu i jednu negativnu kontrolu. U mikrotubu se dodaje po

250µl uzorka. U istoj količini se postavlja i pozitivna i negativna kontrola. U svaku ependorficu se dodaje po 750 µl reagensa TRIzol i dobro promeša. Ispitujući uzorci i kontrole se inkubiraju sa TRIzol-om na sobnoj temperaturi 5-10 minuta. Zatim se u svaku ependorficu dodaje po 200µl hloroforma. Dobijenu suspenziju je potrebno promešati vortexom punom brzinom 15 sekundi, a zatim se inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Posle kratke inkubacije, potrebno je opet suspenziju centrifugirati na 14000 rpm u trajanju od 15 minuta na 4°C (centrifuga sa hlađenjem). Gornja vodena faza (koja sadrži RNK) se pažljivo odpipetira u nove ependorfice od 1,5 ml i u nju se dodaje 500µl izopropanola. Ova mešavina se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta, a zatim se centrifugira na 14000rpm u trajanju od 10 minuta na 4°C. Supernatant, koji se izdvojio, se pažljivo odbacuje odlivanjem, a RNK sa dna ependorfice se spere (resuspenduje) sa 500µl 75% etanola (-20°C). Suspenzija RNK i etanola se vorteksuje punom brzinom 15 sekundi i centrifugira na 10000 rpm 5 minuta na 4°C. Dobijeni supernatant se potpuno odbaci odlivanjem, a na dnu ostaje pelet (ektrahovana i prečišćena RNK). Ependorfica sa peletom se osuši okretanjem na papirnu vatu u trajanju od 15 do 30 minuta. Osušena RNK se resuspenduje vodom (RNAza sklobodnom vodom). Volumen vode je potrebno prilagoditi količini RNK (najčešće sa 40µl). Ovako dobijena RNK se mora što pre zamrznuti do upotrebe u real-time RT-PCR reakciji.

Detekcija HEV

Za izvođenje reakcije potrebni su real-time PCR aparat (*Applied Biosystem*), reagensi, oligonukleotidi i kontrole. Standardne krive koje se koriste u qPCR reakciji su kreirane na osnovu serijskih razređenja poznate količine RNK interne ampifikacione kontrole (IACs). Za garanciju kvaliteta testa su potrebne različite kontrole: NTC (non template control - kontrola bez uzorka), IAC kontrola, pozitivna i negativna HEV kontrola.

Reagensi:

- RNA UltraSense One-step Quantitative RT-PCR System (*Invitrogen*):
 - RNA UltraSense Enzyme Mix
 - RNA UltraSense 5x Reaction Mix.
 - 20x Bovine Serum Albumin (BSA)
 - 50-mM Magnesium Sulfate (Mg SO₄)
 - ROX Reference Dye
- Tris-EDTA pH 8 (*Applied biosystems*)

- Nuclease-free water (*Qiagen*)

Oligonukleotidi:

- Forward primer: HEV-F (5'- GGT GGT TTC TGG GGT GAC -3')
- Reverse primer: HEV-R (5'- AGG GGT TGG TTG GAT GAA -3')
- HEV Proba (Taqman probe): HEV-P (5'-FAM- TGA TTC TCA GCC CTT CGC –BGQ1-3')
- IAC MGB TaqMan proba: IACP (5'-VIC- CCA TAC ACA TAG GTC AGG –MGB- NFQ- 3')

Postupak izvođenja ispitivanja:

Pre pripreme reagenasa potrebno je izvaditi uzorke (ekstrahovane RNK) iz zamrzivača na -70°C i ostaviti u laminarnoj komori, u hladnom nosaču da se otope. U tabelama A i B su prikazane potrebni reagensi i priprema PCR mix-a.

Tabela A: Prajmeri i probe koje su potrebne za pripremu mixa

Tabela 1: Radna razređenja prajmera i proba				
	Stock volumen	H ₂ O	Krajnje razređenje*	Molaritet
Primer HEV-F	25µl	475 µl	500µl	5µM
Primer HEV-R	25µl	475 µl	500µl	5µM
Primer HEV-P	10µl	490 µl	500µl	2µM
Proba IAC	5µl	495 µl	500µl	2µM

*Krajnje razređenje se alikvotira u endorfice od po 50 µl i čuva na -20°C

TabelaB: Reagensi od kojih se priprema PCR mix

Tabela 2: QRT-PCR mix (za jednu reakciju)			
Reagensi	Radna koncentracija	Krajnja koncentracija	Volumen (µl)
RNA Ultrasense reaction mix	5x	1x	4.00
Primer HEV-F	5µl	250 nM	1.00
Primer HEV-R	5µl	250 nM	1.00
Primer HEV-P	2	100 nM	1.00
Proba IAC	1	50 nM	1.00
ROX reference dye	50x	1x	0.40
RNA Ultrasense enzyme mix			1.00
IAC		*	0.60
PCR čista voda			5.00
Ukupni volumen mixa			15
Uzorak			5
Krajnji volumen			20

*Priprema IAC probe se vrši po posebnom uputstvu

Slika 17: Priprema PCR Mix-a



U zasebnoj prostoriji (tzv. čista soba) se pripremaju razređenja hemikalija za PCR Mix (Slika 17). Sve reagense je potrebno pre rada izvaditi iz zamrzivača i staviti u hladni nosač da se odmrznu. Kada se hemikalije zagreju, sadržaj svake ependorfice se kratko centrifugira (*spinuje*) na 3000 rpm 30 sekundi, da bi se homogenizovao sadržaj. Uzima se čista ependorfica, postavlja se u hladni nosač i dodaju se svi navedeni reagensi iz tabele 2 (u zavisnosti od broja ispitujućih uzoraka). Pripremljeni Mix se kratko homogenizuje vortex-om i centrifugira (*spinuje*) na 3000 rpm 30 sekundi. Zatim se u svako polje PCR mikrotitar ploče sa 96 polja (96-well optical reaction plate- *Applied Biosystems*) nanosi po 15 μ l Mix-a po šemi. Ploča se poklopi i prenosi iz čiste sobe u tzv. prljavi deo (gde se vrši ekstrakcija RNK), i u laminarnoj komori nanosi po 5 μ l uzoraka na pozicije sa šeme. Na sva navedena polja za kontrole (IAC, NTC, HEV pozitivna kontrola i HEV negativna kontrola) postavlja se po 5 μ l kontrola. Ploča se zalepi sa adhezivnim pokrivačem i stavlja u real-time PCR aparat za izvođenje reakcije. Prethodno je potrebno podesiti temperaturne cikluse na sledeći način:

Redosled reakcija:	Temperature i vreme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	50°C, 15 minuta	1
Prezagrevanje	95 °C, 2 minuta	1
Denaturacija	95 °C, 15 sekundi	
Amplifikacija	55°C, 20 sekundi	50
Ekstenzija	72°C, 35 sekundi	

Kada se reakcija završi, svi rezultati očitavanja kalibracionih kriva se pamte u računaru.

Interpretacija rezultata:

Rezultat real-time RT-PCR se tumači na osnovu pojave eksponencijalne krive što znači da je došlo do umnožavanja PCR produkta u svakom ciklusu. Što je više PCR produkta u uzorku koji se analizira, raste i eksponencijalna kriva koja predstavlja vidljiv dokaz da u uzorku postoji produkt. Eksponencijalna kriva pozitivnog uzorka je slična eksponencijalnoj krivi pozitivne kontrole i IAC kontrole. U negativnom uzorku i kontroli bez uzorka (non-template control) nema PCR produkta, odnosno nema vidljive reakcije niti rasta eksponencijalne krive.

4.2.7 PATOHISTOLOŠKO I IMUNOHISTOHEMIJSKO ISPITIVANJE

Patohistološko ispitivanje:

Za patohistološko i imunohistohemijsko ispitivanje su ispitani uzorci jetre prasadi na osnovu pozitivnih RT-PCR rezultata u uzorcima jetre, žuči i mesa prasadi. Uzorci jetre veličine 2x1x0,5cm su fiksirani u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48 - 72 časa. Posle fiksacije tkivo je obrađivano u automatskom tkivnom procesoru (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski iseći debljine 3 do 5µm sečeni su na mikrotomu i bojani hematoksilin-eozin (HE) bojom.

Imunohistohemijsko ispitivanje:

Imunohistohemijsko ispitivanje je izvedeno po metodologiji streptavidin-avidin metode opisanoj u radu Ha i Chae (2004), sa modifikacijama koje se odnose na korišćenje komercijalnog kita za detekciju i vizualizaciju reakcije.

Materijal:

1. Predmetne pločice: *Superfrost ultra plus (Thermo Scientific)*.
2. Primarno antitelo: *Rabbit polyclonal anti-HEV antibody ab 1036 (Abcam)*
3. Proteinaza K: *Proteinase K V302b (Promega)*
4. Kit za detekciju: *Novolink Polymer detection system RE7150-K (Leika)*
 - Peroxidase block
 - Protein block

- Post Primary secondary antibodies
 - Dab chromogen
 - Novolink DAB Substrate Buffer
 - Hematoxylin
5. Rastvor za ispiranje: TBS (100 ml Tris HCl (Ph=7,5) + 900 ml fiziološki rastvor)
 6. Diluent za razređenje antitela: *IHC Diluent (Leica, UK)*

Parafinski isečci debljine 3-5 μ m su montirani na pozitivno elektrisane predmetne pločice tipa „*Superfrost*“. Dehidratacija tkivnih oisečaka vršena je potapanjem isečaka u serijska razređenja alkohola: dva puta u ksilol, dva puta u apsolutni alkohol i dva puta u 96% alkohol. Svako ispiranje u alkoholu je trajalo po 5 minuta. Na kraju su isečci isprani u destilovanoj vodi. Demaskiranje HEV antigena postignuto je proteinazom K (20 μ l Proteinaze K + 1 ml TBS) u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Posle 15 minuta izvršeno je ispiranje sa destilovanom vodom i TBS. Endogena peroksidaza blokirana je u 3% H₂O₂ (*Peroxidase block* iz kita) na sobnoj temperaturi (18-22°C) u trajanju od 15 minuta. Isečci su isprani ponovo sa destilovanom vodom i TBS i prosušeni na papirnoj vati. Pripremljeno je primarno razređenje antitela u odnosu 1:50 sa diluentom *IHC Diluent*. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelom 1 sat na sobnoj temperaturi (Slika 18).

Slika 18: Inkubacija preparata sa primarnim antitelom



Posle sat vremena preparati su ponovo isprani TBS-om i blago prosušeni na papirnoj vati. Zatim je izvršena inkubacija sa sekundarnim antitelom *Post Primary* (iz kita za detekciju) u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Ponavlja se ispiranje sa TBS i nanosi se *Polymer* (iz kita za detekciju) i inkubira još 20 minuta na sobnoj temperaturi.

Reakcija postaje vidljiva nanošenjem diaminobenzidina DAB (DAB se pravi od 1 ml substrata i 50 µl DAB hromogena iz kita), a inkubacija traje 15 minuta. Zatim se vrši višekratno ispiranje isečaka, najpre destilovanom, a zatim običnom vodom. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u hematoksilinu (Hematoxylin boja iz kita) u trajanju od 1 minut. Uzorci su izvađeni iz hematoksilina i rehidrirani u serijskim razređenjima alkohola i u vodi (destilovana voda, 96% alkohol, apsolutni alkohol, ksilol). Posle ispiranja isečci su montirani pomoću medijuma za montiranje DPX (veštačka smola) i posmatrani pod mikroskopom. Ukoliko se formirao antigen-antitelo kompleks, na mestu pozitivne reakcije javiće se precipitat smeđe boje. Kao negativna kontrola korišćena su 4 tkivna isečka HEV RNK negativnih jetri.

4.2.8 UTVRĐIVANJE POSTOJANJA EPIDEMIOLOŠKE POVEZANOSTI IZMEĐU INFEKCIJA KOD SVINJA I LJUDI I NALAZ HEV RNK U UZORCIMA NA KLANICAMA

Da bi se ustanovila potencijalna epidemiološka povezanost između infekcija kod ljudi i životinja, izvršeno je poređenje prisustva pozitivnog HEV serološkog nalaza kod dobrovoljnih davalaca krvi, koji u svom domaćinstvu uzgajaju domaće životinje i vrste životinja sa kojima dolaze u kontakt, pre svega svinje, koje predstavljaju značajne rezervoare hepatitis E virusa.

Utvrdjivanje mogućnosti inficiranja ljudi mesom i jetrama svinja izvršeno je na osnovu ispitivanja i dokaza prisustva HEV genoma u uzorcima na liniji klanja. Meso i jetra svinja, a posebno prasadi, se često konzumiraju, a da je njihova termička obrada slabo sprovedena. Na taj način ove namirnice mogu da predstavljaju potencijalnu opasnost za infekciju ljudi.

4.2.9 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Obrada podataka vršena je statističkim programom *Statistika 10*. Za statističku analizu seroprevalencije među kategorijama svinja na oglednim farmama, kao i prosečnih ukupnih vrednosti nivoa antitela korišćen je hi-kvadrat test-*Piersonov test*. Statistički

značajna razlika je prikazana kao p-vrednost. Ukoliko je izračunata p-vrednost bila manja od 0.05 ($p < 0.05$), ustanovljena je statistički značajna razlika, odnosno statistički visoko značajna razlika ukoliko je $p < 0.001$. U slučajevima kada je p-vrednost bila veća od $p > 0.05$ statistički značajna razlika među poređenim vrednostima nije ustanovljena.

Ispitivanje specifičnosti i osetljivosti poređenih metoda (*in house* i komercijalna ELISA) analizirano je *kappa*-metodom. Ova metoda je pogodna za obradu podataka kada se dobijaju rezultati „pozitivno – negativno“, umesto kvantitativnih vrednosti.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

Dobijeni rezultati ispitivanja su radi bolje preglednosti i tumačenja podjeljeni u nekoliko celina, po redosledu kako je navedeno u ciljevima istraživanja.

5.1 Rezultati ispitivanja prisustva HEV RNK u fecesu svinja

Da bi odabrali farme na kojima će se vršiti ispitivanja HEV seroprevalencije, izabrano je 6 farmi na kojima je ispitano prisustvo HEV RNK u fecesu svinja u industrijskom načinom uzgoja, na teritoriji Južne Bačke i Srema. Uzorci fecesa pregledani su one step real-time RT-PCR metodom. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati ispitivanja prisustva HEV RNK u fecesu svinja na farmama

Farma	Proizvodna kategorija	real-time RT-PCR	Farma	Proizvodna kategorija	real-time RT-PCR
1	Odgoj (65 dana)	-	4	Odgoj (70 dana)	+
	Predtov (95dana)	+		Predtov (90 dana)	+
	Tov (110 dana)	+		Tov (110 dana)	+
	Tov (120 dana)	+		Tov (120 dana)	+
	Tov (125 dana)	-		Tov (130 dana)	+
2	Odoj (66 dana)	+	5	Odgoj (65 dana)	+
	Predtov (75 dana)	-		Odgoj (80 dana)	+
	Tov (92 dana)	+		Predtov (100 dana)	+
	Tov (92 dana)	+		Predtov (100 dana)	+
	Tov (125 dana)	+		Tov (120 dana)	-
3	Odgoj (70 dana)	+	6	Odgoj (65 dana)	-
	Predtov (90 dana)	+		Predtov (74 dana)	-
	Predtov (95 dana)	+		Predtov (88 dana)	+
	Tov (110 dana)	+		Tov (110 dana)	-
	Tov (120 dana)	+		Tov (120 dana)	-

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je hepatitis E infekcija prisutna na svim pregledanim farmama. Na farmi 1, HEV RNK je dokazana kod svinja u kategoriji predtova i kod tovljenika uzrasta 110 i 120 dana, a na farmi 2 u fecesu prasadi u odgoju i kod tovljenika. Na farmi 3 i 4 kod svih proizvodnih kategorija je utvrđeno prisustvo HEV RNK. Pregledom fecesa na farmi 5, HEV je detektovan u kategorijama

odgoja i predtova, dok je na farmi 6 virusni genom dokazan samo kod starijih svinja u predtovu, uzrasta od 88 dana.

U tabeli 2 je dat prikaz prisustva HEV RNK u fecesima svinja u odnosu na ukupan broj ispitanih uzoraka po farmi (u procentima).

Tabela 2: Ukupan procenat HEV RNK pozitivnih uzoraka fecesa na farmama

Farma	HEV RNK pozitivno (%)	HEV RNK negativno (%)
1	60%	40%
2	80%	20%
3	100%	0%
4	100%	0%
5	80%	20%
6	20%	80%

Procenat HEV pozitivnih uzoraka fecesa na farmama je varirao u rasponu od 20% (farma 6) do 100% (farme 3 i 4).

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja za dalja ispitivanja odabrane su 3 farme (farme 2, 4 i 6). Kriterijumi za odabir farmi su bili različiti procenti utvrđenog prisustva HEV RNK u fecesu: 20% na farmi 6, 80% na farmi 2 i 100% na farmi 4. Na ovim farmama su je vršeno uzorkovanje krvi svinja i izvršene serološke analize prisustva specifičnih antitela protiv HEV, kao i dalje praćenje i uzorkovanje organa i fecesa na klanicama. U daljem tekstu farme ćemo označavati slovima abecede: farma 6 imaće oznaku farma A, farma 2 je farma B, a farma 4 je farma C.

5.2 Rezultati seroloških ispitivanja krvnih seruma svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV

5.2.1 Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma svinja in house ELISA testom

Radi utvrđivanja prisustva specifičnih IgG antitela protiv hepatitis E virusa u krvnim serumima svinja na farmama A, B i C, vršeno je serološko ispitivanje *in house* ELISA testom. Ukupno je pregledano 300 seruma svinja sa sve tri ogledne farme. Svi serumi, čije su ekstinkcije u ELISA testu bile blizu cut off vrednosti, dodatno su testirani Western blot metodom (rezultati ispitivanja Western blot metodom prikazani su na strani 95). Rezultati istraživanja su prikazani pojedinačno, po farmama.

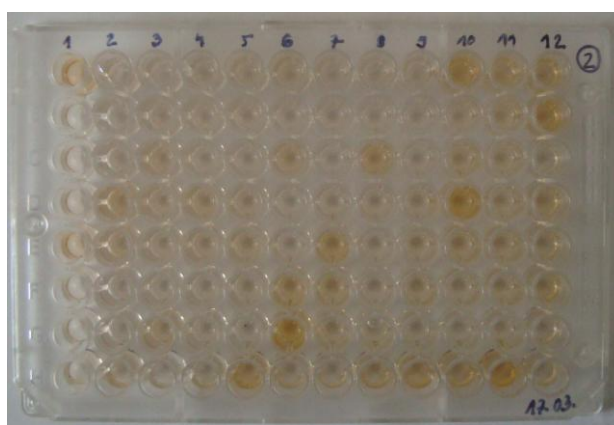
Ustanovljene vrednosti HEV seroprevalencije kod svinja sa farme A prikazane su u tabeli 3.

Tabela 3: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV *in house* ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi A

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	5/20 (25%)	15/20 (75%)	0.01067
Predtov	2 /20 (10%)	18/20 (90%)	
Nazimice	12 /20 (60%)	8/20 (40%)	
Krmače	9/20 (45%)	11/20 (55%)	
Tovljenici	9/20 (45%)	11/20 (55%)	
Ukupno:	37/100 (37%)	63/100 (63%)	

Od ukuno pregledanih 100 uzoraka krvnih seruma svinja, kod 37 (37%) životinja je ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela, dok su 63 (63%) životinje bile seronegativne. Najniža seroprevalencija zabeležena je kod svinja u predtovu (2/20, 10%), a najviša kod nazimica (12/20, 60%). Anti-HEV antitela dokazana su kod 25% (5/20) svinja u odgoju i kod 45% (9/20) životinja u kategorijama krmača i tovljenika. Ustanovljena je statistički značajna razlika poređenjem rezultata HEV serološki pozitivnih uzoraka seruma među kategorijama svinja na farmi A ($p=0.01067$).

Slika 19: *In house* ELISA test



Na farmi B je kod 31 (31%) životinje detektovano prisustvo antitela protiv HEV, dok kod 69 (69%) životinja nije ustanovljeno prisustvo ovih antitela. Procenat seropozitivnosti je varirao od 0% (0/20) u kategoriji odgoja do 55% (55/100) u kategoriji nazimica i tovljenika. Kod svinja u predtovu utvrđeno je 25% (5/20) seropozitivnih životinja, a kod krmača 20% (4/20). Izračunata p-vrednost je iznosila 0.00029, što znači da

je ustanovljena visoko statistički značajna razlika poređenjem rezultata seroprevalencije među kategorijama svinja na farmi B. U tabeli 4 dat je prikaz rezultata ispitivnja prisustva anti-HEV antitela kod svinja na farmi B.

Tabela 4: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV *in house* ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi B

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	0 /20(0%)	20/20 (100%)	0.00029
Predtov	5/20 (25%)	15/20 (75%)	
Nazimice	11/20 (55%)	9/20 (45%)	
Krmače	4 /20 (20%)	16/20 (80%)	
Tovljenici	11/20 (55%)	9/20 (45%)	
Ukupno:	31/100 (31%)	69/100 (69%)	

Analizom podataka prisustva HEV infekcije na farmi C, uočava se da je stepen zaraženosti na ovoj farmi bio znatno viši u odnosu na prethodne dve farme. Prisustvo specifičnih antitela dokazano je kod 54 (54%) svinje, a 46 (46%) jedinki je bilo seronegativno. Kod 85% (17/20) tovljenika ustanovljen je pozitivan serološki nalaz, a zatim slede svinje u predtovu sa 80% (16/20) i prasad u odgoju sa 75% (15/20) HEV pozitivnih životinja. Samo u kategorijama nazimica i krmača je detektovana niža seroprevalencija koja je iznosila 15% (3/20). Izračunata je visoko statistički značajna razlika poređenjem broja seropozitivnih životinja među kategorijama svinja ($p=0.0000$). Rezultati ispitivanja na farmi C prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV *in house* ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi C

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	15/20 (75%)	5/20 (15%)	0.0000
Predtov	16/20 (80%)	4/20 (20%)	
Nazimice	3/20 (15%)	17/20 (85%)	
Krmače	3/20 (15%)	17/20 (75%)	
Tovljenici	17/20 (85%)	3/20 (15%)	
Ukupno:	54/100 (54%)	46/100 (44%)	

Osim pojedinačnog prikaza seroprevalencije na farmama, izvršena je i uporedna analiza seroloških ispitivanja po kategorijama svinja na farmama A, B i C i statistička obrada podataka. Rezultati su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV *in house* ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmama A, B i C

Kategorija	Farma A pozitivno/testirano (%)	Farma B pozitivno/testirano (%)	Farma C pozitivno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	5/20 (25%)	0/20 (0%)	15/20 (75%)	0.0000
Predtov	2/20 (10%)	5/20 (25%)	16/20 (80%)	0.0000
Nazimice	12/20 (60%)	11/20 (55%)	3/20 (15%)	0.074908
Krmače	9/20 (45%)	4/20 (20%)	3/20 (15%)	0.07122
Tovljenici	9/20 (45%)	11/20 (55%)	17/20 (85%)	0.02557
UKUPNO:	37/100 (37%)	31/100 (31%)	54/100 (54%)	0.00274

Najviša seroprevalencija je zabeležena na farmi C (54%), zatim sledi farma A (37%), a najmanje seropozitivnih životinja je bilo na farmi B (31%). Izračunata je statistički značajna razlika u odnosu na broj seropozitivnih životinja na sve tri ispitujuće farme ($p=0.00274$).

Najveći broj seropozitivnih prasadi u odgoju ustanovljen je na farmi C i iznosio je 75% (15/20), zatim sledi farma A sa 25% (5/20), dok na farmi B ni kod jednog praseta nije ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela. Poređenjem HEV seroprevalencije u kategoriji odgoja na sve tri farme ustanovljena je visoko statistički značajna razlika ($p=0.0000$).

Analize rezultata anti-HEV antitela kod svinja u predtovu pokazale su da je 80% (16/20) životinja na farmi C bilo serološki pozitivno, na farmi B je taj procenat iznosio 25% (5/20), a na farmi A je kod samo 10% (2/20) životinja detektovano prisustvo specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa. Ustanovljena je statistički visoko značajna razlika ($p=0.0000$) poređenjem seropozitivnih svinja u kategoriji predtova na sve tri farme.

Najviše serološki pozitivnih nazimica, 60% (12/20), zabeleženo je na farmi A, na farmi B 55% (11/20), a na farmi C 15% (3/20) nazimica je bilo HEV pozitivno. Izračunata p-vrednost je iznosila 0.074908 i nije ustanovljena statistički značajna razlika među seroprevalencijom kod nazimica na sve tri farme.

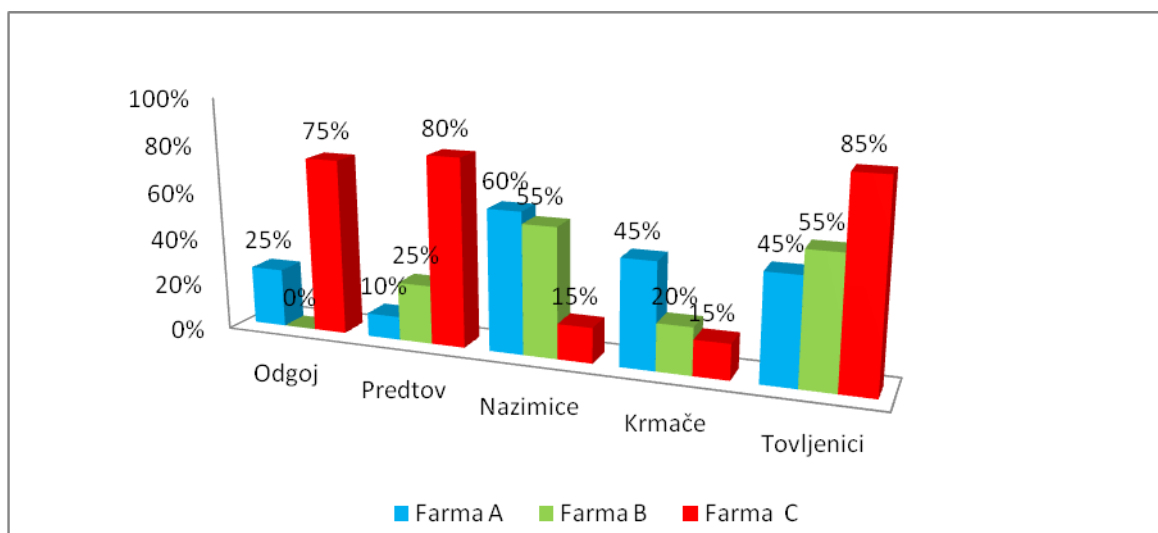
U kategoriji krmača, na farmi A je kod 45% (9/20) životinja ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela, na farmi B 20% (4/20) i na farmi C 15% (3/20) seropozitivnih krmača.

Međutim, statističkom analizom dobijenih rezultata prisustva specifičnih antitela protiv HEV u grupi krmača nije ustanovljena značajna razlika ($p=0,07122$).

U grupi tovljenika HEV infekcija prisutna je u značajnom procentu na svim oglednim farmama. Na farmi C je kod 85% (17/20) tovljenika zabeleženo prisustvo anti-HEV antitela, na farmi B kod 55% (11/20), odnosno kod 45% (9/20) tovljenika na farmi A. Variranja u broju seropozitivnih životinja u kategoriji tovljenika su velika, pa je ustanovljena statistički značajna razlika ($p=0,02557$).

Radi boljeg prikaza, na Grafikonu 1 je data analiza uporednog ispitivanja prisustva anti-HEV antitela na sve tri ispitujuće farme.

Grafikon 1: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV virusa u krvnim serumima svinja in-house ELISA testom na farmama A, B i C



Prikaz seroprevalencije u zbirnim uzorcima krvnih seruma po proizvodnim kategorijama, na sve 3 farme, dat je u tabeli 7. Od ukupno pregledanih 300 uzoraka seruma, kod 122 (40,66%) svinje je utvrđeno prisustvo anti-HEV antitela, dok je 178 (59,34%) životinja bilo seronegativno. Kod 33,33% (20/60) prasadi je ustanovljen pozitivan serološki nalaz. Nivo antitela raste sa starošću, tako da je u kategoriji svinja u predtovu kod 38,33% (23/60) jedinki zabeleženo prisustvo anti-HEV antitela, a u kategoriji nazimica je ustanovljeno 43,33% (26/60) seropozitivnih životinja. Zatim je zabeležen pad nivoa antitela i najniža seroprevalencija je detektovana u kategoriji krmača, 26,66% (16/60). Najviši nivo seroprevalencije zabeležen je kod tovljenika, gde je 61,66% (31/60) životinja bilo seropozitivno. Ustanovljena je statistički značajna razlika poređenjem

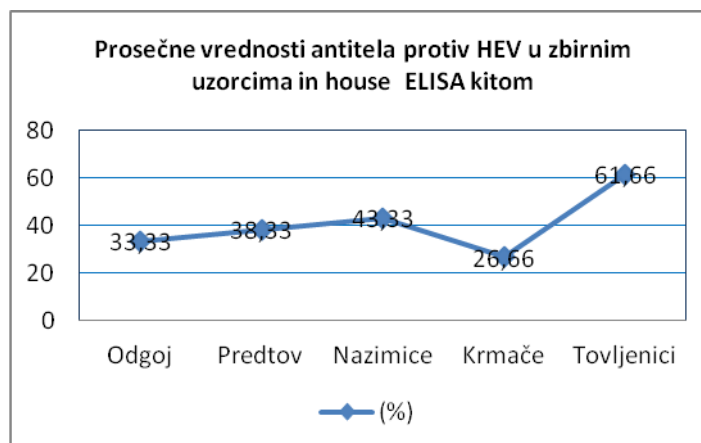
seroprevalencije u uzorcima seruma svinja po kategorijama na svim ispitujućim farmama (p=0.00155).

Tabela 7: Pregled prosečnih vrednosti prisustva antitela protiv HEV *in house* ELISA testom u ukupnom broju uzoraka krvnih seruma svinja na farmama A, B i C

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	20/60(33,33%)	40/60 (66,66%)	0.00155
Predtov	23/60 (38,33%)	37/60 (61,66%)	
Nazimice	26/60 (43,33%)	34/60 (56,67%)	
Krmače	16/60 (26,66%)	44/60 (73,33%)	
Tovljenici	37/60 (61,66%)	23/60 (38,33%)	
Ukupno:	122/300 (40,66%)	178/300 (59,34%)	

Grafički prikaz kretanja prosečnih vrednosti nivoa antitela u ukupnom broju uzoraka krvi svinja po kategorijama na sve tri farme dat je u grafikonu 2.

Grafikon 2: Prosečne vrednosti nivoa antitela po kategorijama svinja na farmama A, B i C (*in house* ELISA test)



5.2.2 Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma svinja komercijalnim ELISA testom

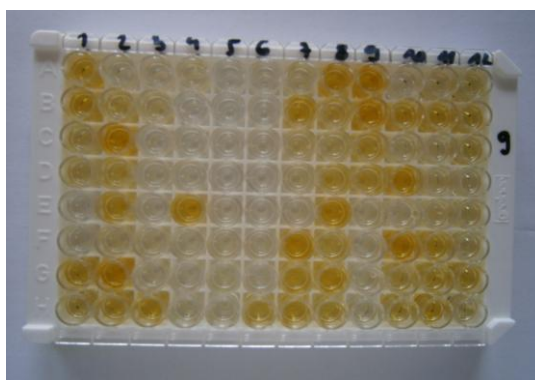
Svi uzorci krvi svinja (300 uzoraka) sa farmi A, B i C testirani su na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom. Rezultati ispitivanja su prikazani tabelarno i grafički.

Tabela 8: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi A

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	4/20 (20%)	16/20 (80%)	P=0.00565
Predtov	3/20 (15%)	17/20 (85%)	
Nazimice	12/20 (60%)	8/20 (40%)	
Krmače	11/20 (55%)	9/20 (45%)	
Tovljenici	10/20 (50%)	10/20 (50%)	
Ukupno:	40/100 (40%)	60/100 (60%)	

Rezultati ispitivanja na farmi A prikazani su u tabeli 8. Na osnovu iznetih podataka uočava se da su kod 40% (40/100) svinja detektovana specifična antitela protiv HEV, dok je 60% (60/100) životinja bilo seronegativno. Najmanje seropozitivnih životinja, 15% (3/20) zabeleženo je u kategoriji svinja u predtovu, a najviše, 60% (12/20) u kategoriji nazimica. Pozitivan serološki nalaz je ustanovljen kod 20% (4/20) prasadi u odgoju, 50% (10/20) tovljenika i 55% (11/20) krmača. Analizom rezultata seroprevalencije na ovoj farmi ustanovljena je statistički značajna razlika poređenjem svih kategorija životinja ($p=0.00565$).

Slika 20: Komercijalni ELISA test



Na farmi B anti-HEV antitela su detektovana kod 41% (41/100) svinja, a negativan serološki nalaz je potvrđen kod 59% (59/100) životinja. Sva prasadi u odgoju su bila seronegativna (20/100, 100%). Najmanje seropozitivnih životinja, 25% (5/20) ustanovljeno je u kategoriji krmača, a najviše u kategoriji tovljenika, 80% (16/20). Kod svinja u predtovu, prisustvo specifičnih antitela je dokazano u serumima 35% (7/20) ispitanih životinja, a kod nazimica je 65% (13/20) jedinki bilo serološki pozitivno. Izračunata je

visoko statistički značajna razlika u seroprevalencije među svim poređenim kategorijama svinja ($p=0.00000$). Rezultati ispitivanja na farmi B prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi B

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p- vrednost
Odgoj	0/20 (0%)	20/20 (100%)	P=0.0000
Predtov	7/20 (35%)	13/20 (65%)	
Nazimice	13/20 (65%)	7/20 (35%)	
Krmače	5/20 (25%)	15/20 (75%)	
Tovljenici	16/20 (80%)	4/20 (20%)	
Ukupno:	41/100 (41%)	59/100 (59%)	

Rezultati ispitivanja prisustva anti-HEV antitela na farmi C dati su u tabeli 10.

Tabela 10: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmi C

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p- vrednost
Odgoj	17/20 (85%)	3/20 (15%)	P=0.0000
Predtov	20/20 (100%)	0 /20 (0%)	
Nazimice	4/20 (20%)	16/20 (80%)	
Krmače	6/20 (30%)	14/20 (70%)	
Tovljenici	18/20 (90%)	2/20 (10%)	
Ukupno:	65/100 (65%)	35/100 (35%)	

Na farmi C je kod 65% (65/100) ispitanih svinja ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa, dok je 35% (35/100) životinja bilo seronegativno. Sve svinje u predtovu su bile seropozitivne (20/100, 100%). Anti-HEV antitela su detektovana kod 90% (18/20) tovljenika i 85% (17/20) prasadi u odgoju. Najmanje seropozitivnih životinja zabeleženo je u kategoriji nazimica (20%, 4/20) i krmača (30%, 6/20). Na osnovu iznetih rezultata izračunata je visoko statistički značajna razlika u seroprevalenciji među kategorijama životinja ($p=0.0000$).

Poređenje rezultata seroloških ispitivanja prisustva HEV infekcije u krvnim serumima svinja komercijalnim ELISA testom na sve tri ogledne farme, kao i izračunata p-vrednost prikazani su u Tabeli 11.

Tabela 11: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima svinja na farmama A, B i C

Kategorija	Farma A pozitivno/testirano (%)	Farma B pozitivno/testirano (%)	Farma C pozitivno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	4/20 (20%)	0/20 (0%)	17/20 (85%)	0.00000
Predtov	3/20 (15%)	7/20 (35%)	20/20 (100%)	0.00000
Nazimice	12/20 (60%)	13/20 (65%)	4/20 (20%)	0.00766
Krmače	11/20 (55%)	5/20 (25%)	6/20 (30%)	0.10808
Tovljenici	10/20 (50%)	16/20 (80%)	18/20 (90%)	0.01189
UKUPNO:	40/100 (40%)	41/100 (41%)	65/100 (65%)	0.00033

Najviše seropozitivnih jedinki zabeleženo je na farmi C, 65% (65/100), zatim sledi farma B sa 41 % (41/100) i farma A sa 40% (40/100). Na sve tri farme ustanovljena su značajna variranja među životinja sa serološki pozitivnim nalazom ($p=0.00033$).

Posmatrajući kategoriju prasadi u odgoju, zapaža se da je najviše HEV pozitivnih prasadi, 85% (17/20) bilo na farmi C, zatim sledi farma A sa 20% (4/20), dok na farmi B nije ustanovljena nijedna seropozitivna životinja (0%, 0/20).

Kod svinja u predtovu na farmi C su sve svinje bile serološki pozitivne (100%, 20/20), dok je na farmi B i A broj pozitivnih životinja u predtovu iznosio 35% (7/20), odnosno 15% (3/20). Kod prasadi u odgoju i u predtovu ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u variranju broja seropozitivnih životinja, a izračunata p-vrednost je iznosila $p=0.00000$.

Prisustvo specifičnih antitela protiv HEV na farmama A i B detektovano je kod 65% (13/20), odnosno 60% (12/20) ispitanih nazimica, a najmanje seropozitivnih nazimica zabeleženo je na farmi C (20%, 4/20). Ustanovljena je statistički značajna razlika u odnosu broj serološki pozitivnih jedinki u kategoriji nazimica na sve tri farme ($p=0.00766$).

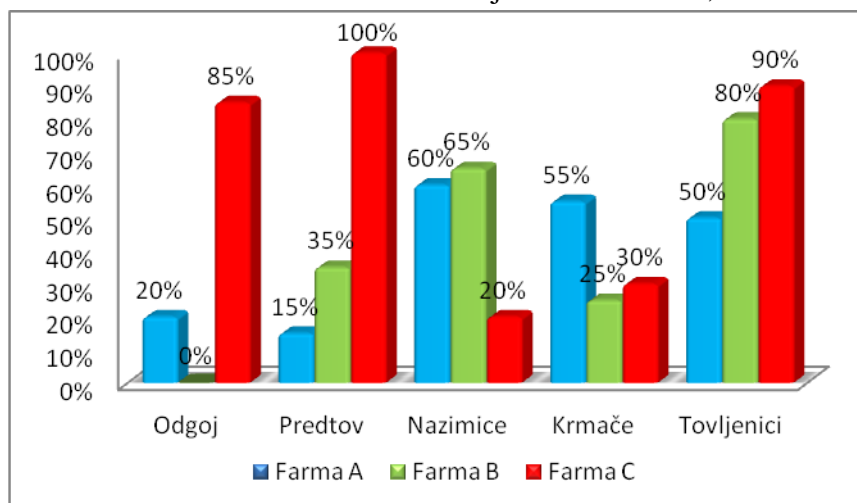
Pozitivan serološki nalaz zabeležen je kod 55% (11/20) krmača na farmi A, zatim slede farma C sa 30% (6/20), odnosno farma B sa 25% (5/20) krmača. Izračunata p-

vrednost iznosila je $p=0,10808$, odnosno nije bilo značajnih odstupanja u seroprevalenciji među ispitanim kategorijama životinjama.

U kategoriji tovljenika utvrđena je visoka seroprevalencija od 90% (18/20) kod tovljenika na farmi C, nešto niža, 80% (16/20) na farmi B, a najniža seroprevalencija od 50% (10/20) zabeležena je na farmi A. Obračunata p-vrednost je iznosila $p=0.01189$, što zanči da nije bilo značajnih variranja u poređenju seroprevalencije unutar ove kategorije svinja.

Prikaz rezultata ispitivanja i poređenja seroprevalencije na sve tri ogledene farme dat je i grafički (Grafikon 3).

Grafikon 3: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u serumima svinja na farmama A, B i C



U tabeli 12 prikazani su rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa po proizvodnim kategorijama svinja, zbirno, na sve tri ogledne farme. Od ukupno 300 pregledanih seruma svinja, kod 146 (48,66%) svinja je ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela, dok je 154 (51,34%) svinja bilo seronegativno. Najmanje seropozitivnih životinja je detektovano u kategoriji prasadi u odgoju, 35% (21/60). Nivo antitela se značajno povećavao i već kod svinja u predtovu je zabeleženo 50%(30/60) seropozitivnih jedinki. U kategoriji nazimica beleži se blagi pad seroprevalencije, a anti-HEV antitela su ustanovljena kod 48,33% (29/60) životinja. Najmanje serološki pozitivnih životinja je utvrđeno u kategoriji krmača (22/60, 36,66%). Visok nivo antitela detektovan je kod tovljenika, gde je kod 73,33% (44/60) životinja ustanovljen pozitivan serološki nalaz. Obračunata p-vrednost je iznosila $p=0,00015$, odnosno izračunata je visoko statistički

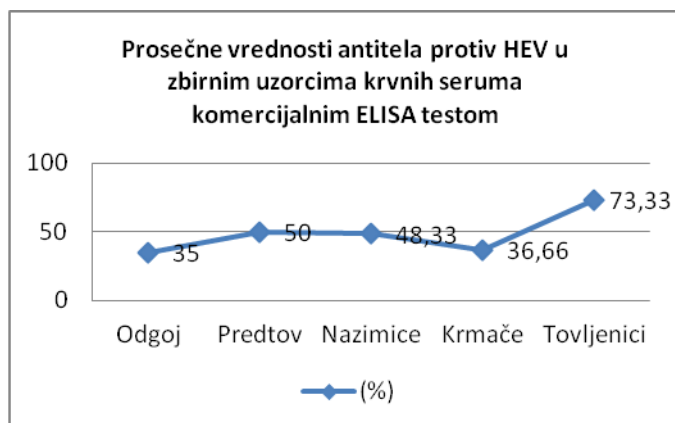
značajna razlika u ukupnom broju uzoraka seropozitivnih životinja među kategorijama svinja na ispitujućim farmama.

Tabela12: Pregled prosečnih vrednosti prisustva antitela protiv HEV virusa u zbirnim uzorcima krvnih seruma svinja komercijalnim ELISA testom na farmama A, B i C

Kategorija:	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)	p-vrednost
Odgoj	21/60 (35%)	39/60 (65%)	P=0,00015
Predtov	30/60 (50%)	30/60 (50%)	
Nazimice	29/60 (48,33%)	31/60 (51,67%)	
Krmače	22/60 (36,66%)	38/60 (63,34%)	
Tovljenici	44/60 (73.33%)	16/60 (26,67%)	
Ukupno:	146/300 (48,66%)	154/300 (51,34%)	

U Grafikonu 4 se nalazi grafički prikaz kretanja nivoa antitela u zbirnim uzorcima krvnih seruma svinja na farmama A, B i C.

Grafikon 4: Prosečne vrednosti nivoa antitela po kategorijama svinja na farmama A, B i C (komercijalni ELISA test)



5.2.3. Uporedni prikaz seroloških ispitivanja krvi svinja na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV in house i komercijalnim ELISA testovima

U Tabeli 13 su prikazani rezultati uporednih ispitivanja dobijenih HEV seroprevalencija u uzorcima krvnih seruma svinja in house i komercijalnim ELISA testom

(Tabela 13). Na farmi A je pozitivan serološki nalaz dokazan komercijalnim ELISA testom kod 40% (40/100) životinja, a in-house ELISA testom kod 37% (37/100) svinja. Utvrđena seroprevalencija *in house* ELISA testom se kretala od 10% (2/20) kod svinja u predtovu do 60% (12/20) kod krmača. Komercijalnim ELISA kitom je najmanje seropozitivnih svinja ustanovljeno u kategoriji odgoja (3/20, 15%) a najviše u kategoriji nazimica (12/20, 60%). Na farmi B, 41% (41/100) životinja je bilo spozitivno testiranjem komercijalnim kitom, a 31% (31/100) in-house ELISA testom. Nivo anti-HEV antitela se kretao od 0% (0/20) kod prasadi u odgoju do 55% (11/20) kod tovljenika u in-house ELISA testu, odnosno od 0% (0/20) kod prasadi u odgoju do 80% (16/20) kod tovljenika komercijalnim ELISA testom. Na farmi C je u poređenju sa farmama A i B utvrđen najveći broj seropozitivnih jedinki, 65% (65/100) komercijalnim testom a 54% (54/100) in-house ELISA testom. Najniža seroprevalencija je detektovana u kategoriji nazimica i krmača, gde je pozitivan serološki nalaz zabeležen kod 15% (3/20) jedinki, a najviši kod tovljenika, 85% (17/20), testirano *in house* ELISA testom. Komercijalnim ELISA testom su detektovana antitela u rasponu od 20% (4/20) kod nazimica do 100% (20/20) kod svinja u predtovu.

Tabela 13: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV ispitanih komercijalnim i *in house* ELISA testom na farmama A, B i C

Kategorija	Farma A pozitivno/testirano (%)		Farma B pozitivno/testirano (%)		Farma C pozitivno/testirano (%)	
	Prioniqs	In-house	Prioniqs	In-house	Prioniqs	In-house
Odgoj	4/20 (20%)	5/20 (25%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	17/20 (85%)	15/20 (75%)
Predtov	3/20 (15%)	2/20 (10%)	7/20 (35%)	5/20 (25%)	20/20 (100%)	16/20 (80%)
Nazimice	12/20 (60%)	12/20 (60%)	13/20 (65%)	11/20 (55%)	4/20 (20%)	3/20 (15%)
Krmače	11/20 (55%)	9/20 (45%)	5/20 (25%)	4/20 (20%)	6/20 (30%)	3/20 (15%)
Tovljenici	10/20 (50%)	9/20 (45%)	16/20 (80%)	11/20 (55%)	18/20 (90%)	17/20 (85%)
UKUPNO:	40/100 (40%)	37/100 (37%)	41/100 (41%)	31/100 (31%)	65/100 (65%)	54/100 (54%)

Uporedni rezultati ispitivanja seroprevalencije *in house* i komercijalnim ELISA testom u zbirnim uzorcima po proizvodnim kategorijama na sve tri farme prikazani su u Tabeli 14. Pregledom 300 seruma svinja, pozitivan nalaz je ustanovljen kod 48.66% (148/300) životinja ispitanih komercijalnim kitom, odnosno 40.66% (122/300) in-house ELISA testom. Najniža seroprevalencija, testiranjem komercijalnim ELISA kitom, zabeležana je kod prasadi u odgoju, 35% (21/60), a najviša, 73.33% (44/60) kod tovljenika. U *in house* ELISA testu nivo nivo detektovanih anti-HEV antitela se kretao od 26.66% (16/60) kod krmača do 61.66% (37/60) kod tovljenika.

Tabela 14: Usporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV ispitanih komercijalnim i in-house ELISA testom, po kategorijama svinja, na farmama A, B i C

Kategorija	% HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	
	Prioniqs	In-house
Odgoj	21/60 (35%)	20/60 (33,33%)
Predtov	30/60 (50%)	23/60 (38,33%)
Nazimice	29/60 (48,33%)	26/60 (43,33%)
Krmače	22/60 (36,66%)	16/60 (26,66%)
Tovljenici	44/60 (73,33%)	37/60 (61,66%)
UKUPNO:	146/300 (48.66%)	122/300 (40.66%)

Izračunavanje podudarnosti dobijenih rezultata seroloških ispitivanja seruma svinja sa dva dijagnostička testa: in-house i komercijalnim ELISA testom, izvršeno je statističkom obradom podataka - *Kappa test (k)* (Tabela 15).

Tabela 15: Podudarnost metoda in-house i ELISA testa za dobijene serološke nalaze seruma svinja na farmama A, B i C

		Komercijalni test (<i>Prioniqs</i>)		
		+	-	Σ
In house	+	117	5	122
	-	29	149	178
	Σ	146	154	300

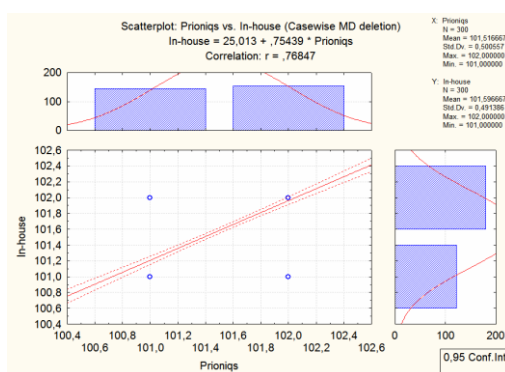
Pozitivan serološki nalaz sa oba testa je detektovan u 117 uzoraka seruma, a negativan u 149 uzoraka. Rezultati se nisu podudarali kod 29 seruma svinja, gde je *in house* ELISA testom zabeležen negativan nalaz a komercijalnim testom pozitivan rezultat. Suprotno ovom podatku, u 5 pregledanih uzoraka, *in house* ELISA testom je detektovano prisustvo specifičnih antitela a komercijalnim testom nije.

Izračunati nivo osetljivosti za ispitivani *in-house* u odnosu na komercijalni (*Prioniqs*) test iznosio je 0,80 (80%), a izračunati nivo specifičnosti za ispitivani *In-house* u odnosu na komercijalni (*Prioniqs*) test iznosio je 0,96 (96%).

Kapa analizom dva poređena serološka dijagnostička testa (*In-house* i komercijalni *ELISA* test) izračunata je $\kappa = 0,771$, što predstavlja skoro idealno podudaranje poređenih testova (Valčić, 1998).

Rezultati ispitivanja seruma svinja dobijeni sa *in-house* i komercijalnim (*Prioniqs*) *ELISA* testom su obrađeni statističkom metodom korelacije i prikazani su u grafikonu 5. Utvrđen je visok nivo pozitivne korelacije $r = 0,77$ ($p < 0,05$)

Grafikon 5: Grafički prikaz korelacije dve *ELISA* metode: komercijalni (*Prioniqs*) i *In-house* test za uzorke krvnih seruma svinja



Visok nivo pozitivne linearne korelacije $r = 0.77$ ($p < 0.05$)

5.3 Rezultati seroloških ispitivanja krvnih seruma ljudi na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV

5.3.1 Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi *in house ELISA* testom

Ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa u krvnim serumima ljudi *in house ELISA* testom vršeno je u uzorcima krvnih seruma dobrovoljnih davalaca krvi iz Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine i pacijenta i trudnica iz Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Kod 11 uzoraka su dobijene ekstinkcije blizu cut off vrednosti i izvršeno je testiranje uzoraka Western blot metodom (rezultati ispitivanja Western blot metodom prikazani su na strani 95).

U Tabeli 16 prikazani su rezultati HEV seroprevalencije dobrovoljnih davalaca krvi. Ukupno je pregledano 200 uzoraka krvi (158 žena i 42 muškarca), a 15% (30/200)

davalaca je bilo seropozitivno. Nije utvrđena statistički značajna razlika u seropozitivnosti između muškaraca i žena (16.7% prema 14.6%). HEV seroprevalencija je rasla sa starošću i bila je viša kod osoba starijih od 51 godine (21.5%) u odnosu na osobe od 31 do 50 godina života ili osobe mlađe od 30 godina (14.2%, odnosno 5.4%, $p < 0.027$). Većina pregledanih davalaca krvi, 89% (178/200), živi na selu i većina ima dve ili više različitih životinjskih vrsta u svom dvorištu. Anti-HEV antitela su detektovana kod dva dobrovoljna davaoca iz gradske sredine (9.1%, 2/22) i kod 28 ljudi iz seoskog područja (15.7%, 22/178). Nije ustanovljena statistički značajna razlika u visinu seroprevalencije kod osoba koje se bave poslom većeg rizika za nastanak HEV infekcije (kontakti sa životinjama) u odnosu na osobe sa manje rizičnim profesijama. HEV seroprevalencija kod radnika je iznosila 17.7% (16/90), a kod farmera 15% (3/20) (podaci nisu prikazani u tabeli).

Tabela 16: Prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV u krvnim serumima dobrovoljnih davalaca krvi

		Dobrovoljni davaoci krvi (n=200)	
		% HEV IgG (+)	% HEV IgG (-)
Pol	Žene	23/158 (14.6%)	135/158 (85.4%)
	Muškarci	7/42 (16.7%)	35/42 (83.3%)
Starost	18-30	2/37 (5.4%)	35/37 (94.6%)
	31-50	14/98 (14.2%)	84/98 (85.8%)
	51-70	14/65 (21.5%)*	51/65 (78.5%)
Mesto stanovanja	Grad	2/22 (9.1%)	21/23 (90.9%)
	Selo	28/178 (15.7%)	149/177 (84.3%)

* $p < 0.027$

I ako nivo ALT enzima nije ispitan kod svih dobrovoljnih davalaca (zbog nedostatka ispitujućih seruma), kod 23 testirana uzorka je ustanovljena prosečna vrednost ALT od 25 IU/ml (raspon od 6-148). Vrednosti više od 41 IU/ml utvrđene su kod 36.8% HEV seropozitivnih pacijenata i kod 25% HEV seronegativnih pacijenata (referentna vrednost ALT: muškarci < 41 UI/ml, žene < 31 UI/ml). Niti kod jedne osobe od 8 testiranih sa istorijom bolesti Hepatitis A infekcije nije ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela. Takođe, nijedna osoba nije bila seropozitivna na HIV, HBV ili HCV markere.

Iz Instituta za javno zdravlje Vojvodine pregledana su 94 uzorka krvi na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV. Od tog broja, 53 osobe su bile trudnice u 6. i 7. nedelji gestacije (prosečna starost trudnica iznosila je 28.9 godina, u rasponu od 19 do 39 godina),

koje su rutinski testirane na anti-HIV antitela i 41 pacijent (22 muškarca i 19 žena, prosečne starosti 28.6 godina, u rasponu od 1 do 69 godina), koji su testirani na prisustvo anti-HEV IgM, anti-HCV i HIV Ag/Ab. Svi uzorci seruma trudnica i pacijenata bili su HEV seronegativni. Poređenjem dobijenih rezultata prisustva anti-HEV antitela između dobrovoljnih davalaca krvi i trudnica i pacijenata ustanovljena je statistička značajna razlika ($p < 0.0004$).

5.3.2 Serološki rezultati ispitivanja krvnih seruma ljudi komercijalnim ELISA testom

Komercijalnim ELISA testom (*EIAgen HEV Ab*, proizvođača “*Adaltis*” Italija) ispitano je 94 uzoraka seruma trudnica i pacijenata (53 trudnice i 41 pacijent Infektivne klinike) i 56 uzoraka seruma dobrovoljnih davalaca krvi. Radi poređenja dva ELISA testa, serumi dobrovoljnih davalaca krvi su odabrani na osnovu rezultata in-house ELISA testa (svi uzorci sa pozitivnim nalazom, uzorci sa rezultatom blizu cut off vrednosti, kao i određeni broj seronegativnih uzoraka). Komercijalnim ELISA testom detektovano je prisustvo specifičnih IgG antitela protiv HEV genotip 1 i 2. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabelama 18 i 19.

Tabela 18: Prikaz rezultata prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima dobrovoljnih davalaca krvi

	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)
Dobrovoljni davaoci krvi	10/56 (17.86%)	46/56 (82.14%)

Tabela 19: Prikaz rezultata prisustva specifičnih antitela protiv HEV komercijalnim ELISA testom u krvnim serumima pacijenata i trudnica

	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	HEV IgG (-) Negativno/testirano (%)
Trudnice	1/94 (1.06%)	93/94 (98.94%)
Pacijenti	1/94 (1.06%)	93/94 (98.34%)
UKUPNO:	2/94 (2.12%)	92/94 (97.88%)

Od 94 pregledanih uzoraka trudnica i pacijenata, kod dve osobe je utvrđeno prisustvo anti-HEV antitela, što čini seroprevalenciju od 2.13% (2/94). Jedna seropozitivna osoba je bila trudnica, starosti 29 godina (1/94; 1,06%), a druga, pacijent Infektivne klinike, žena, starosti 34 godine (1/94; 1,06%). Od testiranih 56 krvi dobrovoljnih davalaca, prisustvo anti-HEV antitela je ustanovljeno kod 10 (17.86%) davalaca.

5.3.3 *Uporedni prikaz seroloških ispitivanja krvi ljudi na prisustvo specifičnih antitela protiv HEV in-house i komercijalnim ELISA testovima*

Serološki rezultati ispitivanja krvi dobrovoljnih davalaca, trudnica i pacijenata komercijalnim i *in house* ELISA testovima prikazani su u Tabeli 20. Sa oba testa je ukupno pregledano 150 uzoraka krvi (56 dobrovoljnih davalaca krvi i 94 uzoraka krvi pacijenta i trudnica). Uzorci krvnih seruma dobrovoljnih davalaca krvi za testiranje komercijalnim ELISA kitom odabrani su na osnovu rezultata *in-house* ELISA testa. Komercijalnim testom je pozitivan serološki nalaz utvrđen kod 17,86% (10/56) davalaca, a *in house* ELISA testom kod 53,57% (30/56) osobe. Niti kod jedne trudnice i pacijenta nije utvrđeno prisustvo anti-HEV antitela *in house* ELISA testom, dok su specifična antitela komercijalnim testom dokazana kod jedne trudnice i jedne pacijentkinje (2/94; 2.12%). U odnosu na ukupan broj pregledanih uzoraka, anti-HEV antitela su komercijalnim ELISA testom ustanovljena kod 8% (12/150) osoba, dok je utvrđena seroprevalencija *in house* ELISA testom iznosila 20% (30/150).

Tabela 20: Uporedni prikaz prisustva specifičnih antitela protiv HEV u krvnim serumima ljudi ispitanih komercijalnim i *in house* ELISA testom

Kategorija	HEV IgG (+) Pozitivno/testirano (%)	
	Adaltis	In-house
Dobrovoljni davaoci krvi	10/56 (17,86%)	30/56 (53,57%)
Trudnice i pacijenti	2/94 (2,12%)	0/94 (0%)
UKUPNO:	12/150 (8%)	30/150 (20%)

Podudarnost rezultata seroloških ispitivanja ljudskih seruma ispitanih sa dva dijagnostička testa: *in house* i komercijalnim ELISA testom, izvršeno je statističkom obradom podataka - *Kappa test* (*k*). Rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21: Podudarnost metoda in-house i komercijalnog ELISA testa za dobijene serološke nalaze anti-HEV antitela u krvnim serumima ljudi

		Komercijalni test (<i>Adaltis</i>)		
		+	-	Σ
In-house	+	9	21	30
	-	3	117	120
	Σ	12	138	150

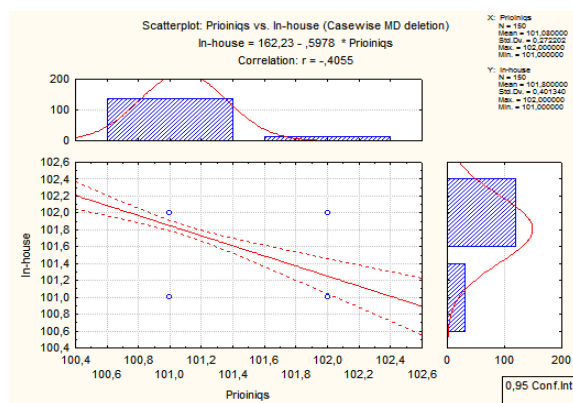
Pozitivan serološki nalaz je ustanovljen kod 9 uzoraka, a negativan kod 117 uzoraka analizom sa oba testa. Rezultati se nisu podudarali kod 3 uzorka (u *in house* testu je rezultat bio negativan a u komercijalnom pozitivan), odnosno kod 21 uzorka (u *in house* testu rezultat je bio pozitivan, a u komercijalnom testu negativan).

Izračunati nivo osetljivosti za ispitivani *in house* u odnosu na komercijalni test iznosio je 0,75 (75%), a izračunati nivo specifičnosti za ispitivani *in house* u odnosu na komercijalni test iznosio je 0,847 (84,7%).

Kapa analizom dva poređena serološka dijagnostička testa (*in house* i komercijalni ELISA test) izračunata je vrednost $\kappa = 0,354$, što predstavlja srednji nivo podudaranja poređenih testova (Valčić, 1998).

Rezultati ispitivanja prisustva anti-HEV antitela ljudi sa dve ELISA metode: *in house* i komercijalnim testom su upoređeni statističkom metodom korelacije (grafikon 6) i ustanovljen je nizak nivo negativne linearne korelacije $r = -0.41$

Grafikon 6: Grafički prikaz korelacije dve upoređene metode: komercijalni i in-house ELISA test za uzorke krvnih seruma ljudi

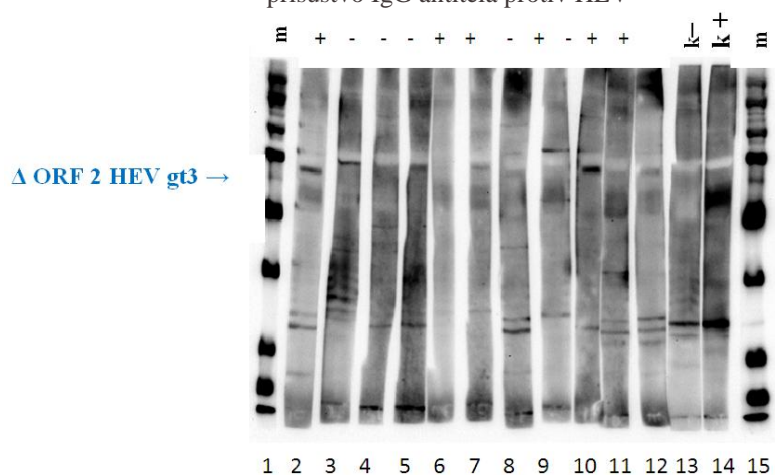


Nizak nivo negativna linearne korelacije $r = -0.41$ ($p < 0.05$)

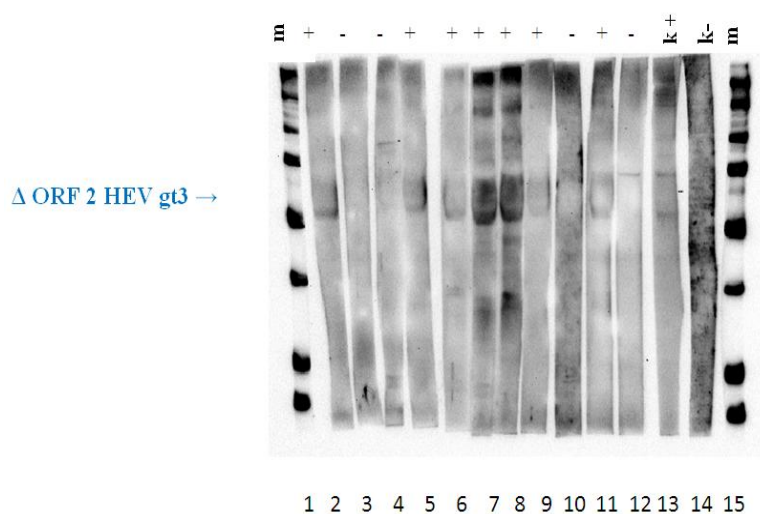
5.4 REZULTATI ISPITIVANJA KRVNIH SERUMA SVINJA I LJUDI WESTERN BLOT METODOM

Na slici 21 su prikazani rezultati Western blot analize 11 ispitujućih seruma svinja sa farmi A, B i C, čije su očitane ekstinckije u in-house ELISA testu bile blizu cut off vrednosti. Od 11 pregledanih uzoraka, kod 6 je potvrđen pozitivan nalaz. Na prvoj i poslednjoj poziciji (1. i 15. kolona) se nalazi marker; od 2.-12. reda ispitujući serumi svinja; na poziciji 13 je HEV negativan svinjski serum (negativna kontrola), a na mestu 14 je HEV pozitivan svinjski serum (pozitivna kontrola). Iznad ispitujućih seruma su oznake „+“ ili „-“ što znači da je rezultat pozitivan ili negativan u Westren blot tehnici (pojava band-a molekulske mase od 65-68 kDa). Na osnovu dobijenih rezultata definisani su pozitivni ili negativni rezultati ispitivanja prisustva anti-HEV antitela u *in house* ELISA testu.

Slika 21: Rezultati ispitivanja Westren blot metodom krvnih seruma svinja na prisustvo IgG antitela protiv HEV



Slika 22: Rezultati ispitivanja Westren blot metodom krvnih seruma ljudi na prisustvo IgG antitela protiv HEV



Western blot metodom su ispitani i krvni serumi dobrovoljnih davalaca krvi, čije su dobijene OD vrednosti u *in house* ELISA testu takođe bile blizu cut off vrednosti. Rezultati su prikazani na slici 22. Pregledano je 11 seruma dobrovoljnih davalaca krvi, a kod 7 je potvrđen pozitivan nalaz. Na pozicijama 1 i 15 je postavljen marker. Ispitujući serumi ljudi se nalaze na pozicijama od 2 do 12. Na poziciji 13 i 14 nalaze se pozitivan i negativan ljudski serum (pozitivna i negativna kontrola).

5.5 REZULTATI DETEKCIJE HEV RNK U ORGANIMA I FECESU SVINJA

Da bi ispitili prisustvo hepatitis E virusa u proizvodnom lancu prerade svinjskog mesa, u klanicama su sakupljeni uzorci od 50 prasadi i 95 tovljenika, što je ukupno činilo 145 životinja. Pregledani su uzorci fecesa, jetre, mesa i žuči. Detekcija HEV RNK vršena je One Step real-time RT- PCR metodom.

Rezultati One Step real-time RT-PCR prikazani su na slici 23 i tabelarno (tabele 22, 23 i 24).

Slika 23: Rezultat real-time RT-PCR

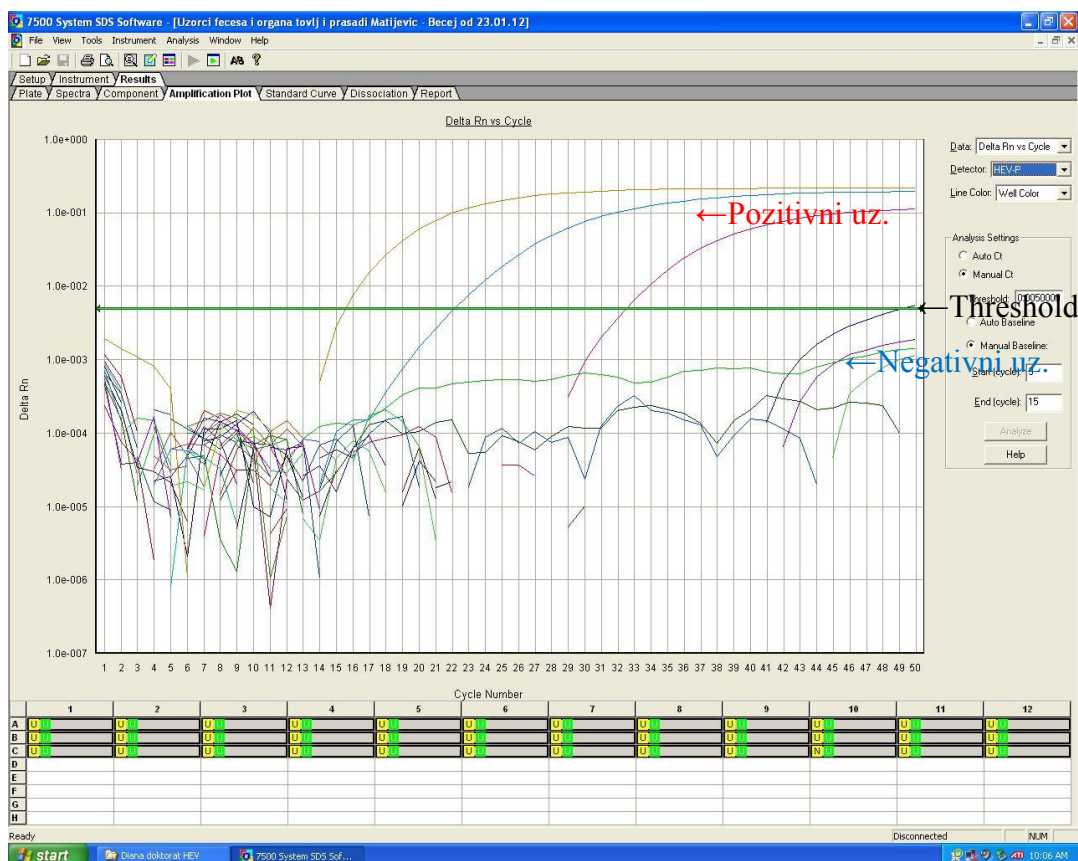


Tabela 22: Rezultati detekcije HEV RNK u uzorcima fecesa, jetre, žuči i mesa tovljenika i prasadi na liniji klanja

Kategorija:	HEV RNK Pozitivno/testirano (%)			
	Feces	Žuč	Jetra	Meso
Prasad	27/50 (54%)	13/50 (26%)	8/50(16%)	5/50 (10%)
Tovljenici	4/55 (7.27%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)

U tabeli 22 su prikazani rezultati ispitivanja prisustva HEV RNK u uzorcima organa i fecesa tovljenika i prasadi u klanicama. U kategoriji prasadi uzrasta 8 do 10 nedelja, od 50 pregledanih uzoraka fecesa i tkiva, HEV RNK je detektovana najčešće u fecesu (54%), zatim žuči (26%), jetri (16%), a najmanje u mesu (10%). U kategoriji tovljenika, pregledano je 95 uzoraka organa i 55 uzoraka fecesa (nisu svi uzorci fecesa bili dostupni za analizu). HEV RNK nije dokazana ni u jednom uzorku jetre, žuči ili mesa, a pozitivan HEV nalaz potvrđen je u samo 4 uzorka fecesa (7.27%).

U tabeli 23 je prikazano prisustvo HEV genoma u fecesu, žuči, jetri i mesu svih pregledanih prasadi (ukupno). Kod 17 prasadi (17/50, 34%), HEV RNK je dokazana samo u fecesu, a kod 3 životinje (3/50, 6%) samo u žuči. U ostalim organima se HEV prevalenca kretala od 2 do 4%. Virus je detektovan u najmanje jednom uzorku od 32 praseta (32/50, 64%). Kod 18 prasadi (18/50, 36%) nije dokazano prisustvo genoma hepatitis E virusa niti u jednom uzorku.

Tabela 23: Molekularna detekcija HEV u uzorcima fecesa, žuči, jetre i mesa prasadi (ukupno)

Uzorak	HEV pozitivno/testirano (%)
Feces, žuč, jetra i meso	2/50 (4%)
Jetra, žuč i meso	1/50 (2%)
Feces i jetra	2/50 (4%)
Feces i žuč	2/50 (4%)
Feces, jetra i žuč	1/50 (2%)
Feces, žuč i meso	1/50 (2%)
Samo feces	17/50 (34%)
Samo žuč	3/50 (6%)
Prasad pozitivna u najmanje jednom uzorku	32/50 (64%)
Prasad negativna u svim uzorcima	18/50 (36%)

Pojedinačna analiza distribucije virusne HEV RNK u fecesu, jetri, žuči i mesu svakog praseta sa pozitivnim nalazom prikazana je u Tabeli 24.

Tabela 24: Distribucija HEV RNK u uzorcima fecesa, jetre, žuči i mesa prasadi (individualno)

Red.br.	Oznaka praseta	Feces	Jetra	Žuč	Meso
1	43	-	+	+	+
2	44	+	-	-	-
3	46	+	-	-	-
4	47	+	-	-	-
5	48	+	+	-	-
6	49	+	+	+	+
7	50	+	-	-	-
8	52	+	+	+	+
9	54	+	-	+	+
10	55	+	-	-	-
11	56	+	+	-	+
12	168	-	-	+	-
13	172	+	-	-	-
14	174	+	+	+	-
15	175	+	-	-	-
16	176	+	+	+	-
17	177	+	-	-	-
18	178	+	-	-	-
19	180	+	-	+	-
20	181	+	-	-	-
21	182	+	-	-	-
22	183	+	-	-	-
23	185	+	-	-	-
24	186	+	-	+	-
25	187	-	-	+	-
26	189	+	-	-	-
27	190	+	+	+	-
28	193	+	-	-	-
29	194	-	-	+	-
30	195	+	-	-	-
31	196	+	-	-	-
32	197	-	-	+	-
UKUPNO:		27/50 (54%)	8/50 (16%)	13/50 (26%)	5/50 (10%)

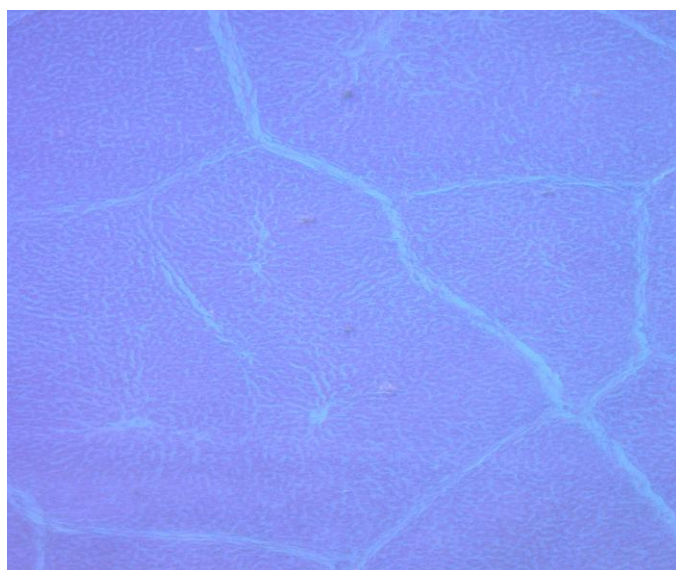
5.6 PATOHISTOLOŠKO I IMUNOHISTOHEMIJSKO ISPITIVANJE JETRI SVINJA

Patohistološki i imunohistohemijski su pregledani isečci tkiva jetre 26 prasadi kod kojih je real-time RT-PCR metodom dokazano prisustvo HEV RNK u jetri, žuči ili mesu. Negativnu kontrolu su predstavljali uzorci 4 jetre sa negativnim RT-PCR nalazom.

HEV negativni uzorci jetre svinja– patohistološki pregled

U uzorcima 4 jetre poreklom od HEV negativnih tovljenika (negativna kontrola) nisu ustanovljene patohistološke promene. Histološkim pregledom jetri uočavaju se poligonalni do okrugli jetrini režnjići u čijem središtu se nalazi centralna vena od koje se radijalno pružaju hepatociti složeni u Remakove gređice. Svaki lobulus je jasno odvojen od okolnih lobulusa vezivno-tkivnim septama (Slika 24).

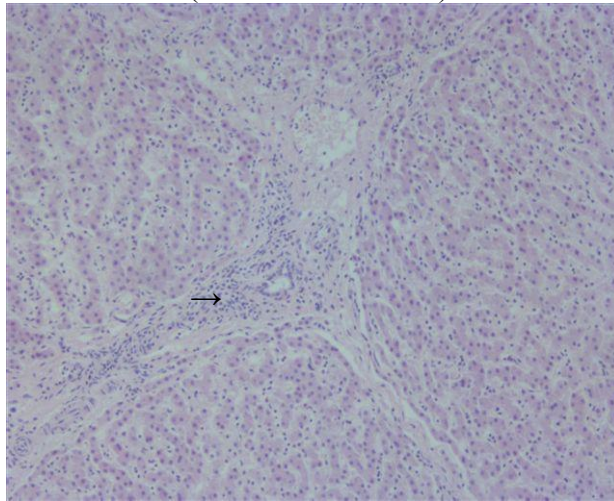
Slika 24: Histološki izgled jetre zdrave svinje



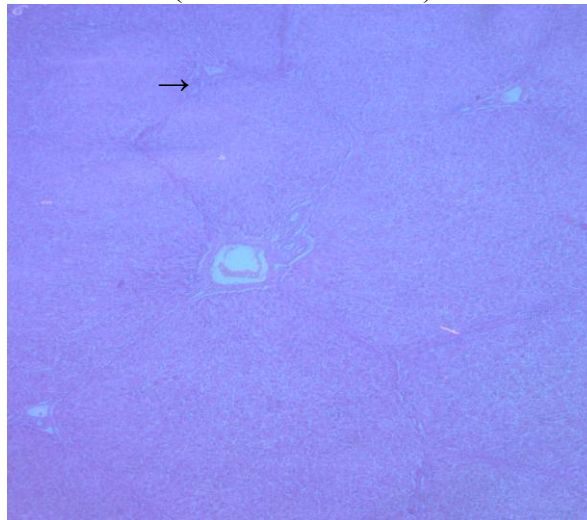
HEV pozitivni uzorci jetre svinja – patohistološki pregled

Od ukupno 26 HEV RNK pozitivnih uzoraka jetri, žuči i mesa prasadi, u 3 uzorka (11.53%) jetri dominantan nalaz čini prisustvo mononuklearnog ćelijskog infiltrata različite distribucije i gustine. Uočeni mononuklearni infiltrat se sastoji od limfocita, plazma ćelija i makrofaga (Kupferove ćelije). Mononuklearni ćelijski infiltrat nalazi se uglavnom u portnim prostorima jetre (Slika 25), gde je blago zastupljen, dok je u pojedinim uzorcima ćelijski infiltrat raspoređen multifokalno u parenhimu jetre (Slika 26). Histopatološkim pregledom ustanovljeno je da je osnovna arhitektura jetre očuvana.

Slika 25: Mononuklearni ćelijski infiltrat u portnim prostorima jetre praseta (obeležen strelicom)



Slika 26: Mononuklearni ćelijski filtrat raspoređen multifokalno u parenhimu jetre (obeležen strelicom)



Fokalno se u uzorcima jetre uočava pelioza – proširenje sinusoida u obliku jezeraca. Ni u jednom uzorku nije ustanovljena nekroza hepatocita, balonirajuća degeneracija niti acidofilna telašca. Opisane promene u jetri odgovaraju nespecifičnom hepatitisu, mada ovakav nalaz ne isključuje blagu nekrotičnu virusnu inflamaciju.

Imunohistohemijsko ispitivanje:

Imunohistohemijskim pregledom uzoraka jetre prasadi nije dokazano prisustvo antigena hepatitis E virusa.

5.7 PROTOKOL LABORATORIJSKOG ISPITIVANJA

Na osnovu iznetih rezultata istraživanja, dat je predlog protokola za laboratorijsku dijagnostiku HEV infekcije koji se odnosi na: ispitivanje zdravstvenog stanja svinja, ispitivanje zdravstvene bezbednosti mesa i jetri svinja na liniji klanja i pregled krvi dobrovoljnih davalaca krvi. U protokolu su definisani: vrsta uzorka, broj uzoraka, način uzorkovanja, laboratorijske dijagnostičke metode i postupci u slučaju pozitivnog i negativnog rezultata ispitivanja.

1. Protokol laboratorijskog ispitivanja zdravstvenog stanja svinja:

- Za potrebe laboratorijskog ispitivanja prisustva HEV infekcije na farmi potrebno je dostaviti po 20 uzoraka krvi od svake proizvodne kategorije svinja i 5 zbirnih uzoraka fecesa u količini od 10g sa 3 različite strane obora
- Za ispitivanja HEV seroprevalencije primenjuje se *in house* ili komercijalni ELISA test za detekciju anti-HEV IgG antitela
- Uzorke krvi svinja koji su nakon višestrukog ponavljanja u ELISA testu imali ekstinkcije blizu cut off vrednosti ispitati Western blot testom kao potvrdnim testom
- Uzorci fecesa ispituju se na prisustvo HEV RNK real-time RT-PCR metodom
- Ukoliko se dokaže prisustvo HEV infekcije u uzorcima krvi i virusna HEV RNK u fecesima na farmama potrebno je predložiti epizootiološki nadzor i redovnu kontrolu, kao i predlog programa za sprovođenje higijensko-sanitarnih mera radi sprečavanja daljeg širenja bolesti.
- Ukoliko se dobije negativan serološki rezultat i ne dokaže prisustvo HEV RNK u fecesu svinja, potrebno je izvršiti uzorkovanje za 2-3 meseca i ponoviti ispitivanja

2. Protokol laboratorijskog ispitivanja zdravstvene bezbednosti mesa i jetri na liniji klanja:

- Za potrebe laboratorijskog ispitivanja dostaviti 50g mesa sa trupa i komad jetre sa žučnom kesom prasadi i tovljenika sa linije klanja
- Uzorke mesa, jetri i žuči potrebno je pregledati real-time RT-PCR metodom

- Ukoliko se dokaže pozitivan PCR nalaz, izvršiti i patohistološki pregled uzoraka jetri
- Preporuka je da se uzorci mesa i jetre sa pozitivnim PCR nalazom pravilno termički obrade (temperatura od 90°C u trajanju od 1,5 minuta inaktiviše virus)
- Poboljšati higijensko-sanitare mere u klanici

3. Protokol laboratorijskog ispitivanja krvi dobrovoljnih davalaca krvi

- Prilikom sakupljanja krvi dobrovoljnih davalaca potrebno je sprovesti epidemiološku anketu sa svim relevantnim podacima (pol, starost, istorija bolesti)
- Krvne serume dobrovoljnih davalaca krvi, rizičnih grupa trudnica i pacijenata sa istorijom hepatitisa nepoznate etiologije neophodno je pregledati *in house* ili komercijalnim ELISA testom na prisustvo specifičnih antitela protiv hepatitis E infekcije
- Uzorci krvnih seruma ljudi koji su dali nakon višestrukog ponavljanja ekstinkcije blizu cut off vrednosti ispitati Western blot testom kao potvrdnim testom
- HEV pozitivne uzorke krvi isključiti iz upotrebe za transfuziju
- Vršiti redovnu kontrolu krvi dobrovoljnih davalaca na prisustvo specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa

5.8. REZULTATI UTVRĐIVANJA EPIDEMIOLOŠKE POVEZANOSTI IZMEĐU INFEKCIJA KOD SVINJA I LJUDI

Podaci o broju i vrsti domaćih životinja, broju domaćinstava koja uzgajaju domaće životinje, kao i HEV seropozitivnim vlasnicima životinja prikazani su u Tabeli 25. Iz tabele se zapaža da najveći broj domaćinstava ima pse (59%, 118/200), živinu (44%, 88/200) i svinje (42%, 84/200). Najviša HEV seroprevalencija među držaocima životinja zabeležena je kod dobrovoljnih davalaca krvi koji su u svojim dvorištima imali konje (16,6%, 1/6), a najmanja kod ljudi koji su držali ovce i koze (3,5%, 1/28), dok nijedna seropozitivna osoba nije zabeležena u kategoriji vlasnika goveda. U poslednjoj koloni tabele 25 prikazani su rezultati HEV pozitivnih dobrovoljnih davalaca krvi, držaoca domaćih životinja, u odnosu na ukupan broj seropozitivnih davalaca (30/200), gde je ustanovljeno da je najviše HEV pozitivnih davalaca bilo u kategoriji vlasnika pasa (63,3%,

19/30), a najmanje u kategoriji vlasnika konja i kunića (3.3%, 1/30). Međutim, nije ustanovljena korelacija između HEV seropozitivnosti kod dobrovoljnih davalaca krvi u odnosu na kontakt sa svinjama, kao najvažnijim rezervoarom hepatitis E virusa, kao ni sa drugim životinjskim vrstama.

Tabela 25: Vrste životinja i broj životinja u domaćinstvima dobrovoljnih davalaca krvi

Vrsta životinja u dvorištu	Broj domaćinstava sa životinjama /ukupno	Broj anti-HEV (+) vlasnika/ukupno (%)	Broj anti-HEV (+) vlasnika/ukupno anti-HEV (+) (%)
Svinje	84/200 (42%)	11/84 (13,1%)	11/30 (36,6%)
Goveda	13/200 (6,5%)	0	0
Konji	6/200 (3%)	1/6 (16,6%)	1/30 (3,3%)
Živina	88/200 (44%)	13/88 (14,8%)	13/30 (43,3%)
Ovce/koze	28/200 (14%)	1/28 (3,5%)	1/30 (3,3%)
Psi	118/200 (59%)	19/118 (16,1%)	19/30 (63,3%)
Mačke	73/200 (36,5%)	10/73 (13,7%)	10/30 (33,3%)
Kunići	17/200 (8,5%)	1/17 (5,8%)	1/30 (3,3%)
Bez životinja	33/200 (16,5%)	3/33 (9%)	3/30 (10%)

6. DISKUSIJA

Hepatitis E virus (HEV) je uzročnik nastanka mnogobrojnih epidemija u nerazvijenim zemljama Azije i Afrike, u kojima postoje slabi higijenski uslovi života. Infekcija se najčešće prenosi putem zagađene hrane i vode, a klinička slika kod ljudi se manifestuje simptomima žutice, povišene telesne temperature, mučnine, povraćanja, tamnog prebojavanja mokraće i dr.

Pojavom sporadičnih slučajeva oboljenja ljudi i u visoko razvijenim zemljama Evrope i u SAD, započela su ispitivanja koja su pokazala da postoji iznenađujuće veliki broj seropozitivnih osoba, naročito među uzgajivačima svinja, veterinarima i ostalim osobama koje su bile u kontaktu sa životinjama, a infekcija je dokazana i kod dobrovoljnih davalaca krvi. Postavljena je sumnja da životinje mogu predstavljati rezervoar virusa, što je potvrđeno i prvom izolacijom uzročnika virusa kod svinja 1997. godine (Meng i sar.). Visoka seroprevalencija anti-HEV antitela ustanovljena je kod svinja na farmama u celom svetu. Iako infekcija kod svinja prolazi asimptomatski, bez kliničkih znakova oboljenja, svinje predstavljaju izvor zaraze i put prenošenja i održavanja uzročnika u prirodi.

Mnogobrojni autori su opisali i infekciranje ljudi nedovoljno termički obrađenim mesom i jetrama zaraženih divljih i domaćih svinja i jelenova, čime je potvrđen i zoonotski potencijal virusa.

U ovom radu prikazano je prisustvo i raširenost HEV infekcije na tri svinjarske farme u Južnobačkom i Sremskom okrugu i dokaz prisustva virusnog genoma u mesu, žuči i jetrama prasadi na liniji klanja. U ispitivanju su primenjeni i savremeni laboratorijski testovi, koji će omogućiti unapređenje dijagnostike i praćenje ove značajne zoonozne infekcije. Obrazloženje rezultata istraživanja će biti prikazano po celinama, u skladu sa redosledom postavljenih ciljeva ispitivanja.

6.1 Utvrđivanje prisustva HEV RNK u fecesu svinja na farmama

Da bi odabrali farme na kojima će se vršiti serološka istraživanja HEV seroprevalencije, prvo smo ispitali prisustvo HEV RNK u fecesu svinja na 6 farmi. Odabrane su svinje uzrasta 2 - 4 meseca iz kategorija odgoja, predtova i mlađeg tova. HEV je dokazan u fecesu svinja na svim ispitujućim farmama. Prevalenca virusa je iznosila 20% na farmi 6, 60% na farmi 1, 80% na farmama 2 i 5 i 100% na farmama 3 i 4. Na osnovu dobijenih rezultata, za dalja ispitivanja odabrali smo 3 farme (A, B i C) na kojima je prisustvo HEV RNK dokazano u 20%, 80% i 100% uzoraka fecesa.

Slične podatke iznose i drugi autori koji opisuju da je ekskrecija virusa najintezivnija u uzrastu od 8 do 12 nedelja, a zatim postepeno opada i virus se veoma retko može detektovati u fecesu životinja starijih od 6 meseci (Fernandez-Barredo et al., 2006; Meng et al., 1997; McCreary et al., 2008; Seminati et al., 2007).

6.2 Serološko ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv HEV kod svinja

Ispitivanje seroprevalencije je vršeno primenom seroloških testova-nekomercijani (*in house*) i komercijalni ELISA test.

In house ELISA testom prisustvo specifičnih antitela protiv HEV dokazano je kod svih kategorija svinja na farmama industrijskog tipa na teritoriji Južne Bačke i Srema. Dobijeni rezultati u skladu su sa podacima o širokoj rasprostranjenosti hepatitis E infekcije na farmama svinja u svetu, objavljenim od strane mnogobrojnih autora (Meng et al. 1997; Chandler et al. 1999; Seminati et al. 2008;; Kaba et al 2009; Reuter et al., 2009; Bachlein et al. 2010; Breum et al. 2010; Casas et al. 2011; Martinelli et al. 2011; Jimenez de Oya et al. 2011).

Prosečna utvrđena vrednost anti-HEV antitela za ukupan broj uzoraka krvi sa sve tri farme je iznosila 40,66%. U prethodnom radu naše istraživačke grupe (Lupulović i sar., 2010) pozitivan serološki nalaz ustanovljen je kod 34.6% svinja u individualnim gazdinstvima, što je procenat približan rezultatu koji smo dobili ispitivanjem svinja u farmskom uzgoju. Visoka seroprevalencija i prisustvo anti-HEV IgG antitela, sa podacima sličnim našim rezultatima, zabeležena je i u istraživanjima mnogih drugih istraživača. U Španiji je HEV seroprevalencija na farmam svinja iznosila 48.4% (Casas et al., 2009), u Francuskoj 40.5% (Kaba et al., 2009), u Italiji 50.21% (Martinelli et al., 2011), u Kanadi 59,4% (Yoo et al., 2001), u Australiji 30% (Chandler et al., 1999), u Nemačkoj 49,8% (Baechlein et al., 2010), u Japanu 56% (Takahashi et al., 2005), itd.

Prisutna je neujednačenost u broju HEV pozitivnih svinja na farmama. Na farmi A seroprevalencija je iznosila 37%, na farmi B 31% i na farmi C 54%. Pavo i sar. (2010) su takođe zaključili da seroprevalencija varira u odnosu na lokaciju i veličinu farme. U Kanadi su u oblastima Quebec i Ontario ustanovljena anti-HEV antitela kod 88.8% i 80.1% svinja, a u Alberti i Saskatchewanu 38.3% (Yoo et al., 2001). Prva objavljena ispitivanja koje se odnose na prisustvo HEV infekcije kod svinja na ostrvima Java i Bali pokazala su da je infekcija neravnomerno raspoređena. Broj HEV seropozitivnih životinja

na Baliju je iznosio 68.8% a na ostrvu Java 90.0% (Utsumi et al., 2011). U Španiji su u 6 različitih provincija zabeležena značajne razlike u broju HEV pozitivnih svinja a seroprevalencija se kretala od 2.5% u Salamanki do 26.4% u Saragossi (De Oya et al., 2011). Meng i sar. (1997) su ustanovili variranje u broju pozitivnih jedinki među različitim oblastima u Americi.

U našem istraživanju smo utvrdili da postoji neujednačenost u broju HEV pozitivnih životinja među proizvodnim kategorijama. Broj životinja sa pozitivnim nalazom se kretao u rasponu od 0% kod kategorije prasadi u odgoju na farmi B do 85% kod tovljenika na farmi C. U literaturi su opisani rezultati istraživanja koji su u saglasnosti sa našim rezultatima. Munne i sar. (2006) su ustanovili velika variranja među zapaćtima svinja u Argentini koja su se kretala od 4 do 58%. U ispitivanjima sprovedenim u Brazilu, Guimaraes i sar. (2005) su zabeležili variranja u broju seropozitivnih životinja među zapaćtima od 15 do 100%. U radu Martinelija i sar. (2011) u Italiji su zabeležena variranja među zapaćtima od 0 do 100% U Rumuniji su istraživaći Anita i sar. (2012) opisali da se procenat seroprevalencije kretao od 0% do 44.4% među zapaćtima svinja na pet pregledanih farmi.

Ukoliko posmatramo prosećne vrednosti nivoa anti-HEV antitela za ukupan broj uzoraka na farmama A i B, zapaća se da seroprevalencija raste sa starošću životinja. Kod mlaćih kategorija životinja u odgoju i predtovu je 15% testiranih životinja bilo pozitivno u uzrastu do 3 meseca, da bi se taj procenat povećao do 46.66% kod životinja strarijih od 3 meseca (nazimice, krmaće i tovljenici). Do slićnih zakljućaka došli su i autori de Oya i sar. (2011) koji su ustanovili da je broj anti-HEV IgG pozitivnih životinja bio veći kod odraslih životinja strarijih od 6 meseci (30.2%) nego kod svinja ispod 6 meseci starosti (15.5%). Istraćivaći Chandler i sar. (1999) su kod prasadi uzrasta 9 nedelja kod samo 6% životinja utvrdili anti-HEV antitela, dok je kod 95% životinja uzrasta od 16 nedelja ustanovljena serokonverzija. Takahsahi i sar. (2005) su IgG antiti-HEV antitela detektovali kod samo 10% prasadi uzrasta mesec dana, ali je 73% svinja bilo seropozitivno u uzrsatu od 3 do 6 meseci. Wang i sar. (2002) su u Kini ustanovili da je samo 10% prasadi mlaćih od 3 meseca imalo anti-HEV antitela a taj procenat je kod životinja straijih od 3 meseca iznosio 78.8%.

Na farmi A kod 25% prasadi u odgoju utvrćeno je prisustvo anti-HEV IgG antitela koja predstavljaju pasivni imunitet nastao putem kolostruma majki. Mećutim, ova zašćita je bila kratkotrajna, nivo antitela je postepeno opadao, i već u uzrastu od 3 meseca (predtov) je kod samo 10% životinja detektovano prisustvo antitela. Procenat seropozitivnih

životinja zatim počinje ponovo da raste sa starošću životinja, što se objašnjava nastankom HEV infekcije i serokonverzijom. U kategoriji nazimica, krmača i tovljenika pozitivan serološki nalaz zabeležen je kod 45-60% životinja. Na farmi B kod prasadi u odgoju nije detektovana nijedna seropozitivna životinja, a u predtovu je zabeležen značajan skok nivoa antitela gde je pozitivan nalaz ustanovljen kod 25% jedinki. Pošto je na ovoj farmi prisustvo specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa detektovano kod samo 20% krmača, predpostavljamo da je bilo manje maternalnih antitela u kolostrumu krmača, a time je i značajno smanjena zaštita podmlatka. Iz iznetih podataka se može pretpostaviti da je serokonverzija kod ove prasadi nastupila ranije, odmah nakon odvajanja od krmača i prebacivanja u boksove, gde dolazi do mešanja sa drugim svinjama i nastanka HEV infekcije. Više autora je opisalo rezultate ispitivanja slične našim. Meng i sar. (1997) su ustanovili da su prasad poreklom od visoko seropozitivnih krmača u prvom mesecu života imala visok nivo antitela, koji je značajno počeo da opada nekoliko nedelja posle rođenja i gotovo nestao u uzrastu od 8 do 9 nedelja. Nakon toga, u uzrastu od 13 do 14 nedelja je nastala infekcija hepatitis E virusom i serokonverzija, a većina prasadi je razvila sopstveni imunitet. Prasad poreklom od krmača sa niskim titrom anti-HEV antitela je bila seronegativna na rođenju i kod njih je serokonverzija nastupila ranije, odnosno bili su odmah podložni HEV infekciji. Do sličnih rezultata su došli i istraživači de Deus i sar. (2008) koji su ustanovili da su IgG antitela kod prasadi poreklom od visoko pozitivnih majki posedovala kolostralna antitela do uzrasta od 9 nedelja, dok su prasad rođena od slabo pozitivnih majki imala kolostralna antitela samo u prve 2-3 nedelje života i kod njih je infekcija nastupila ranije. U uzrastu od 15 nedelja je kod većine životinja detektovana serokonverzija. Casas i sar. (2011) su dokazali da je trajanje maternalnog imuniteta kod prasadi u direktnoj korelaciji sa nivoom anti-HEV antitela kod krmača, odnosno što je bio viši nivo antitela kod majki to je bilo duže i trajanje maternalnog imuniteta. Istraživači Vitral i sar. (2005) pratili su nivo antitela kod prasadi različitog uzrasta. Pad kolostralnih antitela je nastupio u uzrastu od 2 do 8 nedelja. Sa 9-10 nedelja zabeležen je blagi porast nivoa antitela kada su antitela detektovana kod samo 13% životinja, dok je posle toga seroprevalencija naglo počela da raste tako da je 83.3% svinja bilo seropozitivno sa 15-16 nedelja života. Seminati i sar. (2008) su takođe zaključili da maternalna antitela rapidno opadaju kod prasadi posle odbijanja, a da HEV infekcija nastaje sa početkom tova. U radu autora Feng i sar. (2011) je dokazano da prasad putem kolostruma stiče pasivni imunitet, ali da se inficiraju hepatitis E virusom u uzrastu od 30 do 60 dana.

Na farmi C se rezultati ispitivanja razlikuju od rezultata dobijenih na farmama A i B. Najviše pozitivnih nalaza ustanovljeno u kategoriji mlađih životinja, u odgoju i predtovu (75% i 80%), kao i kod tovljenika (85%). Niska seroprevalencija zabeležena je kod nazimica i krmača (15%), što verovatno utiče na nedovoljnu zaštitu prasadi, koja ne dobija dovoljnu količinu maternalna antitela putem kolostruma. Na ovoj farmi je ukupan broj serološki pozitivnih jedinki bio najviši (54%), što znači da je infekcija endemskog karaktera. Rano odbijanje prasadi, prenatalnost objekata i loši higijenski uslovi držanja su svakako ključni faktori u ranom nastanku infekcije. I drugi istraživači su zaključili da različiti uslovi menadžmenta na farmama, higijena i proizvodna struktura predstavljaju uzrok brzog širenja HEV infekcije (de Oya et al. 2011, Utsumi et al., 2011). U gusto naseljenim farmama prasad rano dolazi u kontakt sa virusom i zarazom, što je karakteristično za infekcije koje nastaju enteralnim putem (Vital et al., 2005; Guimaraes et al., 2005). Martineli i sar. (2011) su vršili ispitivanja HEV infekcije na farmama u Italiji i zaključili da je seroprevalencija bila viša na velikim farmama i među zapaćima sa većim brojem životinja.

Ukoliko se posmatra broj pozitivnih nalaza u ukupnom broju uzoraka krvi svinja sa sve tri farme, može se zapaziti da seropozitivnost raste od kategorije prasadi u odgoju (33.33%) do kategorije tovljenika (61.66%), sa izuzetkom krmača gde je seroprevalencija najniža (26.66%). Ovaj podatak se može objasniti činjenicom da se suprasne nazimice i krmače odvajaju u posebne objekte, gde ostaju izdvojene i tada je smanjeno mešanja životinja. Iako je većina autora u svojim radovima objavila podatke o visokoj seroprevalenciji kod krmača (Casas et al., 2011; Martineli et al., 2011; Garkavenko et al., 2001; Seminati et al., 2008), postoje i rezultati ispitivanja koji odgovaraju našim nalazima. Meng i sar. (1999) su testirali veliki broj svinja i zapazili da postoje značajna variranja među kategorijama krmača. Istraživači Clemente-Casares i sar. (2003) su na farmama u Španiji ustanovili prisustvo anti-HEV antitela kod 33.3% krmača prvopraskinja i 42.8% krmača višepraskinja. Choi i sar. (2003) su zabeležili prisustvo anti-HEV antitela kod samo 8.8% krmača na farmama u Koreji.

Kod tovljenika na svim farmama je ustanovljena visoka prosečna vrednost nivoa antitela od 61.66%, koja se u zavisnosti od farme kretala od 45 do 85%. Mnogobrojni autori su u svojim istraživanjima ustanovili veliki broj seropozitivnih životinja u kategoriji tovljenika. Vital i sar. (2005) su dijagnostikovali prisustvo anti-HEV antitela kod 97.3% tovljenika starijih od 25 nedelja. Blacksell i sar. (2007) su kod 51.2% tovljenika na klanici dokazali anti-HEV antitela, Li i sar. (2009) kod 78.4% tovljenika, a Wacheck i sar. (2012)

u Nemačkoj kod 68.6% tovljenika. Dokaz HEV infekcije kod tovljenika znači da zaražene svinje ulaze u klanice, a organi i meso poreklom od ovih životinja ulaze u lanac ishrane, što može ugroziti ljudsko zdravlje.

Mnogobrojni istraživači opisali su u svojim radovima ispitivanje seroprevalencije kod svinja koristeći in-house ELISA test sa antigenom HEV genotip 1 ili 2 (Garkavenko et al., 2001; Vitral et al., 2005; Wang et al., 2002). Međutim, može se desiti da ovi testovi ne detektuju antitela protiv HEV genotip 3, koji je najzastupljeniji genotip kod svinja i ljudi u industrijalizovanim zemljama koje nisu endemska područja (Meng et al., 2003; Pinto and Saiz, 2007, Worm et al., 2002). Istraživači de Oya i sar. (2009) su razvili tehniku dobijanja rekombinantnog ORF 2 HEV genotip 3 proteina, koji je korišćen za ispitivanja prisustva anti-HEV antitela kod svinja i ljudi u našem istraživanju. Do pojave komercijalnih ELISA kitova za detekciju anti-HEV antitela kod svinja, mnogobrojna istraživanja vršena su humanim ELISA kitom sa modifikacijama koje su se odnosile na korišćenje konjugovanih anti-svinjskih antitela umesto anti-ljudskih antitela (Martinesi et al., 2011, Kaba et al., 2009; Utsumi et al., 2011; Yoo et al., 2001). Modifikacijom komercijalnog ELISA testa se najčešće menja i smanjuje osetljivost testa (de Oya et al., 2009). Utsumi i sar. (2011) su zaključili da modifikovani komercijalni testovi gube osetljivost ukoliko pretrpe izmene, i da se ispitivanja kod svinja moraju vršiti sa najmanje još jednim dodatnim testom.

Osim pomenutog *in house* testa, dizajniranog u laboratorijskim uslovima, na tržištu se nedavno pojavilo nekoliko komercijalnih ELISA testova za serološko ispitivanje prisustva hepatitis E infekcije kod svinja. Jedan od tih testova je i „Priocheck“ (Prionics) koji je po prvi put u Srbiji testiran sa serumima svinja iz našeg istraživanja. Svih 300 uzoraka krvi svinja sa oglednih farmi je pregledano ovim testom i broj seropozitivnih životinja na farmi A je iznosio 40%, na farmi B 41% i na farmi C 65%. Među zapažama se seroprevalencija kretala od 0% u kategoriji odgoja na farmi B do 90% kod tovljenika na farmi C. Prosečna vrednost nivoa anti-HEV antitela svih životinja iznosila je 48.66%, i najniža vrednost je zabeležena u kategoriji odgoja (35%) a najviša u kategoriji tovljenika (73.33%). U dostupnoj literaturi nema puno radova u kojima je HEV seroprevalencija ispitana komercijalnim ELISA testovima. Nekolicina autora je koristila u svojim istraživanjima *Priocheck* test za testiranje prisustva anti-HEV IgG antitela kod svinja na farmama (Anita et al., 2012; Reisp et al., 2012) ili na klanicama (Wacheck et al., 2012).

Komercijalnim ELISA kitom detektovan je nešto veći broj serološki pozitivnih životinja u odnosu na rezultate dobijene in-house ELISA metodom. Podudarnost rezultata in-house i komercijalnog ELISA testa iznosila je 80%, a izračunati nivo specifičnosti in-

house u odnosu na komercijalni test 96%. Kapa analizom poređenih testova je izračunata $k = 0.771$, što predstavlja skoro idealno podudaranje rezultata ispitivanja sa oba testa. Istraživači Bechlein i sar. (2010) su poredili rezultate in-house ELISA testa (TiHo) i komercijalnog testa i ustanovili da se rezultati ispitivanja poklapaju u samo 56.1%. Podudarnost rezultata od 80% dobijenih u našim ispitivanjima poređenjem *in house* i komercijalnog testa je visoka i može se objasniti činjenicom da je u oba testa za mikrotitar ploču vezan antigen HEV genotip 3.

Ustanovljen visok nivo anti-HEV antitela *in house* i komercijalnim ELISA testom (40.66% odnosno 48.66%) dokaz su da je HEV infekcija široko rasprostranjena na farmama svinja industrijskog tipa u Vojvodini.

6.3 Serološko ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv HEV kod ljudi

U svetu su do sada objavljeni podaci o epidemijama HEV infekcije velikih razmera, uglavnom u endemski zaraženim zemljama Azije i Afrike (Aggarwal et al., 2011; Mushahwar et al., 2008). U razvijenim zemljama Evrope i SAD su zabeleženi samo sporadični slučajevi akutnih slučajeva HEV infekcije koji su smatrani „uveženim“ slučajevima iz zaraženih zemalja (Emerson et Purcel, 2003; Pavio et al., 2010). Međutim, počeli su sve više da se objavljuju i podaci o povećanju broja serološki pozitivnih ljudi iz ne-endemskih zemalja, koji nisu putovali u inostranstvo. Od trenutka dokazivanja postojanja hepatitis E virusa svinja (Meng et al., 1997), nastala je sumnja da su svinje i ostale životinjske vrste glavni rezervoari virusa. Ubrzo je dokazano da je hepatitis E infekcija i zoonoza, pošto su se u Japanu razboleli ljudi nakon konzumacije nedovoljno termički obrađenih jetri divljih svinja (Yazaki et al., 2003; Takahashi et al., 2004). Potvrđeni su i drugi mnogobrojni načini prenošenja infekcije, putem transfuzije krvi ili vertikalna transmisija sa majke na dete (Muushahwar 2008; Meng et al., 2002; Colson et al., 2007). Mnogobrojni autori ističu podatke o povišenom nivou anti-HEV antitela kod ljudi koji su profesionalno u kontaktu sa svinjama, kao što su veterinarri, uzgajivači svinja, radnici u klanicama i ostale osobe koje su profesionalno izložene kontaktu sa virusom (Meng et al., 2002; Meng et al., 2010; Wilhelm et al., 2011)

Iako su do sada objavljeni podaci o prisustvu HEV infekcije kod svinja u našoj zemlji, veoma malo podataka postoji o HEV infekciji u populaciji ljudi u Srbiji. U našem istraživanju analizirali smo 200 uzoraka krvnih seruma dobrovoljnih davalaca krvi i 94

uzoraka krvi pacijenta Infektivne klinike u Novom Sadu, a testiranja su vršena in-house i komercijalnim ELISA testom.

Primenom *in house* ELISA testa dokazano je prisustvo anti-HEV IgG antitela kod 15% (30/200) dobrovoljnih davalaca krvi, dok anti-HEV antitela nisu detektovana kod trudnica i pacijenata. Rezultati seroprevalencije od 15% kod dobrovoljnih davalaca krvi su slični podacima pilot studije sprovedene u našoj zemlji (Delić i sar., 2003), gde je visoka HEV seroprevalencija (14.4%) detektovana kod različitih rizičnih grupa stanovništva (homoseksualci, prostitutke, intravenski narkomani). Dostupni literaturni podaci o prisustvu hepatitis E infekcije kod dobrovoljnih davalaca krvi ukazuju na velika variranja u broju pozitivnih nalaza. Mnogobrojna ispitivanja u svetu se podudaraju sa našim nalazima. Kontrolom 400 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi u SAD, anti-HEV ustanovljena su kod 18% ljudi (Meng et al., 2002). Thomas i sar. (1997) su kontrolom 300 dobrovoljnih davalaca krvi u SAD detektovali prisustvo anti-HEV antitela kod 21.3% osobe. Kod dobrovoljnih davalaca krvi u Engleskoj ustanovljena seroprevalencija je iznosila 16.2%, u Iranu 11.5%, u Saudiskoj Arabiji 16.9%, u Koreji 11.9%, u Francuskoj 16.6%, u Kini 18% (Bendal et al. 2010; Assarehzadegan et al., 2008; Abdelaal et al., 1998; Ahn et al., 2005; Mansuy et al. 2008; Choi et al., 2003). Sa druge strane, postoje istraživanja u kojima je opisan znatno niži procenat nivoa anti-HEV antitela kod dobrovoljnih davalaca krvi u industrijski razvijenim zemljama. U Španiji je kod dobrovoljnih davalaca krvi ustanovljena seroprevalencija iznosila 2.8%, u Italiji (Sardinija) 5%, u Francuskoj 3.2%, u Švajcarskoj 4,9% (Mateos et al., 1998; Masia et al., 2009; Boutrouille et al. 2007; Kaufman et al., 2011). Iznenađujuće visoka seroprevalencija od 52.5% zabeležena je kod dobrovoljnih davalaca krvi u jugozapadnom delu Francuske, što se može objasniti i navikom lokalnog stanovništva da konzumira nedovoljno termički obrađeno meso i kobasice od sirovog mesa (Mansuy et al., 2011).

Pošto je faza viremije HEV infekcije kratkotrajna, u zemljama koja nisu endemski inficirana područja i gde je veoma mala incidenca pojave akutne faze bolesti, određivanje seroprevalencije kod ljudi je uglavnom zasnovano na serološkim testovima. U rezultatima istraživanja mnogih autora postoje znatna variranja u broju seropozitivnih ljudi u razvijenim zemljama. Uzroci ovih variranja mogu biti različit stepen izloženosti kontaktu sa virusom ili kontakt sa različitim genotipovima virusa, testiranje različitih populacija ljudi i starosnih kategorija, ali i znatne razlike u osetljivosti i specifičnosti pojedinih testova (Bouwknegt et al., 2008; Bendal et al., 2010). Myint i sar. (2006) su uporedno ispitivali serume ljudi sa pet različitih testova i ustanovili da je senzitivnost testova i

detekcija imunološkog odgovora bila veća u slučajevima akutne HEV infekcije u odnosu na asimptomatsku HEV infekciju.

U našim rezultatima nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima ALT enzima kod HEV-IgG pozitivnih i HEV-IgG negativnih davalaca krvi. Vrednosti više od 41 IU/ml (referentna vrednost) su zabeležene kod 36.8% seropozitivnih davalaca i kod 25% seronegativnih davalaca. Ovi podaci potvrđuju da je povećanje nivoa ALT enzima od malog značaja za screening HEV seroprevalencije. Povišen nivo ALT enzima javlja se u veoma kratkom periodu od momenta nastanka infekcije, za vreme pojave kliničkih simptoma bolesti, kada se HEV RNK ne može više detektovati u krvi (Kaufman et al., 2011). Autori Mateos i sar. (1999) su ustanovili HEV seroprevalenciju od 3.4% kod dobrovoljnih davalaca krvi u Španiji, ali vrednosti ALT nisu bile povišene ni kod jedne HEV pozitivne osobe.

U anonimnoj anketi koju smo sprovedeli prilikom sakupljanja uzoraka krvi dobrovoljnih davalaca, 8 osoba se izjasnilo da je bolovalo od hepatitis A virusne infekcije (HAV), ali niti kod jedne osobe nije ustanovljeno prisustvo anti-HEV antitela, niti je ustanovljeno prisustvo HIV, HBV ili HCV markera. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori. U istraživanju sprovedenom među urbanom populacijom u Burundiju, u Africi, nije se mogla potvrditi povezanost u visini seroprevalencije anti-HAV i anti-HAV antitela. Autori su zaključila da, iako se oba virusa prenose fekalno-oralnim putem, patogeneza obe infekcije je potpuno različita (Aubry et al., 1997). Korelacija u broju pozitivnih nalaza anti-HEV i anti-HAV antitela kod ispitanih dobrovoljnih davalaca krvi u Brazilu takođe nije potvrđena (Bortoliero et al., 2006). Slično ovim podacima, i istraživači Mast i sar. (1997) nisu dokazali povezanost ove dve infekcije, što su objasnili pretpostavkom da oba virusa imaju različiti model transmisije i da se razlikuju faktori rizika nastanka oboljenja, što se pre svega odnosi na pojavu HEV infekcije u područjima koja nisu endemski zaražena. Suprotno ovim nalazima, u pojedinim radovima se opisuje povezanost HEV i HAV infekcije (Christensen et al., 2002; Barzilai et al. 1995). U Saudijskoj Arabiji su Abdelaal i sar. (1998) zapazili visoku korelaciju u seroprevalenciji anti-HEV i anti-HCV antitela kod davalaca krvi. Dobrovoljni davaoci krvi kod kojih je potvrđeno postojanje anti-HCV antitela su 5 puta više bili izloženi riziku od mogućnosti nastanka HEV infekcije u odnosu na anti-HCV negativne osobe. Autori Chandra i sar. (2012) su kod pacijenata obolelih od akutnog virusnog hepatitis E u Indiji pronašli mešane infekcije HEV-HAV kod 1.2% obolelih, HEV-HBV kod 6.1% i HEV-HCV kod 1.7% osoba.

Viši nivo anti-HEV antitela ustanovili smo kod osoba starijih od 51 godine (21.5%) u odnosu na osobe od 18-30 godina (5.4%) i od 31 do 50 godina života (14.2%). Dobijeni rezultati su slični objavljenim podacima drugih autora koji navode da su starije osobe više podložne riziku nastajanja infekcije izazvane hepatitis E virusom (Christensen et al., 2002; Christensen et al., 2008; Meng et al., 2002; Boutroille et al., 2007; Dalton et al., 2008b, Lin et al., 2000, Park et al., 2012). Meng i sar. (2002) su kod 39% ispitanih veterinara starijih od 60 godina utvrdili prisustvo anti-HEV antitela u odnosu na 13% seropozitivnih veterinara mlađih od 30 godina. Dobrovoljni davaoci krvi stariji od 40 godina su imali značajno višu seroprevalenciju u odnosu na osobe mlađe od 30 godina (Abdelaal et al., 1998). Meader i sar. (2009) su ustanovili da HEV seroprevalencija raste sa starošću kod populacije farmera u Engleskoj i da su osobe starosti od 51 do 60 godina života podložnije riziku nastanka hepatitis E infekcije.

U našim istraživanjima nije utvrđena značajna razlika poređenjem broja HEV seropozitivnih muškaraca i žena (16.7% prema 14.6%). Do sličnih zaključaka su došli i istraživači Kaufmann i sar. (2011), koji su prisustvo anti-HEV antitela utvrdili kod 5.4% muškaraca i 4.1% žena dobrovoljnih davalaca krvi. I drugi autori naglašavaju da pol nema značajnih uticaja niti je u korelaciju sa pojavom HEV infekcije (Masia et al., 2009; Bortoliero et al., 2006). Međutim, postoje i suprotna mišljenja. Istraživači Assarehzadegan i sar. (2008) su tokom ispitivanja u Iranu ustanovili višu HEV seroprevalenciju kod muških dobrovoljnih davalaca krvi (14.6%) u poređenju sa ženama (5.7%).

Od ukupnog broja dobrovoljnih davalaca krvi, 89% (178/200) osoba potiče iz seoske sredine. Anti-HEV antitela su detektovana samo kod dve osobe iz gradske sredine (9.1%, 2/22), dok je 28 (15.7%, 28/178) seropozitivnih davalaca krvi pripadalo seoskom stanovništvu. Uzrok većem broju serološki pozitivnih osoba među seoskim stanovništvom u našoj zemlji, mogu predstavljati loše higijenske navike, neadekvatno snabdevanje vodom, upotreba sanitarno neispravne vode i korišćenje zagađenih izvora vode za navodnjavanje i napajanje stoke. Istraživači Ceylan i sar. (2003) su zaključili da zagađena voda koja se koristi za navodnjavanje može predstavljati potencijalni izvor HEV infekcije, pošto su anti-HEV antitela detektovana znatno više? češće kod ljudi koji su radili u polju i baštama koje su zalivane zagađenom vodom (34.8%) u odnosu na nisku seroprevalenciju kod kontrolne grupe ljudi (4.4%).

U našem istraživanju nije ustanovljena korelacija između serološki pozitivnih dobrovoljnih davalaca krvi i njihovog kontakta sa domaćim životinjama. Najviše HEV pozitivnih nalaza je zabeleženo kod ljudi koji su u svojim domaćinstvima držali konje

(16.6%, 1/6), a najmanja kod ljudi koji su držali ovce i koze (3.5%, 1/28). Takođe nema statistički značajne razlike u seroprevalenciji između osoba koje se bave rizičnim profesijama, kao što su farmeri, i potencijalno manje rizičnim poslovima, kao što su radnici ili studenti. U populaciji farmera je ustanovljena seroprevalencija iznosila 15% (3/20) a kod radnika 17.7% (16/90). Do sličnih zaključaka došli su Olsen i sar. (2006) koji nisu našli razliku u broju serološki pozitivnih nalaza kod farmera i kontrolne grupe ljudi u Švedskoj (13% prema 9%). U radovima drugih autora se takođe navodi da profesionalna izloženost kontaktu sa životinjama ili posedovanje životinja u domaćinstvu ne predstavlja rizik za nastanak HEV infekcije (Bortoliero e al., 2006; Masia et al., 2009; Stoszek et al., 2005; Meader et al., 2008). Sa druge strane, objavljeni su podaci o povišenom nivou anti-HEV antitela kod veterinaru i farmera koji rade na svinjarskim farmama (Meng et al., 2002; Drobeniuc et al., 2001; Hsieh et al., 1999; Adjei et al., 2010),

In house ELISA testom u populaciji trudnica i pacijenata Infektivne klinike nije ustanovljena nijedna seropozitivna osoba.

Komercijalnim ELISA kitom („*Adaltis*“, Italija) ukupno je pregledano 150 uzoraka (94 krvnih seruma pacijenata i trudnica i 56 seruma dobrovoljnih davalaca krvi). Anti-HEV antitela dokazana su kod jedne trudnice i jednog pacijenta (2.12%, 2/94) i kod 10 dobrovoljnih davalaca krvi (17.86%, 10/56). Rezultati testiranja istih uzoraka dobrovoljnih davalaca krvi *in house* ELISA testom pokazuju da su kod 30 (53.57%, 30/56) osoba detektovana antitela protiv HEV, a nije zabeležen nijedan pozitivan rezultat kod trudnica i pacijenata. Izračunati nivo osetljivosti *in house* i komercijalnog testa je iznosio 0.75 (75%) a specifičnosti 0.847 (84.7%), odnosno kappa analizom je izračunat srednji nivo podudaranja rezultata ($k=0.354$).

Slabija podudarnost *in house* i komercijalnog ELISA testa može se objasniti činjenicom da postoje razlike u antigenu koji se koristi u pomenutim testovima. Osetljivost komercijalnih kitova je slabija u odnosu na nekomercijalne, pošto se u njima najčešće kao antigen koriste fragmenti ORF-2 ili ORF-3 proteina HEV genotip 1 i 2 (što je slučaj i sa testom proizvođača *Adaltis*). Komercijalni testovi zato ne mogu da detektuju HEV genotip 3, koji je najzastupljeniji u industrijalizovanim zemljama Evrope i SAD (Herremans et al., 2007). *In house* ELISA test, koji smo koristili u našim ispitivanjima, dizajniran je tako da detektuje antitela protiv HEV ORF-2 genotip 3 i prethodno je standardizovan Western blot metodom. Senzitivnost testa za ljudske serume je iznosila 100%, a specifičnost 96.4% (Jimenez de Oya et al., 2009). Autori Ghabrah i sar. (1998) su u svom istraživanju

zaključili da su testovi zasnovani na korišćenju ORF-2 antigena senzitivniji od testova koji sadrže HEV ORF-3.

Komercijalnim kitom je detektovan HEV pozitivan serološki nalaz kod jednog pacijenta i jedne trudnice, što nije bio slučaj u *in house* testu. Pozitivni uzorci verovatno u ovom slučaju predstavljaju infekciju HEV genotip 1 ili 2, ali je neophodno izvršiti analizu i drugim metodama da bi se potvrdili dobijeni rezultati.

U literaturi su opisana znatna variranja u senzitivnosti različitih testova za detekciju HEV infekcije kod ljudi. Mast i sar. (1998) su poredili 12 ELISA testova sa ljudskim serumima poznatog nalaza i utvrdili da se rezultati podudaraju u rasponu od 49 do 94%. Poređenjem dva komercijalna ELISA testa za ispitivanje anti-HEV IgG antitela u krvnim serumima ljudi, Park i sar. (2012) su ustanovili da je seroprevalencija dobijena jednim testom iznosila 23.1%, a drugim 14.3%, dok je pozitivan rezultat potvrđen sa oba testa kod samo 12 uzoraka (8.1%). Fix i sar. (2000) tvrde da i serija (lot) pojedinih komercijalnih ELISA kitova može dati različite rezultate kod testiranja istih uzoraka, što objašnjavaju pretpostavkom da i različiti reagensi iz test kita mogu da variraju u svom sastavu.

Svi ispitani dobrovoljni davaoci krvi, kao i rizične grupe trudnica i pacijenata nisu imali simptome kliničke slike HEV infekcije, ali na osnovu pozitivnog serološkog nalaza možemo pretpostaviti da su bili ranije u kontaktu sa virusom. Međutim, dokazano je da se hepatitis E virus može preneti putem transfuzije krvi. Ustanovljen visok nivo anti-HEV antitela kod populacije dobrovoljnih davalaca u našoj zemlji ukazuje na potrebu uvođenja screening testa produkata krvi, koji za sada nije obavezan.

Uporednim ispitivanjem uzoraka krvi svinja i ljudi *in house* i komercijalnim ELISA testom na prisustvo anti-HEV antitela ustanovljene su razlike u osetljivosti i specifičnosti oba testa. Radi tačnog definisanja pozitivnog nalaza koristili smo Western blot metodu.

6.4 Western blot analiza krvnih seruma svinja i ljudi

Sa ciljem da definišemo prisustvo i količinu antitela u uzorcima čije su obračunate ekstinkcije bile blizu cut off vrednosti u *in-house* ELISA testu, primenjena je Western blot metoda. Ukupno je ispitano 11 seruma svinja, od kojih je kod 6 uzoraka potvrđen pozitivan nalaz, i 11 seruma ljudi gde je 7 uzoraka bilo pozitivno.

Western blot je jedna od prvih metoda koja je u upotrebi za dijagnostiku akutne HEV infekcije kod ljudi (Hyams et al., 1992). Nakon toga razvile su se i druge metode, a

za utvrđivanje seroprevalencije najzastupljeniji su danas *in house* i komercijani ELISA kitovi. Pošto je Western blot osjetljiviji od ELISA testa, koristi se kao „zlatni standard“ i potvrdni test za definisanje rezultata sa sumnjivom reakcijom u ELISA testu (de Oya et al., 2009; Herremans et al., 2007). U uslovima niske seroprevalencije u zemljama koje nisu endemska područja, ELISA tehnika nije dovoljna da bi se sa tačnošću utvrdilo prisustvo HEV infekcije u populaciji ljudi. To su dokazali Herremans i sar. (2007), koji su potvrdili pozitivan rezultat Western blot metodom kod samo polovine od ukupno 12 pozitivnih nalaza u ELISA testu. Kombinacija ova dva testa je neophodna da bi se izbegla pojava lažno-pozitivnih rezultata. Ispitivanje seroprevalencije kod svinja u Kanadi upotrebom ELISA testa i Western blot metode kao dodatne tehnike su vršili i Yoo i sar. (2001) i dokazali da se kombinacijom dva testa dobijaju pouzdani rezultati seroprevalencije. Innis i sar. (2002) su dizajnirali sopstveni in-house ELISA test za detekciju HEV infekcije kod ljudi, ali je kao konfirmatorni test poslužila Western blot tehnika.

U WB tehnici koristili smo rekombinatni protein HEV ORF 2 gt 3, koji je proizveden postupkom ekspresije gena u larvama *Trichoplusia ni* insekata u laboratorijskim uslovima i uspešno je upotrebljen i u *in house* ELISA testu i Western blot metodi (de Oya et al., 2009). Chandler i sar. (1999) su takođe proizveli rekombinantni protein ORF 2 koji su koristili za detekciju anti-HEV IgG antitela u ELISA i WB testu. Da bi proverili osjetljivost Western blot tehnike, ispitali su serume sa visokom anti-HEV IgG reaktivnošću sa dva različita rekombinantna proteina-ORF 2 i C2. Protein ORF 2 je dao bolje rezultate kada je u pitanju senzitivnost i detekcija anti-HEV antitela kod ljudi u postinfektivnoj, kovalescentnoj fazi, kao i kod starijih kategorija svinja.

6.5 Detekcija HEV genoma real-time RT- PCR metodom u uzorcima svinja u klanicama

Da bismo ispitali prevalencu hepatitis E virusa kod svinja na liniji klanja, primenili smo one step real time RT- PCR molekularnu metodu. Pregledani su uzorci od 145 životinja (50 prasadi i 95 tovljenika). Od ukupnog broja pregledanih prasadi, kod 32 životinje zabeležen je pozitivan nalaz u najmanje jednom uzorku (64%, 32/50). HEV RNK je najčešće detektovana u fecesu (54%, 27/50), žuči (26%, 13/50), jetri (16%, 8/50) i mesu (10%, 5/50) prasadi. Kod tovljenika je virusni genom ustanovljen u samo 4 uzoraka fecesa

(7.27%), dok ni u jednom uzorku jetre, žuči ili mesa tovljenika nije utvrđeno prisustvo HEV RNK.

U našim rezultatima analiza uzoraka iz klanica pokazala je da se HEV može naći u proizvodima poreklom od svinjskog mesa i u iznutricama. Prisustvo HEV genoma je detektovano češće u uzorcima prasadi starosti oko 2 meseca nego kod odraslih tovljenika, što potvrđuje ranije izneta zapažanja da su mlade životinje podložnije HEV infekciji, naročito nakon gubitka maternalnog imuniteta (Meng et al., 1997).

U fecesu prasadi HEV RNK je dokazana u 54% pregledanih uzoraka, a kod tovljenika u 7.27% uzoraka. Ispitivanjem fecesa odraslih svinja na klanicama u Italiji, autori de Martino i sar. (2009) su dokazali HEV genom u 7.3% uzoraka, što je podatak gotovo identičan našem rezultatu. Takođe, nisku HEV prevalenciju (3%) u fecesima tovljenika na klanicama u Češkoj su utvrdili istraživači di Bartolo i sar. (2010). I drugi autori u svojim rezultatima navode višu HEV prevalenciju u fecesima prasadi, a nižu u fecesima odraslih životinja. Seminati i sar. (2008) su kod prasadi uzrasta 8-10 nedelja ustanovili 100% HEV pozitivnih uzoraka fecesa, a kod tovljenika starosti 22 nedelje svi uzorci fecesa su bili negativni. McCreary i sar. (2008) su u fecesu prasadi uzrasta 10 do 12 nedelja detektovali HEV genom kod 44% uzoraka, a kod svinja od 22 do 24 nedelje u 8.9%. Istraživači Fernandez-Baredo i sar. (2006) su u fecesu prirodno inficiranih prasadi starih 5 do 12 nedelja ustanovili prisustvo HEV RNK u 41% pregledanih uzoraka, a kod odraslih svinja starosti 13 do 20 nedelja samo u 5% uzoraka.

Rezultati RT-PCR analize u našem istraživanju pokazali su da je HEV genom češće detektovan u žuči (26%) u odnosu na jetru i meso (16%, odnosno 10%) prasadi. Halbur i sar. (2001) su prilikom eksperimentalne infekcije svinja, prisustvo hepatitis E virusa tokom dužeg vremenskog perioda i u većoj koncentraciji dokazali u žuči u odnosu na prisustvo u jetri. Autori zaključuju da, iako jetra predstavlja glavni organ replikacije virusa, infekcija je često fokalnog karaktera, što smanjuje mogućnost da se odabere pozitivan deo uzorka za analizu. To, međutim, nije slučaj i sa žuči, kod koje je virus ravnomerno raspoređen. Vasickova i sar. (2009) su pregledom 32 praseta, HEV RNK najčešće detektovali u žuči (40.0%) a manje u jetri (16.1%). Na klanicama u Italiji su Di Bartolo i sar. (2011) dokazali veću HEV prevalenciju kod prasadi uzrasta 3-4 meseca u odnosu na tovljenike od 9-10 meseci (95.0% prema 42.9%), a prisustvo HEV genoma je češće dokazano u žuči (51.1%) u odnosu na jetru (20.8%).

Interesantan je podatak, koji treba naglasiti, da smo pregledom prasećeg mesa ustanovili pozitivan nalaz u 10% uzoraka. Veoma mali broj istraživača se bavio

problematikom prisustva HEV u mesu, a prema našim saznanjima, ne postoje podaci o dokazu HEV RNK u prasećem mesu na klanicama.

U uzorcima jetre, mesa i žuči tovljenika na klanicama nismo dokazali prisustvo HEV RNK. Leblanc i sar. (2010), kao i Berto i sar. (2012) pregledom mesa tovljenika na klanicama nisu pronašli nijedan pozitivan uzorak. U klanicama u Češkoj je u 3% uzoraka mesa tovljenika dokazano prisustvo HEV RNK (Bartolo et al., 2012). U literaturi su navedeni podaci o broju HEV pozitivnih jetri na klanicama koji se kretao od 3% do 20.9% (di Bartolo et al., 2012; Leblanc et al., 2010; Berto et al., 2012, Casas et al., 2011; Li et al., 2009). Osim klanica, postoje i brojni nalazi prisustva HEV genoma u uzorkovanim jetrama u mesarama i hipermarketima. U Japanu je HEV RNK detektovana u 1,9% uzoraka, u 6% uzoraka pregledanih paketa u Holandiji, u 11% uzoraka u SAD, u 0.83% uzoraka jetri svinja iz supermarketa u Indiji (Yazaki et al., 2003; Bouwknegt et al., 2007; Feagins et al., 2007; Kulkarni and Arankalle, 2008). HEV RNK je dokazana i u uzorcima žuči na klanicama, a procenat pozitivnih uzoraka se kretao od 0.84 pa čak do 51.1% (di Bartolo et al., 2011; dos Santos et al., 2011.; Gardinali et al., 2012)

Istraživači Bouwknegt i sar. (2009) su eksperimentalno inficirali svinje i dokazali HEV RNK u 50% uzoraka mesa. Hepatitis E virus se mogao detektovati u muskulaturi najduže do 4 nedelje posle pojave prve fekalne ekskrecije virusa. Autori naglašavaju da zaraženo meso tovljenika može ući u lanac ishrane kada infekcija nastane kasnije u toku tova. Takođe, detekcija hepatitis E virusa u mesu odraslih tovljenika može biti otežana, pošto je koncentracija virusa niža nego u drugim organima. Ovo je možda razlog što u uzorcima mesa tovljenika nismo uspeli da dokažemo prisustvo HEV RNK. Ipak, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su meso i jetre tovljenika potpuno bezbedni za ishranu. Prisustvo HEV RNK u fecesu tovljenika predstavlja potencijalnu opasnost da prilikom obrade polutki može doći do kontaminacije iznutrica i mesa putem zaražene opreme ili preko ruku radnika na liniji klanja (Vulcano et al., 2007, Galiana et al., 2008).

6.6 Utvrđivanje epidemiloške povezanosti između infekcija kod svinja i ljudi

Hepatitis E infekcija je široko rasprostranjen u populaciji svinja u svetu (Pavio et al., 2010) i u Srbiji (Lupulović et al., 2010; Petrovic et al., 2008). HEV je dokazana zoonoza., a u literaturi je opisano nekoliko slučajeva akutnog hepatitisa E kod ljudi koji su konzumirali zaraženo sirovo meso jelena i sirovo meso i jetre domaćih i divljih svinja (Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003; Yazaki et al., 2003; Li et al., 2005).

Na osnovu podataka iz 2011 godine, ukupan broj svinja u Srbiji je iznosio 3.287.000, a od tog broja u Vojvodini je uzgajano 1.289.000 svinja. Prošle godine je proizvedeno je 252.000t svinjskog mesa i 25.000 jestivih iznutrica (Statistički godišnjak Srbije 2012). U Srbiji svinjarsvo čini 29.5% ukupne stočarske proizvodnje, asvinjsko meso je najzastupljenije u ishrani stanovništva sa 58%. Tržište svinjskog mesa karakteriše velika potražnja za prasećim mesom, koje učestvuje u ukupnoj potrošnji svinjskog mesa sa 41% (Popović i sar, 2010). Međutim, najznačajniji uzgoj prasadi se i dalje obavlja na malim, individualnim gazdinstvima, a manjim delom na farmama. Prasad, kod kojih smo u uzorcima fecesa i tkiva utvrdili prisustvo HEV RNK (u uzorcima mesa 10%, a u jetrama 16%) su poticali iz individualnih gazdinstava. Izneti podaci su značajni sa stanovišta higijene, kontrole i analize rizika stavljanja u promet prasećeg mesa i iznutrica. Istraživanja je potrebno nastaviti u pravcu genotipizacije i filogenetske analize HEV izolata kod svinja i ljudi, kao i utvrditi homolognu sličnost dobijenih sekvenci.

6.7 Patohistološko i imunohistohemijsko ispitivanje jetri svinja

Patohistološka analiza i imunohistohemijsko bojenje je vršeno u 26 uzoraka jetri prasadi uzorkovanih sa linije klanja kod kojih je prethodno dokazano prisutvo genoma hepatitis E virusa u jetri, žuči i mesu. U 3 uzorka (11,53%) jetri prasadi mikroskopskim pregledom je ustanovljena blaga infiltracija limfocita, plazma ćelija i makrofaga u portalnim prostorima jetre. Nisu dokazane nekrotične promene a ćelijska struktura hepatocita je bila nepromenjena. Sve navedene promene odgovaraju blagom virusnom hepatitisu. Makroskopskim pregledom nisu zabeležene značajnije promene na jetri. Imunohistohemijskom analizom nije dokazano prisustvo HEV antigena u citoplazmi hepatocita.

Iako se blaga infiltracija limfocita u sinusoidnim prostorima hepatocita i pojava retkih nekrotičnih polja može smatrati i normalnim nalazom u jetri svinja (Halbor et al. 2001), blage do srednje histopatološke promene i povećanje mononuklearnog infiltrata u portalnom predelu koje smo zapazili u uzorcima jetri prasadi u našem istraživanju, odgovaraju II stepenu lezija, koje su takođe kao nalaz opisali istraživači de Deus i sar. (2008). I drugi istraživači kao najučestalije promene u jetri HEV inficiranih svinja navode promene sa limfoplazmacističnom inflamacijom koje odgovaraju blagom obliku hepatitisa (Lee et al. 2009; Meng et al. 1997).

Samo u nekolicini radova se navodi uspešna detekcija HEV antigena u citoplazmi hepatocita imunohistohemijskom metodom. Autori Ha i Chae (2004) su na osnovu pozitivnog RT-PCR nalaza odabrali 30 uzoraka jetri svinja. U parafinskim odseccima su dobili tipično tamno prebojavanje citoplazme, odnosno pozitivan imunohistohemijski signal. Johne i sar. (2010) su dokazali HEV antigen imunohistohemijskom metodom u jetri inficiranih pacova. Akutni oblik hepatitis E infekcije kod ljudi su ispitivali Gupta i sar. (2012). Pregledom 30 uzoraka jetri sakupljenih *post mortem*, ustanovili su hepatičnu nekrozu, a u zaraženim ćelijama je došlo do tamnog prebojavanja citoplazme što je predstavljalo pozitivan IHC signal. Osim ovih radova, nema dostupnih literaturnih podataka o uspešnoj imunohistohemijskoj detekciji HEV antigena u jetrama svinja ili ljudi. Međutim, imunohistohemijska metoda nije metoda izbora kada je u pitanju dijagnostikovanje hepatitis E infekcije. Virus se u jetri zadržava kratko vreme, i to samo u periodu inkubacije, i ubrzo se eliminiše iz organizma, tako da se i virusni markeri kratkotrajno mogu detektovati (Lee et al., 2007). Molekularne metode dijagnostike i serološke metode su mnogo osetljivije, naročito kada je u pitanju ispitivanje stepana zaraženosti zapata svinja ili seroprevalencija kod ljudi. Osim toga, poteškoću za IHC ispitivanje HEV antigena u jetrama svinja predstavlja i problem nepostojanja anti-svijskih antitela koja se koriste u postupku bojenja, već su u upotrebi anti-ljudska antitela, što svakako utiče na osetljivost metode i pojavu nespecifičnih reakcija.

Dokaz prisustva hepatitis E virusa kod svinja na farmama kao i u klanicama, u prasećem mesu i jetrama namenjenih za ishranu ljudi, je značajan podatak na osnovu kojeg možemo zaključiti da postoji rizik za javno zdravlje. Kriterijumi za inspeksijski pregled na klanicama su zasnovani pre svega na vizelnoj analizi. U slučaju hepatitis E infekcije, to nije dovoljno, pošto inficirane životinje ne pokazuju kliničke znake bolesti niti promene na unutrašnjim organima, koje bi se mogle zapaziti na liniji (Dos Santos et al., 2011). Preporučuje se pravilna termička obrada mesa i iznutrica pre upotrebe, uz strogo sprovođenje sanitarno-higijenskih mera. Za sada ne postoji zakonska regulativa kojom se zabranjuje trgovina životinjama inficiranim HEV virusom ili zabrana stavljanja mesa i iznutrica u promet. Za kontrolu ove bolesti potrebno je sprovesti redovnu epizootičku analizu i uvesti zakonsku regulativu za kontrolu i nadzor HEV infekcije.

7. ZAKLJUČCI

1. Primenom seroloških testova - nekomercijalni (*in house*) i komercijalni ELISA test dokazana su specifična antitela protiv antigena hepatitis E virusa kod svinja na sve tri ispitujuće farme na teritoriji Južne Bačke i Srema.
2. Utvrđena seroprevalencija *in house* ELISA testom na farmi A je iznosila 37%, na farmi B 31% i na farmi C 54%. Broj seropozitivnih životinja po uzgojnim kategorijama se kretao od 0 do 85%. Komercijalnim ELISA testom ustanovljena je seroprevalencija od 40% na farmi A, na farmi B 41% i na farmi C 65%, a broj seropozitivnih životinja po uzgojnim kategorijama se kretao od 0 do 100%.
3. Uporednom analizom prisustva specifičnih antitela protiv HEV u uzorcima na sve tri farme, *in house* ELISA metodom ustanovljena je prosečna seroprevalencija od 40,66%, a komercijalnim ELISA testom 48,66%.
4. Statističkom analizom primenom *Kappa* testa, poređenjem *in house* i komercijalnog ELISA testa za krvne serume svinja izračunata je vrednost $\kappa = 0,771$, što predstavlja skoro idealno podudaranje poređenih testova.
5. Ustanovljena seroprevalencija kod dobrovoljnih davalaca krvi *in house* ELISA testom iznosila je 15%. Seroprevalencija je rasla sa starošću, a nije ustanovljena statistički značajna razlika u odnosu na pol ispitanika, mesto stanovanja ili zanimanje. Ispitani uzorci trudnica i pacijenata su bili seronegativni.
6. Statističkom analizom primenom *Kappa* testa, poređenjem *in house* i komercijalnog ELISA testa za odabrane uzorke krvnih seruma dobrovoljnih davalaca krvi na osnovu rezultata *in house* ELISA testa, kao i pacijenata i trudnica, izračunata je vrednost $k=0,354$, što predstavlja srednji nivo podudaranja poređenih testova.

7. Western blot analizom pozitivan nalaz je ustanovljen kod 6 od ukupno 11 pregledanih uzoraka krvnih seruma svinja sa OD vrednostima blizu *cut off* vrednosti u *in house* ELISA testu. Od ukupno 11 pregledanih uzoraka krvnih seruma ljudi, pozitivan nalaz je potvrđen kod 7 uzoraka.
8. Primenom real-time RT-PCR metode, HEV RNK je detektovana u fecesu (54%), žuči (26%), jetri (16%) i mesu (10%) prasadi na klanicama. U kategoriji tovljenika, HEV RNK je dokazana samo u fecesu (7,27%), a HEV genom nije potvrđen niti u jednom uzorku jetre, žuči ili mesa.
9. Patohistološkim pregledom 26 uzoraka jetri prasadi sa pozitivnim RT-PCR nalazom, kod 3 uzorka (11,53%) utvrđene su mikroskopske promene koje odgovaraju nespecifičnom hepatitisu sa lezijama II stepena. Imunohistohemijskom analizom nije dokazano prisustvo antigena hepatitis E virusa.
10. Na osnovu iznetih rezultata ispitivanja definisan je predlog laboratorijskog protokola za dijagnostiku hepatitis E infekcije kod svinja, u uzorcima mesa i jetri svinja u klanicama, kao i kod dobrovoljnih davalaca krvi.
11. Na osnovu nalaza HEV RNK u jetrama i mesu prasadi može se zaključiti da postoji zoonotski potencijal HEV infekcije. Istraživanja je potrebno nastaviti u pravcu genotipizacije i filogenetske analize HEV izolata kod svinja i ljudi, kao i utvrditi sličnosti i razlike dobijenih sekvenci međusobnim poređenjem.

8. LITERATURA

1. Abdelaal M, Zawawi TH, al Sobhi E, Jeje O, Gilpin C, Kinsara A, et al. Epidemiology of hepatitis E virus in male blood donors in Jeddah, Saudi Arabia. *Ir J Med Sci*; 167 94-6, 1998.
2. Adjei A. A, Tettey Y, Aviyase J.T, Adu-Gyamfi C, Mingle J.A, Nartey T.E: Unexpected elevated alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase levels and hepatitis E virus infection among persons who work with pigs in Accra, Ghana; *Virology Journal*, 7:336, 2010.
3. Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G: High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet. Microbiol.* 139 270-273, 2009.
4. Aggarwal R. and Jameel S.: Hepatitis E, *Hepatology* Volume 54, Issue 6, 2011.
5. Agunos, A.C., Yoo, D., Youssef, S.A., Ran, D., Binnington, B., Hunter, D.B.: Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario. *Avian Pathol.*, 29:4 35, 404-412, 2006.
6. Ahn JM, Kang SG, Lee DY, Shin SJ, Yoo HS: Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. *J Clin Microbiol.*, 43:3042–3048, 2005.
7. Ahn, J.M., Rayamajhi, N., Gyun Kang, S. and Sang Yoo, H.: Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum, *Diagn Microbiol Infect Dis* 56, 269–274, 2006.
8. Anderson D.A., Shrestha I.L.: *Clinical Virology, Hepatitis E virus*. 2nd ed. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 2002. *Ann Hepatol*, 5:231-236, 2006.
9. Anita A. and Savuta G.: New possibilities of detection of swine hepatitis E infection; *Lucrari scientifiche medicina veterinaria* vol. XLV (3), 2012, Timisoara

10. Arankalle V.A., Joshi M.V., Kulkarni A.M., Gandhe S.S., Chobe L.P., Rautmare S.S., Mishra A.C., Padbidri V.S.: Prevalence of anti-HEV antibodies in different Indian animal species. *Journal of Viral Hepatitis*, 8, 223–227, 2001.
11. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS et al.: Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *Journal of Infectious Diseases* 171, 447–450, 1995.
12. Asimoula S., Tzika E., Alexopoulos, C.; Kyriakis, S. C.; Froesner, G.: First report of serological evidence of hepatitis E virus infection in swine in northern Greece, *Acta Veterinaria*, Vol. 59 Issue 2/3, p205, 2009.
13. Assarehzadegan MA, Shakerinejad G, Amini A, Rezaee SAR. Seroprevalence of hepatitis E virus in blood donors in Khuzestan Province, Southwest Iran. *International Journal of Infectious Diseases*, 2007.
14. Aubry, P.; Niel, L.; Niyongabo, T.; Kerguelen, S. and Larouze, B. - Seroprevalence of hepatitis E virus in an adult urban population from Burundi. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 57: 272-273, 1997.
15. Bächlein C, Grummer B.: Hepatitis E-a new zoonotic disease in Germany?, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*; 123(5-6):198-204, 2010.
16. Baechlein C., Schielke A., Reimar J., Rainer G.U. , Baumgaertner W., Grummer B.: Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays, *Vet Microbiol.*; 144(1-2):187-9, 2010.
17. Balayan M. S., Andzhaparidze A. G., Savinskaya S. S., Ketiladze E. S., Braginsky D. M., Savinov A. P., Poleschuk V. F.: Evidence for virus in non-A/non-B hepatitis transmitted via the faecal-oral route. *Intervirology*, 20, 23–31, 1983.
18. Balayan, M. S., Usmanov, R. K., Zamiatina, N. A., Dzhumalieva, D. I., Karas, F. R.: Experimental hepatitis E in domestic piglets. *Journal of Medical Virology* 32, 58-59., 1990.
19. Barzilai A, Schulman S, Karenyi YV. et al. Hepatitis E virus infection in haemophiliacs. *J Med Virol.*, 46:153–156, 1995.
20. Batts W, Yun S, Hedrick R, et al.: A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*), *Virus Res.*, 158 , pp. 116–123, 2011.
21. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 82:99–805, 2010.

22. Berto A, Mesquita JR, Hakze-van der Honing R, Nascimento MS, van der Poel WH. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus in Domestic Pigs of Different Ages in Portugal, *Zoonoses Public Health.*; 59(7):477-481, 2012.
23. Berto A., Martelli F., Grierson S and Bancs M.: Hepatitis E Virus in Pork Food Chain, United Kingdom, 2009–2010, *Emerg Infect Dis.*; 18(8): 1358–1360, August 2012.
24. Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S.K., Acharya, S.K.: A 20 year single centre experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* 48, 1577–1585, 2008.
25. Billam, P., Huang, F. F., Sun, Z. F., Pierson, F. W., Duncan, R. B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E. & Meng, X. J.: Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J Virol* 79, 3429–3437, 2005.
26. Blacksell SD, Myint KS, Khounsy S, Phruaravanh M, Mammen MP, Jr., Day NP, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs: implications for human infections in village-based subsistence pig farming in the Lao PDR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 101(3):305-7, 2007.
27. Bortolierio AL, Bonametti AM, Morimoto HK, Matsuo T, Reiche EM : Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Parana Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 48(2):87-92, 2006.
28. Bosch A.: *Human Viruses in Water* , Volume 17, Pages 1-299, 2007.
29. Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Cruciere C, Pavio N. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol.*;45:2009–10, 2007.
30. Bouwknegt M, Engel B, Herremans MMPT, Widdowson MA, Worm HC, Koopmans MPG, et al.: Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect*; 136(4):567-76, 2008.
31. Bouwknegt M, Lodder-Verschuur F, van der Poel WH, Rutjes SA, de Roda Husman AM: Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands, *J. Food Prot.*, 70:2889–2895, 2007.
32. Bouwknegt M., Rutjes S.A., Reusken C.B.E.M., Stockhofe-Zurwieden N., Frankena K., de Jong M.C.M., de Roda Husman, A.M., van der Poel, W.H.M.: The

- course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Veterinary Research* 5 (7), 1–12, 2009.
33. Boxall E., et al.: Transfusion-transmitted hepatitis E in a ‘nonhyperendemic’ country. *Transfus. Med.* 16:79–83, 2006.
 34. Bradley, D.W. : Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Brit. Med. Bull.*, 46, 442-461, 1990.
 35. Breum, S.O.; Hjulsager C.K.; de Deus, N.; Segales, J. and Larsen, L.E.: Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population, *Vet Microbiol*, Volume 146, p. 144-149, 2010.
 36. Buti M, Cabrera C, Jardi R, Castells L, Esteban R Are recipients of solid organ transplantation a high-risk population for hepatitis E virus infection? *Liver Transpl.* 2010;
 37. Cacopardo B., Russo R., Preiser W., Benanti F., Brancati G., Nunnari A.: Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980–1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* 25, 313–316, 1997.
 38. Caron, M., Enouf, V., Than, S. C., Dellamonica, L., Buisson, Y. and Nicand, E.: Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 44, 3440–3442, 2006.
 39. Casas M, Cortes R, Pina S, Peralta B, Allepuz A, Cortey M, Casal J, Martin M: Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol*;148(1):27-34, 2011.
 40. Casas M, Pujols J, Rosell R, et al. Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *Vet Microbiol.*; 135:248–252., 2009
 41. Ceylan A, Ertem M, Ilcin E, Ozekinci T. A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol. Infect.*,131:753-56, 2003.
 42. Chandler, J. D., M. A. Riddell, F. Li, R. J. Love, and D. A. Anderson: Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.* 68:95-105, 1999.
 43. Chandra NS, Rai RR and Malhotra B: Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Virus in North-West India, *Hepatitis Research and Treatment*, Volume 2012, 2012.
 44. Chandra V, Taneja S, Kalia M and Jameel S.:Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus; *J. Biosci.* 33 451–464, 2008.

45. Chauhan A., Jameel S., Dilawari J.B., Chawla Y.K., Kaur U., Ganguly N.K.: Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet*, 341, 149–150, 1993.
46. Choi, C., Chae, C.: Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *Journal of Hepatology* 38, 827–832, 2003.
47. Christensen PB, Engle RE, Hjort C, et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis.*;47:XX–XX, 2008.
48. Christensen PB, Engle RE, Jacobsen SE, Krarup HB, Georgsen J, Purcell RH. High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users. *J Med Virol*; 66:49–55, 2002.
49. Clayson E. T., Myint K. S., Snitbhan R., Vaughn D. W., Innis B. L., Chan L., Cheung P., Shrestha M. P.: Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis.*, 172:927-933., 1995.
50. Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., Girones, R.: Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerging Infectious Diseases* 9, 448–454., 2003. *Clin Microbiol*, 43:3042-3048, 2005.
51. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, et al.: Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 15;202(6): 825–34, 2010.
52. Colson P. et al.: Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13:648–649, 2007.
53. Dalton HR, Fellows HJ, Gane EJ, Wong P, Gerred S, et al.: Hepatitis E in New Zealand. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 1236–1240, 2007.
54. Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, Hazeldine S, Remnarace R, et al.: Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20: 784–790, 2008b.
55. Dawson, G. J., Chau, K. H., Cabal, C. M., Yarbough, P. O., Reyes, G. R. and Mushahwar, I. K.: Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *Journal of Virological Methods* 38, 175–186, 1992.

56. De Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D, et al. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol*; 129(1-2):163-70, 2008.
57. de Deus N., M. Casas, B. Peralta, M. Nofrarias, S. Pina, M. Martin, J. Segales: Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm, *Vet. Microbiol.*, 132, pp. 19–28, 2008.
58. de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martin, M., Segales, J.: Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 119, 105-305, 2007.
59. de Oya N., de Blas I., Belén Blázquez A., Martín-Acebes M., Halaihel N., Gironés O., Saiz J.C. and Escribano-Romero E: Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds, *BMC Res Notes*; 4: 412, 2011.
60. Delić, D., Nešić, Z.I., Žerjav, S.B., Pešić, I., Popović, N., Simonović, J.: Hepatitis E virusna infekcija u Srbiji: epidemiologija i klinička slika. *Archives of Gastroenterohepatology*, vol. 22, br. 3-4, str. 53-56, 2003.
61. Di Bartolo I, Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F. M. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol* 132, 47–55, 2008.
62. Di Bartolo I, Valcarce MD, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknecht M, Lázaro DR, Pavlik I and Ruggeri FM: Hepatitis E Virus in Pork Production Chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010, *Emerg Infect Dis*, Volume 18, August 2012.
63. Dos Santos DRL, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA 2011. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* 149: 236-241.
64. Drobeniuc J., Favorov M. O., Shapiro C. N.: Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184, 1594–1597, 2001.
65. Emerson, S. U. and Purcell, R. H. : Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13, 145–154., 2003.
66. Emerson, S. U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.-J., Purdy, M., Schlauder, G. G. and Tsarev, S. A.: Genus Hepevirus. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 853–857. Edited by C. M.

- Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press, 2004.
67. Emerson, S. U., Arankalle, V. A. and Purcell, R. H.: Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 192, 930–933, 2005.
 68. Engle, R. E., Yu, C., Emerson, S. U., Meng, X. J. and Purcell, R. H.: Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40, 4576–4580, 2002.
 69. Enouf, V., Dos Reis, G., Guthmann, J.P., Guerin, P.J., Caron, M., Marechal, V. and Nicand, E.: Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol* 78, 1076–1082, 2006.
 70. Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, Childs JE, Margolis HS.: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis* 181:449–455, 2000.
 71. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ: Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*. 88:912–917, 2007.
 72. Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ.: Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology* 80:1379-1386, 2008.
 73. Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.-J.: Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *International Journal of Food Microbiology* 123, 32–37, 2008.
 74. Feng R, Zhao C, Li M, et al.: Infection dynamics of hepatitis E virus in naturally infected pigs in a Chinese farrow-to-finish farm *Infect Genet Evol*; 11(7) :1727-31, Oct 2011
 75. Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M.T., Perez-Gracia, M.T.: Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 462–465, 2006.
 76. Fix AD, Abdel-Hamid M, Purcell RH, Shehata MH, Abdel-Aziz F, Mikhail N, el Sebai H, Nafeh M, Habib M, Arthur RR, Emerson S, Strickland GT.: Prevalence of

- antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg.*;62:519–523, 2000.
77. Fogeda M., Avellón A., Cilla C. G. and Echevarría J. M.: Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol* 81, 1743–1749, 2009.
 78. Forgach P, Nowotny N, Erdelyi K, Boncz A, Zentai J, Szucs G, Reuter G, Bakonyi T: Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet Microbiol* 143, 106–116, 2010.
 79. Forgach P., Bakonyi T., Deutz A., Nowotny N.: Prevalence of Hepatitis E virus antibodies in occupational groups with different exposure to swine, HEV-IMED-2007.
 80. Galiana C, Fernandez-Barredo S, Garcia A, Gomez MT, Perez-Garcia MT 2008: Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 78: 1012-1015, 2008.
 81. Garavenko O, Obriadina A, Meng J et al. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand, *J Med Virol*; 65: 525–529, 2001.
 82. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA: Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil; *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;107(7):935-9, 2012.
 83. Ghabrah T.M., Tsarev S.A., Yarbough P.O., Emerson S.U., Strickland G.T., Purcell R.H.: Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*, 55, 134–137, 1998.
 84. Goldsmith, R., Yarbough, P. O., Reyes, G. R., Fry, K. E., Gabor, K. A., Kamel, M., Zakaria, S., Amer, S. and Gaffar, Y.: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 339, 328±331, 1992.
 85. Guimaraes F, Saddi T, Vitral C, Pinto M, Gaspar A, Souto F : Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, Central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:223-226., 2006.
 86. Guo QS, Yan Q, Xiong JH, Ge SX, Shih JW, Ng MH, *et al.* Prevalence of hepatitis E virus in Chinese blood donors. *J Clin Microbiol*, 48:317-8, 2010.
 87. Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belak S and Widen F: Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer; *J. Virol. Methods* 146, 226–235, 2007.

88. Ha, S.-K., Chae, C.: Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *Journal of Viral Hepatitis* 11, 263–267, 2004.
89. Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*;15:1225-8, 2009.
90. Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS ONE*, 6:e22673, 2011.
91. Halac U, Béland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, Houde A, Alvarez F: Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation; *Gut*; 61:597-603, 2012.
92. Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H.: Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human, *J. Clin. Microbiol.*, 39:918–923, 2001.
93. Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. & Meng, X. J.: Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 82, 2449–2462, 2001.
94. He J, Innis BL, Shrestha MP, Clayson ET, Scott RM, Linthicum KJ, Musser GG, Gigliotti SC, Binn LN, Kuschner RA, Vaughn DW: Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal, *J Clin Microbiol.*;40(12):4493-8, 2002.
95. He, S., J. Miao, Z. Zheng, T. Wu, M. Xie, M. Tang, J. Zhang, M. H. Ng, and N. Xia.: Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.*, 89:245-249, 2008.
96. Herremans M, Vennema H, Bakker J, Van der Veer B, Duizer E, Benne CA, Waar K, Hendriks B, Schneeberger P, Blaauw G, Kooiman M, Koopmans MP.: Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat* 14:140–146, 2007.
97. Hsieh, S. Y., Meng, X. J., Wu, Y. H., Liu, S. T., Tam, A. W., Lin, D. Y. & Liaw, Y. F.: Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37, 3828–3834, 1999.
98. Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S., Pierson, F. W., Toth, T. E. and Meng, X. J.: Detection by RTPCR and genetic

- characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the U. S. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1326–1332, 2002.
99. Huang, F. F., Sun, Z. F., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Shivaprasad, H. L., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J.: Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85, 1609–1618, 2004.
 100. Jimenez de Oya N., Galindo I., Escribano-Romero E., Blazquez A.B., Alonso-Padilla J., Halaihel N.: Expression and immunoreactivities of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 open reading frame-2 (ORF-2) recombinant proteins expressed in insect cells. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 77–84, 2009a.
 101. Jimenez de Oya, N., Galindo, I., Girone's, O., Duizer, E., Escribano, J.M., & Saiz, J. C.: Serological immunoassay for detection of hepatitis E virus on the basis of genotype 3 open reading frame 2 recombinant proteins produced in *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3276–3282, 2009b.
 102. Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol*;91:750–8, 2010.
 103. Johne, R., Plenge-Bönig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J. & Schielke, A.: Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91, 750–758, 2010.
 104. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR.: A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65–7, 2006.
 105. Kaba, M., B. Davoust, J. L. Marie, M. Barthelet, M. Henry, C. Tamalet, D. Raoult, and P. Colson. : Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *J Med Virol* 81:1750-9, 2009.
 106. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis e virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*;140:1481-9, 2011c.
 107. Kamili S.: Toward the development of a hepatitis E vaccine, *Virus Research* 161, 93– 100, 2011.

108. Kanai Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.*;82(1):69–76, 2010.
109. Kar, P., Jilani, N., Husain, S.A., Pasha, S.T., Anand, R., Rai, A., Das, B.C.: Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2495–250, 2008.
110. Karetnyi, Y. V., Dzhumaliev D. I., Usmanov, R. K., Titova, I. P., Lituak, Y. A. & Balayan, M. S. : Possible involvement of rodents in the spread of hepatitis E (in Russian). *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology* 41, 52-56, 1993.
111. Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng X.J., Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus, *Can. J. Vet. Res.*, 67:303–306, 2003.
112. Kasorndorkbua, C., Thomas, P. J., Halbur, P. G., Guenette, D. K., Huang, F. F. & Meng, X.-J.: Infection of pigs with avian hepatitis E virus (HEV). . <http://www.ans.iastate.edu/report/air/2005/pdf/1982.pdf>, 2005.
113. Kaufmann A, Kenfak-Foguena A, Andre C, Canellini G, Burgisser P, et al.: Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PloS one* 6: e21150, 2011.
114. Khudyakov Y.E., Lopareva E.N., Jue D.L., Crews T.K., Thyagarajan S.P., Fields H.A.: Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2863–287, 1999.
115. Khuroo, M.S., Teli, M.R., Skidmore, S., Sofi, M.A., Khuroo, M.: Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am. J. Med.* 70, 252–255, 1981.
116. Kondili LA, Chionne P, Porcaro A, Madona E, Taffon S, Resuli B, Taliani G, Rapicetta M.: Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) antibody and the possible association with chronic liver disease: A case-control study in Albania. *Epidemiol Infect* 134:95–101, 2006.
117. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, et al: Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: Delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses; *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8259–8263, 1992

118. Krawczynski K., Bradley D.W.: Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *Journal of Infectious Diseases* 159, 1042–1049, 1989.
119. Kulkarni M.A. and Arankalle V.A.: The Detection and Characterization of Hepatitis E Virus in Pig Livers From Retail Markets of India, *Journal of Medical Virology* 80:1387–1390, 2008.
120. Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B. & Murthy, N. S.: Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 85, 240–244, 2004.
121. Kumar, R. M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J. K., Usmani, A. & Thomas, L.: Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100, 9–15, 2001.
122. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685, 1970.
123. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A: Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol* 139:206–209, 2010.
124. Lee, S.H., Kang, S.C., Kim, D.Y., Bae, J.H., Kim, J.H.: Detection of swine hepatitis E virus in the porcine hepatic lesion in Jeju Island. *Journal of Veterinary Science* 8, 51–55, 2007.
125. Lee, Y.H., Ha, Y., Ahn, K.K., Chae, C.: Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Veterinary Journal* 179, 417–421, 2009.
126. Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*; 23:2893–901, 2005a.
127. Li T.-C., Chijiwa K., Sera N.: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11, 1958–1960, 2005.
128. Li TC., Yakamawa Y., Suzuki K., Tatsumi M., Razak M.A., Uchida T., Takeda N., Miyamura T.: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *Journal of Virology*, 71, 7207–7213, 1997.
129. Li TC, Suzuki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine*; 22:370–7, 2004.

- 130.** Li W, She R, Wei H, Zhao J, Wang Y, et al.: Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* 133: 75–83, 2009.
- 131.** Li F., Zhuang H., Kolivas S., Locarnini S. and Anderson D.: Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by western immunoblot using open reading frame 2 and 3 and glutathione S-transferase fusion proteins. *Journal of Clinical Microbiology* 32,2060±2066, 1994.
- 132.** Li T.-C., Chijiwa K., Sera N. and 8 other authors: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat, *Emerg Infect Dis* 11, 1958–1960, 2005.
- 133.** Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, Wang SC, Huang YH, Chang FY, Lee SD: Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol.*;38(11):3915–8, 2000.
- 134.** Lu L, Li C, Hagedorn CH: Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.*;16:5–36, 2006.
- 135.** Lu L., Drobeniuc J., Kobylnikov N., Usmanov R.K., Robertson B.H., Favorov M. O., Margolis H. S.: Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J Med Virol* 74, 556–562, 2004.
- 136.** Lupulovic D, Lazic S, Prodanov-Radulovic J, de Oya NJ, Escribano-Romero E, Saiz JC: First serological study of hepatitis E virus infection in backyard pigs from Serbia. *Food Environ Virol.*, 2010.
- 137.** Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J.: Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74:419–424, 2004a.
- 138.** Marek A, Bilic I, Prokofieva I, Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes, *Veterinary Microbiology*, 145, pp. 54–61, 2010.
- 139.** Martin, M., Segales, J., Huang, F.F., Guenette, D.K., Mateu, E., de Deus, N., Meng, X.J.: Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol* 122, 16-24, 2007.

140. Martinelli, N., Luppi A, Cordioli, P., Lombardi G. and Lavazza A.: Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs in Northern Italy , *Infection Ecology and Epidemiology*, 1: 7331 - DOI: 10.3402/iee.v1i0.7331, 2011.
141. Masia G., Orrù G., Liciardi M., Desogus G., Coppola R. C., Murru V., Argiolas M., Orrù G.: Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy. *J Prev Med Hyg* 50, 227–231, 2009.
142. Mast, E. E., Alter, M. J., Holland, P. V. and Purcell, R. H.:Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. *Hepatology* 27, 857–861, 1998.
143. Mast, E. E., Kuramoto, I. K., Favorov, M. O., Sehocning, V. R.,Burkholder, B. T., Shapirs, C. N. & Holland, P. V.: Prevalence of risk factors for antibodies to hepatitis E virus seroreactivity among blood donors in northern California. *Journal of Infectious Diseases* 176, 34±40., 1997.
144. Masuda, J., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K. and Kohno, S.: Acute hepatitis E of a man who consumed wildboar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatology Res* 31, 178–183, 2005.
145. Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, et al. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and other risk groups. *Vox Sang.*75:267–269, 1998.
146. Matsubayashi K., et al. : A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48:1368–1375, 2008.
147. Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. & Mishiro, S.: Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188, 944, 2003.
148. McAtee CP, Zhang Y, Yarbough PO, Fuerst TR, Stone KL, Samander S, et al. Purification and characterization of a recombinant hepatitis E protein vaccine candidate by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 685:91–104, 1996.
149. McCreary C, Martelli F, Grierson S, Ostanello F, Nevel A, Banks M.: Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Veterinary Record* 163, 261–265, 2008.
150. Meader E, Thomas D, Salmon R, Sillis M Seroprevalence of hepatitis E virus in the UK farming population. *Zoonoses Public Health*;57:504–9, 2010.
151. Meng X. J., Purcell R. H., Halbur P. G.: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci* ;94:9860-9865, 1997.

152. Meng X. J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K., Toth T. E., Engle R. E., Emerson S. U., Purcell R. H.: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40, 117–122, 2002.
153. Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S., Tsareva T.S., Bruna J.D., Royer R.L., et al., Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV, *Arch. Virol.*, 143:1405–1415, 1998.
154. Meng XJ, Halbur PG. Swine hepatitis E virus. In: Straw BE, et al., editors. *Diseases of Swine*. 9th Edition Blackwell Publishing Press, pp. 537–545, 2006.
155. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94, 9860–9865, 1997.
156. Meng XJ, Shivaprasad HL, Payne C. Hepatitis E virus infections. In: Saif M, et al., editors. *Diseases of Poultry*. 12th Edition Blackwell Publishing Press; pp. 443–452, 2008.
157. Meng XJ.: Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*, 2009.
158. Meng XJ: Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology* 140, 256–26, 2010.
159. Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U. and Purcell, R. H.: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40, 117–122, 2002.
160. Michitaka, K., Takahashi, K., Furukawa, S., Inoue, G., Hiasa, Y., Horiike, N., Onji, M., Abe, N. & Mishiro, S.: Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 37, 214–220, 2007.
161. Morrow, C., Gyözö, S., Eszter, M., Akos, K., Wood, A., Richter, S., Jaskulska, B. and Hess, M: Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary. *Avian Pathol.* 37, 527-535, 2008.
162. Munne MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfollano M, Schlauder GG, Gonzalez JE: Identification of the first

- strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol*. 78(12):1579-1583, 2006.
- 163.** Mushahwar I. K.: Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80, 646–658, 2008.
 - 164.** Mushahwar, I. K., Dawson, G. J., Bile, K. M. & Magnius, L. O.: Serological studies of an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Somalia. *Journal of Medical Virology* 40, 218-221, 1993.
 - 165.** Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen MP Jr, Sedyaningsih ER, Seriwatana J, Glass JS, Narupiti S, Corwin AL: Evaluation of diagnostic assay for hepatitis E virus in outbreak setting. *J Clin Microbiol* 4: 1581-1583, 2006.
 - 166.** Nakai, I., Kato, K., Miyazaki, A., Yoshii, M., Li, T.C., Takeda, N., Tsunemitsu, H., Ikeda, H.: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:1171-7, 2006.
 - 167.** Norder H, Sundqvist L, Magnusson L, Østergaard Breum S, Löfdahl M, Larsen LE, Hjulsager CK, Magnius L, Böttiger BE and Widén F: Endemic hepatitis E in two Nordic countries; *Euro Surveill*, (19):14, 2009.
 - 168.** Ohnishi, S., J. H. Kang, et al.: "Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan." *Hepatol Res* 36(4): 301-307, 2006.
 - 169.** Olsen, B., Axelsson-Olsson, D., Thelin, A., Weiland, O.: Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand. J. Infect. Dis.* 3 38:55-8, 2006.
 - 170.** Park H K, Jeong S-H, Kim J -W, Woo B-H, Lee D H, Kim H Y and Ahn S: Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays, *BMC Infectious Diseases*, **12**:142, 2012.
 - 171.** Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.*;147:28–33, 2007.
 - 172.** Pavio N., Meng X. J., Renou C.: Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41, 46, 2010
 - 173.** Payne, C. J., Ellis, T. M., Plant, S. L., Gregory, A. R. and Wilcox, G. E.: Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Veterinary Microbiology* 68,119±125, 1999.

- 174.** Peralta B, Casas M, De Deus N, Martín M, Ortuño A, Pérez-Martín E: Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol*;137:66–73, 2009.
- 175.** Peron JM, Danjoux M, Kamar N, et al.: Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch*; 450:405-10, 2007.
- 176.** Petrovic T., Prodanov J., Lazic S.: First Preliminary Results on the Presence of Hepatitis E virus in Swine Population in Serbia, International Symposium »Current Developments in Food and Environmental Virology«, Pisa, Italy, 9 – 11 October, Proceedings, 52-53, 2008.
- 177.** Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol*; 33(5):826-33, 2000.
- 178.** Pinto et Saiz: Enteric Hepatitis Viruses (Chapter 3) in “Human Viruses in Water” Volume 17, Pages 1-299, Edited by Albert Bosch, 2007.
- 179.** Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl*;16:74-82, 2010c.
- 180.** Popović R., Knezević M., Štavljanin B.: “Razvoj tržišta osnovnih stočarskih proizvoda u Srbiji u kontekstu evropskih integracija”, objavljeno u ed. Ševarlić M., Tomić D., “Agroprivreda Srbije i evropske integracije“, Društvo agrarnih ekonomista Srbije, Beograd, strana 103 – 114, 2010.
- 181.** Pourpongporn P, Samransurp K, Rojanasang P, Wiwattanakul S, and Srisurapanon S.: The prevalence of anti-hepatitis E in occupational risk groups. *J Med Assoc Thai* 92 Suppl 3:S38-42, 2009.
- 182.** Purcell, R. H., Emerson, S. U.: Hepatitis E virus. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 3051–3061. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 183.** Purdy, M., Tam, A., Huang, C., Yarbough, P. and Reyes, G.: Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the ‘alpha-like’ RNA virus superfamily, *Seminars in Virology* **4**, 319±326, 1993.
- 184.** Renou, C., Cadranet, J., Boulière, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carenco, P., Harafa.A., Bertrand J.J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, J., Decoppet, A.,

- Eloit, M., Pavio, N.: Possible zoonotic transmission of Hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1094-1096, 2007.
- 185.** Robinson RA, Burgess WH, Emerson SU, Leibowitz RS, Sosnovtseva SA, Tsarev S, et al. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*; 12:75–84, 1998.
- 186.** Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HHJL, Vennema H, Duizer E, et al. Hepatitis E virus genotype 3 sources in the Netherlands. *Emerg Infect Dis*; 15(3):381-7, 2009b.
- 187.** Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Bouwknegt, M., de Roda Husman, A.M.: Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 143, 112–116, 2007
- 188.** Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, et al: Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect. Genet. Evol.* 7:368–373, 2007.
- 189.** Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, Ramsay M, Morgan D; Hepatitis E Incident Investigation Team. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis.* ;15(11):1738-44, 2009.
- 190.** Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, *et al.* A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine amino transferase. *Transfusion*, 48:2568-76, 2008.
- 191.** Santos DRL, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA.: Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil, *Vet Microbiol* 149: 236-241, 2011.
- 192.** Schielke A., Filter M, Appel B and Johne R.: Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach, *Virol J.* 2011; 8: 487, 2011.
- 193.** Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol.* ;57:243–51, 1999.
- 194.** Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, et al: Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient, *J Hepatol* 2011.
- 195.** Skidmore S: Overview of hepatitis E virus. *Curr Infect Dis Rep* 4:118–123, 2002.
- 196.** Smith J.L.: A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64 (4):572-586, 2001.

197. Sookoian S: Liver disease during pregnancy: acute viral hepatitis. *Ann Hepatol*, 5:231-236, 2006.
198. Srivastava R, Aggarwal R, Jameel S, Puri P, Gupta V K, RameshV S, Bhatia S and Naik S.: Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein; *Viral Immunol.* 20 56–65, 2007.
199. Stat. God.Srb. 2012., Stat. Yearb.Serb. 2012
200. Steyer A, Naglič T, Močilnik T, Poljšak-Prijatelj M, Poljak M: Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage, *Infect Genet Evol.*;11(7):1732-7, 2011.
201. Takahashi M, et al. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: Characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol.*;48:1112–1125, 2010.
202. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai D, Nagashima S, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 2011 Jan 12; 2011.
203. Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H. and 7 other authors: Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43, 49–56, 2005.
204. Tam A.W., Smith M.M., Guerra M. E., Huang C. C., Bradley D. W., Fry K. E., Reyes G. R.: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 85:120–131, 1991.
205. Tam A.W., White R., Yarbough P.O., Murphy B.J., McAtee C.P., Lanford R.E., Fuerst T.R.: In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology*, 238, 94–102, 1997.
206. Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., Inoue, O., Mawatari, F. and Ishibashi, H.: Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40, 869–870, 2004.
207. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res.*;37:113–20, 2007.

- 208.** Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S.: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362, 371–373, 2003.
- 209.** Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., Yamabe, H., Mishiro, S. & Kinoshita, Y.: Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74, 67–70, 2004.
- 210.** Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S.: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings, *Lancet* 362, 371–373, 2003.
- 211.** Teshale EH, Hu DJ. Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol.*; 3:285-291, 2011.
- 212.** Thomas D. L., Yarbough G. H., Vlahov, D., Tsarev, S. A., Nelson, K. E., Saah, A. J., Purcell, R. H.: Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1244–1247, 1997.
- 213.** Tien, N. T., Clayson, H. T., Khiem, H. B., Sac, P. K., Corwin, A. L., Myint, K. S. & Vaughn, D. W.: Detection of immunoglobulin G to the hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 57, 211, 1997.
- 214.** Tokita, H., Harada, H., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T. and Okamoto, H.: Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993. *J Gen Virol* 84, 421–427, 2003.
- 215.** Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Kapikian, A. Z., Ticehurst, J., London, W. and Purcell, R. H.: ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame 2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *Journal of Infectious Diseases* 168, 369–378, 1993.
- 216.** Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Rippey, M. K., Zack, P., Shapiro, M. and Purcell, R. H.: Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis* 172, 31–37, 1995.
- 217.** Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Yarbough, P. O., Legters, L. J., Moskal, T. and Purcell, R. H.: Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol* 43, 135–142, 1994.

- 218.** Usmanov RK, Balaian MS, Dvoynikova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov Iu A, et al.: An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr Virusol*; 39(4):165-8., 1994.
- 219.** Utsumi T., Hayashi, Y; Lusida, M I; Amin, M; Soetjipto; Hendra, A; Soetjningsih; Y, Yoshihiko; Hotta, H: “Prevalence of hepatitis E virus among swine and humans in two different ethnic communities in Indonesia” *Archives of Virology*, Volume 156, issue 4, p. 689 – 693, 2011.
- 220.** Vaidya, Sunil R.; Tilekar, Bipin N.; Walimbe, Atul M.; Arankalle, Vidya A.: Increased Risk of Hepatitis E in Sewage Workers from India, *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, Volume 45 - Issue 11 - pp 1167-1170, November 2003.
- 221.** Valčić M.A.: *Opšta epizootiologija*, 1998.
- 222.** Vasickova P, Kralik P, Slana I, Pavlik I: Optimisation of a triplex real time RT-PCR for detection of hepatitis E virus RNA and validation on biological samples, *J Virol Methods.*, 180(1-2):38-42, 2012.
- 223.** Vasickova P, Psikal I, Kralik P, Widen F, Hubalek Z, Pavlik I: Hepatitis E virus: e review. *Veterinarni Medicina* 52, 365–384, 2007.
- 224.** Viswanathan R., Sidhu A.S.: Infectious hepatitis; clinical findings. *Indian J Med Res* 45:49–58, 1957.
- 225.** Vitral C.L., Pito M.A., Lewis-Ximenez L.L., Khudyakov Y.E., dos Santos D.R., Gaspar A.M.C.: Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 2005
- 226.** Vulcano, A., Angelucci, M., Candelora, E., Martini, V., Patti, A.M., Mancini, C., Santi, A.L., Calvari, A., Casagni, L., Lamberti, A.: HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann. Ig.* 19, 181-186, 2007.
- 227.** Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, Märklbauer E: Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany, *Foodborne Pathog Dis.*; 9 (7):655-60, 2012.
- 228.** Wang N, Lu YH, Zheng YJ, Jiang QW.: Isolation of hepatitis E virus from liver of swine at abattoirs in Shandong province, *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* ;28 (10):1013-5 Chinese, Oct 2007.

- 229.** Wang Y, Ma X: Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region; *Wei Sheng Wu Xue Bao.*,50(7):937-41, 2010.
- 230.** Wang, Y. C., H. Y. Zhang, N. S. Xia, G. Peng, H. Y. Lan, H. Zhuang, Y. H. Zhu, S. W. Li, K. G. Tian, W. J. Gu, J. X. Lin, X. Wu, H. M. Li, and T. J. Harrison: Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China, *J Med Virol* 67:516-521, 2002.
- 231.** Ward, P., Poitras, E., Leblanc, D., Letellier, A., Brassard, J., Plante, D., Houde, A.: Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1360–1369, 2009.
- 232.** Wendum D, Nachury M, Yver M, Lemann M, Fléjou JF, Janin A.: Acute hepatitis E: A cause of lymphocytic destructive cholangitis. *Hum Pathol*; 36:436-8, 2005.
- 233.** Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber P, Plentz A, Jilg W: Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*, 52:50-54, 2011.
- 234.** Wilhelm BJ, Rajic A, Greig J, Waddell L, Trottier G, Houde A, Harris J, Borden LN, Price C.: A systemic review/meta-analysis of primary research investigating swine, pork or pork products as a source of zoonotic hepatitis E virus. *Epidemiol Infect* 139(8):1127-1144, 2011.
- 235.** Williams T P, Kasorndorkbua C, Halbur P G, Haqshenas G, Guenette D K, Toth T E and Meng X J: Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model; *J. Clin. Microbiol.* 39 3040–3046, 2001.
- 236.** Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg*; 66(4):384-8, 2002.
- 237.** Worm, H. C., van der Poel, W. H. M. and Brandstatter, G.: Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect* 4, 657–666, 2002.
- 238.** Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki, N., Gotanda Y., Okamoto H.: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be

- food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84, 2351–2357, 2003.
- 239.** Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, Friendship RM, Yoon Y, Gottschalk M, Yason C and Giulivi A: Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 1213–1219, 2001.
- 240.** Yoo D, Wilson P, Pei Y, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol.*;8:1213–1219, 2001.
- 241.** Zhang F, Li X, Li Z, Harrison TJ, Chong H, Qiao S, Huang W, Zhang H, Zhuang H, Wang Y: Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol.* 2006; 78(111): 1441 – 1448, 2006.
- 242.** Zhang H, Xing D, Shan X and Meng J: The Leu477 and Leu613 of ORF2-Encoded Protein Are Critical in Forming Neutralization Antigenic Epitope of Hepatitis E Virus Genotype 4, *Cellular & Molecular Immunology*, 2008.
- 243.** Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, Lau SH, Che XY, Chau TN, et al.: Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J Med Virol*;64:125–32, 2001.
- 244.** Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T. J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M. et al: A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 81, 1371–1379, 2009.
- 245.** Zhao, CY and Li, Z and Yan, B and Harrison, TJ and Guo, XH and Zhang, F and Yin, JM and Yan, Y and Wang, YC: Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J Med Virol* , 79 (12) 1966 – 1973, 2007.
- 246.** Zhou, Y. H., Purcell, R. H. and Emerson, S. U.: An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 22, 2578–2585, 2004.

