

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina NAGLIČ

**VIRUS HEPATITISA E PRI DOMAČIH PRAŠIČIH IN  
V POVRŠINSKIH VODAH V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina NAGLIČ

**VIRUS HEPATITISA E PRI DOMAČIH PRAŠIČIH IN V  
POVRŠINSKIH VODAH V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**HEPATITIS E VIRUS IN DOMESTIC PIGS AND SURFACE WATER  
IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljala sem ga v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico imenovala prof. dr. Tatjano Avšič Županc, za somentorja asist. dr. Andreja Steyerja in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Somentor: asist. dr. Andrej Steyer

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: asist. dr. Andrej Steyer

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Naglič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.5.083: 636.4.09+502.51(282): 616.993(043)=163.6
KG	virusi/virusi hepatitisa E/HEV/domači prašiči/zoonoze/površinske vode/RT-PCR/filogenetska analiza
AV	NAGLIČ, Tina
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/STEYER, Andrej (somentor)/MANDIČ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	VIRUS HEPATITISA E PRI DOMAČIH PRAŠIČIH IN V POVRŠINSKIH VODAH V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 59 str., 5 pregl., 7 sl., 1 pril., 93 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Virusi hepatitisa E (HEV) so pomembni povzročitelji akutnega hepatitisa v državah v razvoju. V razvitih državah se pojavljajo sporadični primeri bolezni. Prenašajo se fekalno-oralno s kontaminirano vodo in hrano. Pri ohranjanju virusa v okolju in prenosu na ljudi bi naj imeli pomembno vlogo živalski rezervoarji, zlasti prašiči. Želeli smo ugotoviti pogostost okužbe s HEV pri domačih prašičih na slovenskih farmah in preveriti njihovo genetsko raznolikost. HEV smo poskušali dokazati v površinskih vodah, ki bi lahko predstavljale mogoč vir okužbe. Iztrebke prašičev različnih starostnih skupin so zbrali na 6 slovenskih farmah. Skupno smo testirali 136 vzorcev: 85 posameznih in 51 združkov vzorcev. Pri posameznih vzorcih smo testirali 38 sesnih (do 3 tedne), 21 odstavljenih (3-10 tednov), 26 pitanih (več kot 10 tednov) prašičev, pri združkih vzorcev pa 21 združkov sesnih, 14 združkov odstavljenih in 16 združkov pitanih prašičev. Poleg tega smo testirali 60 vodnih vzorcev iz 22 vzorčnih mest slovenskih rek in potokov. Dva litra vodnega vzorca smo koncentrirali z membransko filtracijo in nato koncentrirani vzorec ultracentrifugirali. Za dokazovanje RNA HEV v prašičjih in vodnih vzorcih smo uporabili RT-PCR z vgnezdno PCR, pri čemer smo uporabili široko specifične začetne oligonukleotide. Pomnoževanje RNA HEV smo dokazali skupno pri 40/136 prašičjih vzorcih: pri posameznih vzorcih pri 2/38 sesnih, 6/21 odstavljenih, 7/26 pitanih; pri združkih vzorcev pa pri 7/21 sesnih, 6/14 odstavljenih, 12/16 pitanih združkih prašičev. Na testiranih prašičjih farmah je pri domačih prašičih po pregledu posameznih vzorcev pogostost okužbe s HEV 20,3 %, po pregledu združkov vzorcev pa je verjetnost okužbe s HEV 14,2 %. Pri površinskih vodah smo pomnoževanje dela virusnega genoma HEV dokazali pri 3/60 vzorcih, od tega je bil en vzorec odvzet v neposredni bližini prašičje farme. Filogenetska analiza pomnoženega dela genoma HEV je pokazala, da se večina testiranih prašičjih sevov HEV uvršča v ločeno skupino znotraj genotipa 3. Z analizo nukleotidnega ujemanja vodnih in prašičjih HEV smo ugotovili 100 % ujemanje. Rezultati naše raziskave nakazujejo, da HEV pri domačih prašičih na slovenskih farmah kroži v razmeroma visokem odstotku. Najbolj okuženi skupini so odstavljeni in pitani prašiči. Prašičje farme so možen vir okužbe s HEV in verjetno kontaminirajo površinske vode v bližnji okolici.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 578.5.083: 636.4.09+502.51(282): 616.993(043)=163.6  
 CX viruses/hepatitis E virus/HEV/domestic pigs/zoonosis/surface waters/RT-PCR/filogenetic analysis  
 AU NAGLIČ, Tina  
 AA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/STEYER, Andrej (co-advisor)/MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2010  
 TI HEPATITIS E VIRUS IN DOMESTIC PIGS AND SURFACE WATER IN SLOVENIA  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XI, 59 p., 5 tab., 7 fig., 1 ann., 93 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Hepatitis E virus (HEV) is a causative agent of acute hepatitis and is an important public health concern in many developing countries. Sporadic cases are reported from industrialized countries. It is primarily transmitted directly by faecal-oral route and indirectly by contaminated water and food. Animal reservoirs, especially pigs, are believed to have an important role in the maintenance of HEV in the environment. The aims of this study were to determine the prevalence of HEV in domestic pigs and to investigate whether tested surface waters are contaminated by HEV presenting a possible source of infection. Genetic diversity and phylogenetic analysis of detected HEV was determined. Stool samples from pigs of various age groups were collected at 6 Slovenian pig farms. In total, 136 stool samples were tested: 85 individual and 51 pooled samples. In individual samples, we tested 38 suckling (up to 3 weeks), 21 weanling (3-10 weeks) and 26 fattening (more than 10 weeks) pigs. In pooled samples, we tested 21 pools of suckling, 14 pools of weanling and 16 pools of fattening pigs. In addition, 60 surface water samples were collected from 22 sampling sites of Slovenian rivers and streams in various geographic regions. Two litres of water sample were concentrated by membrane filtration, followed by ultracentrifugation of the concentrated sample. For the detection of HEV RNA, RT-PCR and nested-PCR with broadly reactive primers were used in both, pig stool samples and concentrated water samples. In our study, 40/136 stool samples were determined as positive. HEV RNA was detected in 15/85 individual samples and 25/51 pooled samples. In individual samples HEV RNA was detected in 2/38 suckling, 6/21 weanling, 7/26 fattening pigs and in pooled samples in 7/21 pools of suckling, 6/14 pools of weanling and 12/16 pools of fattening pigs. The prevalence and probability of HEV infection in domestic pigs from selected farms based on individual and pooled stool samples was 20,3% and 14,2%, respectively. In surface waters samples, 3/60 samples were determined as positive, one was collected in the near vicinity of a pig farm. Phylogenetic analysis of amplified genome regions revealed that most of found swine HEV strains constitute a distinct group within genotype 3. Nucleotide identity analysis of tested water and swine HEV strains showed 100% identity match. The results of our study indicate that HEV is circulating in domestic pigs in Slovenian farms at relatively high prevalence, of which weanling and fattening pigs represented the most infected group. Pig farms are potential source of HEV infection and probably contaminate surface waters in near surroundings.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN RAZISKAVE IN DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINA .....	3
2.2 ZGRADBA VIRUSA .....	4
2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV .....	4
2.4 VIRUSNI GENOM .....	4
<b>2.4.1 ORF1</b> .....	5
<b>2.4.2 ORF2</b> .....	6
<b>2.4.3 ORF3</b> .....	6
<b>2.4.4 Bicistronska podgenomska RNA</b> .....	6
2.5 GENOTIPSKA RAZNOLIKOST HEV .....	7
2.6 EPIDEMIOLOGIJA .....	10
<b>2.6.1 Viri okužbe in način prenosa</b> .....	10
<b>2.6.2 Zemljepisna razširjenost</b> .....	11
2.7 HEPATITIS E KOT ZOONOZA.....	12
<b>2.7.1 Domači prašiči in HEV</b> .....	13
2.8 KLINIČNI ZNAKI PRI ČLOVEKU .....	14
<b>2.8.1 Diagnostika</b> .....	15

2.9 HEV V OKOLJU .....	15
<b>2.9.1 Določanje HEV v okoljskih vzorcih</b> .....	16
2.10 PREPREČEVANJE OKUŽBE S HEV .....	16
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>18</b>
3.1 MATERIALI .....	18
<b>3.1.1 Vzorci</b> .....	18
3.1.1.1 Prašičji vzorci .....	18
3.1.1.2 Površinske vode .....	19
<b>3.1.2 Reagenti</b> .....	19
3.1.2.1 Reagenti za pripravo iztrebkov .....	19
3.1.2.2 Reagenti za membransko filtracijo .....	19
3.1.2.3 Reagenti za osamitev virusne RNA .....	19
3.1.2.4 Reagenti za RT-PCR .....	20
3.1.2.5 Reagenti za vgnezdno PCR .....	20
3.1.2.6 Začetni oligonukleotidi .....	20
3.1.2.7 Reagenti za čiščenje pomnožkov PCR .....	21
3.1.2.8 Reagenti za določanje nukleotidnega zaporedja .....	21
3.1.2.9 Reagenti za agarozno elektroforezo .....	22
<b>3.1.3 Potrošni material</b> .....	22
<b>3.1.4 Laboratorijska oprema</b> .....	22
3.2 METODE .....	24
<b>3.2.1 Priprava vzorcev</b> .....	24
3.2.1.1 Prašičji iztrebki .....	24
3.2.1.2 Površinske vode .....	24
<b>3.2.2 Osamitev virusne RNA</b> .....	25
<b>3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo</b> .....	26
3.2.3.1 Izbira začetnih oligonukleotidov .....	26
3.2.3.2 Pozitivne kontrole in preverjanje pogojev PCR .....	26
3.2.3.3 RT-PCR .....	27
3.2.3.4 Vgnezdna PCR .....	28
3.2.3.5 Pomnoževanje odsekov za filogenetsko analizo .....	28

3.2.3.6	Agarozna gelska elektroforeza .....	29
3.2.3.7	Izračun pogostosti in verjetnosti okužbe s HEV .....	30
<b>3.2.4</b>	<b>Določanje nukleotidnega zaporedja.....</b>	<b>30</b>
3.2.4.1	Čiščenje pomnožkov PCR.....	30
3.2.4.2	Ocena koncentracije očiščenih pomnožkov PCR.....	31
3.2.4.3	Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja .....	31
3.2.4.4	Filogenetska analiza zaporedij.....	33
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
4.1	PREVERJANJE POGOJEV PCR.....	35
4.2	DOKAZ HEV V VZORCIH .....	35
4.2.1	Prašičji vzorci.....	35
4.2.2	Površinske vode .....	36
4.3	FILOGENETSKA ANALIZA.....	36
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>40</b>
5.1	PREVERJANJE POGOJEV PCR.....	40
5.2	DOKAZ HEV V VZORCIH .....	40
5.3	FILOGENETSKA ANALIZA.....	42
5.4	ZAKLJUČEK .....	44
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>48</b>

ZAHVALA

PRILOGE



**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Število testiranih vzorcev po starostnih skupinah prašičev in po vrsti vzorcev .....	19
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za dokazovanje HEV (A) in pomnoževanje genomskih odsekov za filogenetsko analizo (B) .....	21
Preglednica 3: Pogostost in verjetnost okužbe prašičev po pregledu posameznih in združkov vzorcev glede na starostne skupine prašičev .....	36
Preglednica 4: Odstotek nukleotidnega ujemanja predstavnikov prašičjih sevov HEV treh različnih genotipskih skupin znotraj genotipa 3 iz naše raziskave (krepki tisk, senčeno) med seboj ter z referenčnimi sevi predstavnikov podtipov genotipov 3, 1, 2 in 4 na podlagi 348 bp dolgega odseka regije ORF2 .....	38
Preglednica 5: Odstotek nukleotidnega ujemanja sevov HEV določenih v vzorcih površinskih voda (V26/08, V165/08) in sedmih prašičjih sevov HEV iz naše raziskave (krepki tisk, senčeno) z referenčnimi sevi predstavnikov genotipov 3, 1, 2 in 4 na podlagi 137 bp dolgega odseka prekrivajoče se regije ORF2/ORF3 .....	39

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Organizacija genomske in podgenomske RNA HEV .....	7
Slika 2: Filogenetsko drevo 52 zaporedij celotnega genoma HEV, pridobljenih iz genske banke (vpisne številke so označene). Zaporedja so poravnali s ClustalW v programu MEGA 3.1. Drevo so zrisali z metodo združevanja sosedov s 1.000 ponovitvami (Pavio in sod., 2010).....	8
Slika 3: Porazdelitev ohranjenih nukleotidnih mest na podlagi analize celotnega genoma 70 sevov HEV.....	10
Slika 4: Porazdelitev genotipov HEV po kontinentih (Okamoto, 2007).....	11
Slika 5: Zemljepisna porazdelitev prašičjih farm (zelene pike) .....	18
Slika 6: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR štirih vzorcev pozitivnih kontrol s predhodno 5-minutno denaturacijo pri 95 °C in brez nje ter z dodatkom MgSO <sub>4</sub> in brez njega.....	35
Slika 7: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij 348 bp dolgega odseka regije ORF2 virusnega genoma HEV iz prašičev, testiranih v tej raziskavi (krepki tisk), in referenčnih sevov HEV .....	37

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Poravnava zaporedij 251 bp dolgega fragmenta regije ORF2 prašičjih sevov  
HEV iz naše raziskave

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

ALT	alanin aminotransferaza
bp	bazni pari
cDNA	komplementarno zaporedje DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
ddNTP	dideoksinukleozid-trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid-trifosfat
HAV	virus hepatitis A (ang. <i>hepatitis A virus</i> )
HEV	virus hepatitis E (ang. <i>hepatitis E virus</i> )
kb	kilobaza
kDa	kilo daltoni
ORF	odprti bralni okvir (ang. <i>open reading frame</i> )
PBS	fosfatni pufer (ang. <i>phosphate buffer saline</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
RNA	ribonukleinska kislina
RT	reverzna transkriptaza
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	tris acetat EDTA
<i>Tfi</i>	<i>Thermus filiformis</i>
TGBE	tris glicin goveji ekstrakt (ang. <i>tris glycine beef extract</i> )

## 1 UVOD

Virusi hepatitisa E (HEV) so pomembni povzročitelji akutnega hepatitisa v mnogih državah v razvoju s slabimi higienskimi razmerami, predvsem v Aziji, Afriki in Latinski Ameriki. V razvitih državah zaznavamo sporadične primere teh okužb (Clemente-Casares in sod., 2003). Edinstvena značilnost hepatitisa E je relativno visoka smrtnost pri nosečnicah (Navaneethan in sod., 2008). Povzročitelji bolezni so majhni RNA virusi brez ovojnice, ki se primarno prenašajo fekalno-oralno. V endemskih državah so znane epidemije zaradi stika z vodo, ki je kontaminirana s HEV. Zadnje raziskave živalskih sevov HEV pri prašičih, piščancih, zajcih in srnjadi ter obstoj drugih živalskih vrst, ki imajo protitelesa proti HEV, kažejo na razširitev območja gostiteljev in povečanje različnosti HEV. Trenutno bolezen, ki jo povzroča HEV, poznamo kot zoonozo, kjer so prašiči in verjetno tudi druge živalske vrste virusni rezervoar (Meng, 2010a). Glede na obsežno genomsko raznolikost sevov HEV jih razdelimo v vsaj štiri genotipe (Lu in sod., 2006). Genotipa 1 in 2 se pojavljata izključno pri ljudeh in jih povezujemo z epidemijami in izbruhi v deželah v razvoju. Genotipa 3 in 4 sta zoonotska, okužujeta ljudi in nekatere živali tako v deželah v razvoju kot v razvitih državah (Meng, 2010b).

### 1.1 NAMEN RAZISKAVE IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti pogostost okužb s HEV pri prašičih na nekaterih slovenskih farmah in preveriti njihovo genetsko raznolikost. HEV smo poskušali dokazati tudi v površinskih vodah, ki so bile morebiti kontaminirane z živalskimi iztrebki in predstavljajo mogoč vir okužbe.

Pričakovali smo, da bo pogostost HEV pri prašičih na slovenskih farmah primerljiva z rezultati drugih evropskih raziskav (van der Poel in sod., 2001; Rutjes in sod., 2007; Di Bartolo in sod., 2008; Rutjes in sod., 2009; Martelli in sod., 2010; Forgách in sod., 2010), tj. okoli 30 %. Pričakovali smo tudi, da bomo HEV zaznali v okoljski površinski vodi, kar

bi lahko bila posledica gnojenja kmetijskih površin s prašičjimi iztrebki, oz. iztekanje gnojnice v površinske vode.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA

Začetki raziskav o HEV segajo v leto 1980, ko so Wong in sod. (1980) ter Khuroo (1980) poročali o epidemijah t.i. hepatitisa ne-A, ne-B v Indiji. Vzrok opisanih epidemij je bila kontaminirana voda. Domnevali so, da gre za fekalno-oralni prenos in za novo vejo virusnega povzročitelja hepatitisa. Do takrat neznanega povzročitelja so leta 1983 prvič opisali po poskusu pri prostovoljcu, pri katerem so uspeli razviti značilen akutni hepatitis (Balayan in sod., 1983). Osebo, ki je bila imuna na virus hepatitisa A (HAV), so po fekalno-oralni poti okužili z izvlečki zbranih vzorcev iz domnevnih primerov epidemije ne-A, ne-B hepatitisa. Pri prostovoljcu med okužbo niso zaznali znakov hepatitisa B, protiteles IgM proti HAV in povečanja celokupne količine protiteles proti HAV. V prostovoljčevih vzorcih iztrebkov so z imunsokoelektronsko mikroskopijo zaznali okrogle, od 27 do 30 nm velike virusom podobne delce.

Osem let po tem odkritju so določili celotno nukleotidno zaporedje genoma HEV, seva iz Mjanmara (znan tudi kot burmanski sev) (Tam in sod., 1991). Opazili so več kot 88,2 % nukleotidno ujemanje genoma s sevi, odkritimi v ostalih azijskih državah kot so Kitajska, Indija, Nepal in Pakistan (Aye in sod., 1992; Gouvea in sod., 1998; Tsarev in sod., 1992; van Cuyck-Gandre in sod., 2000) ter z afriškimi sevi iz Čada in Maroka (van Cuyck in sod., 2003; Cheng in Meng, 2004). Leta 1992 so določili zaporedje mehiškega seva, ki je leta 1986 povzročil izbruh v Mehiki (Huang in sod., 1992). Mehiški sev se razlikuje od sevov, podobnim mjanmarskemu, in tako oblikuje drugi genotip. Kasneje so opisali sev HEV, osamljenega iz bolnika s sporadičnim hepatitisom E iz ZDA, ki ni potoval v endemska območja (Kwo in sod., 1997). Opisani sev HEV tvori tretji genotip HEV, ki je po zdajšnjih podatkih najbolj razširjen genotip po svetu (Pina in sod., 2000; Worm in sod., 2000; Takahashi in sod., 2001; Mizuo in sod., 2002; Banks in sod., 2004;). Leta 1999 so opisali seve HEV, osamljene iz kitajskih bolnikov z akutnim hepatitisom (Wang in sod., 1999). Sevi so bili drugačni od prvotnih kitajskih sevov genotipa 1, zato so oblikovali nov, četrti genotip. V četrti genotip so se ob kitajskih uvrstili še sevi HEV sporadičnih primerov

iz Tajvana in Japonske (Wu in sod., 2002; Wang in sod., 2000). Glede na genomsko raznolikost sevov HEV so bila zaporedja HEV razvrščena v štiri večje genotipske skupine (genotipi 1 do 4) (Lu in sod., 2006; Zhai in sod., 2006).

## 2.2 ZGRADBA VIRUSA

Virusi HEV so majhni okrogli virusi brez ovojnice z ikozaedrično simetrijo in premerom viriona 27 do 34 nm. Sestavljajo ga kapsidna beljakovina, znotraj katere je 7,3 kb dolga enojnovijačna RNA s pozitivno polarnostjo, ki ima zapis za tri odprte bralne okvirje (ORF, ang. *open-reading frame*) (Pavio in sod., 2010). ORF1 predstavlja približno dve tretjini virusnega genoma in kodira nestrukturane beljakovine. Drugi ORF, ORF2, se nahaja na 3'-koncu genoma in kodira kapsidno beljakovino. ORF3 kodira malo beljakovino, ki naj bi imela vlogo pri pomnoževanju virusa in oblikovanju viriona (Yamada in sod., 2009). Čeprav poznamo samo en serotip HEV, je za seve HEV značilna velika genotipska raznolikost (Okamoto, 2007).

## 2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Uvrstitev HEV v sistem je še dokaj nejasna. Prvotno so ga zaradi podobne morfologije in zgradbe genoma s kalicivirusi uvrščali v družino *Caliciviridae* (Tam in sod., 1991). Zaradi nizke podobnosti nukleotidnega zaporedja genoma HEV s kalicivirusi so pozneje HEV iz družine *Caliciviridae* izključili (Emerson in sod., 2004). Trenutno je HEV kot edini predstavnik rodu *Hepevirus* uvrščen v novo družino *Hepeviridae* (Emerson in sod., 2004). Z odkrivanjem vedno novih sevov HEV iz različnih živalskih vrst bo po najnovejših raziskavah uvrstitev HEV v sistem najverjetneje potrebno prenoviti (Meng, 2010b).

## 2.4 VIRUSNI GENOM

Genom HEV je približno 7,3 kb dolga enojnovijačna pozitivno polarna molekula RNA (Okamoto, 2007). Sestavljena je iz kratke 27 do 35 nukleotidov dolge 5'-nekodirajoče



regije, ki ji sledijo trije delno prekrivajoči se odprti bralni okvirji (od 5'-konca si sledijo ORF1, ORF3 in ORF2) (Slika 1A). Na 3'-koncu je 65 do 74 nukleotidov dolga nekodirajoča regija, ki se zaključí s 150 do 200 nukleotidov dolgim poliadeniliranim repom (Vasickova in sod., 2007). Na 5'-koncu je molekula RNA modificirana s kapo iz 7-metil gvanozina (Kabrane-Lazizi in sod., 1999b). Oba nekodirajoča konca virusnega genoma sta verjetno udeležena pri uravnavanju virusne translacije in pomnoževanja (Tam in sod., 1991).

#### 2.4.1 ORF1

ORF1 se nahaja na 5'-koncu genoma HEV in je z dolžino približno 5 kb največji ORF HEV (Meng, 2010b). Kodira virusne nestrukturane beljakovine, ki naj bi bile udeležene pri virusnemu pomnoževanju. Računalniška analiza ORF1 (Koonin in sod., 1992) je pri kodiranih beljakovinah odkrila aminokislinske domene, ki si od N-konca proti C-koncu sledijo:

- metiltransferaza,
- domena z neznano vlogo, domena Y (podobna kot pri virusu rdečk),
- papainu podobna proteaza (našli so jo že pri alfavirusih in virusu rdečk)
- domena bogata s prolinom
- domena z neznano vlogo, domena X (podobna kot pri virusu rdečk),
- helikaza
- od RNA odvisna polimeraza RNA

Glede na dokaz metiltransferaze v ORF1 je pričakovano, da ima genom HEV 5'-kapo, kar pomeni modifikacijo 5'-konca molekule RNA, saj je metiltransferaza običajno odgovorna za metilacijo dušika na mestu 7 v 5'-gvanozinu ( $m^7G$ ) (Shatkin, 1976). Domnevo so potrdili s testom RT-PCR, ki je temeljil na prepoznavi monoklonskih protiteles 7-metilgvanozina (Kabrane-Lazizi in sod., 1999b). Dokaz helikaze kaže na to, da je za pomnoževanje in transkripcijo genoma ključno razvitje molekule RNA (Vasickova in sod., 2007). Zaradi neustreznih celičnih kultur za *in vitro* pomnoževanje HEV je le malo znanega o translaciji in procesiranju poliproteinske molekule, ki se prepíše iz ORF1 (Pavio in sod., 2010).

#### 2.4.2 ORF2

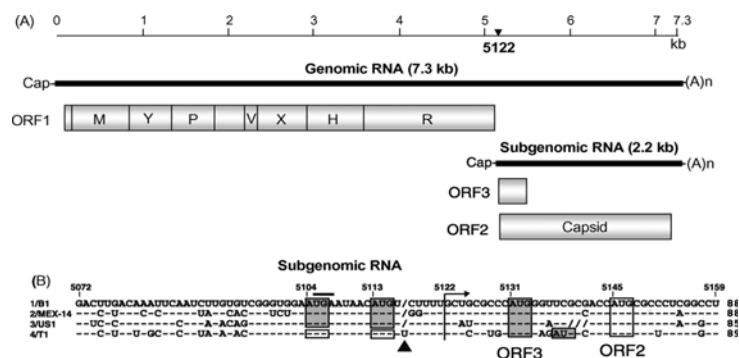
ORF2 se nahaja na 3'-koncu genoma HEV in predstavlja približno 2 kb dolgo zaporedje. Kodira glavno strukturno beljakovino virusne kapside (Okamoto, 2007). Vsebuje značilna signalna zaporedja in tri predvidena glikozilacijska mesta. Mutacija znotraj glikozilacijskega mesta preprečuje oblikovanje infektivnega virusnega delca (Graff in sod., 2008). Aminokislinska zaporedja kapsidne beljakovine med različnimi genotipi so visoko ohranjena, kar je povezano z majhno antigeno raznolikostjo. Zaradi tega obstaja najverjetneje zgolj en serotip HEV (Okamoto, 2007).

#### 2.4.3 ORF3

ORF3 se nahaja med ORF1 in ORF2 ter predstavlja kratko, 372 nukleotidov dolgo zaporedje, ki se na 3'-koncu v 331 nukleotidih prekriva z ORF2 (Slika 1A) (Okamoto, 2007). ORF3 kodira majhno beljakovino, ki naj bi bila vpletena pri povezavi s citoskeletom (Zafrullah in sod., 1997). N-konec beljakovine se veže z RNA HEV in oblikuje kompleks s kapsidno beljakovino (Tyagi in sod., 2002). C-konec beljakovine ORF3 naj bi bil vpleten pri sestavljanju virusa in pri patogenezi (Tyagi in sod., 2002).

#### 2.4.4 Bicistronska podgenomska RNA

Z *in vitro* sistemom pomnoževanja so odkrili 2,2 kb dolgo bicistronsko podgenomsko RNA, ki ima zapis tako za ORF2 kot ORF3 (Graff in sod., 2006). Z rezultati njihovih raziskav so dokazali, da se beljakovini, kodirani v ORF2 in ORF3, prevedeta iz iste podgenomske RNA in da sta enake velikosti pri vseh štirih genotipih. Rezultate so na prašičjem modelu *in vivo* potrdili in dokazali, da se ORF3 prekriva z ORF2 in da se noben od njiju ne prekriva z ORF1 (Huang in sod., 2007) (Slika 1A).



Slika 1: Organizacija genomske in podgenomske RNA HEV

(A) Organizacija genoma HEV, kjer je prikazano mesto 5122. nukleotida, pri katerem se začne 2.200 nukleotidov dolga podgenomska RNA. Mesta nukleotidov se nanašajo na sev Sar-55 (vpisna številka v genskih bankah GenBank/EMBL/DDBJ je AF444003). M - metiltransferaza, Y - domena Y, P - papainu podobna proteaza, V - domena bogata s prolinom, X - domena X, H - helikaza RNA, R - od RNA odvisna polimeraza RNA. (B) Primerjava zaporedij HEV z vsebujočimi potencialnimi iniciacijskimi kodoni za ORF2 in ORF3. Primerjana so zaporedja štirih predstavnikov HEV genotipov 1 do 4, pri katerih je poznano zaporedje celotnega genoma. Potencialni iniciacijski kodoni ORF2 in ORF3 so prikazani v osenčenem kvadratu, potencialni iniciacijski kodoni ORF2 pa v praznem kvadratu. Vstavljene ostanki U, ki ga najdemo izključno pri sevih genotipa 4, je označen s trikotnikom. Terminacijski kodon (UGA) ORF1 je podčrtan (Okamoto, 2007).

## 2.5 GENOTIPSKA RAZNOLIKOST HEV

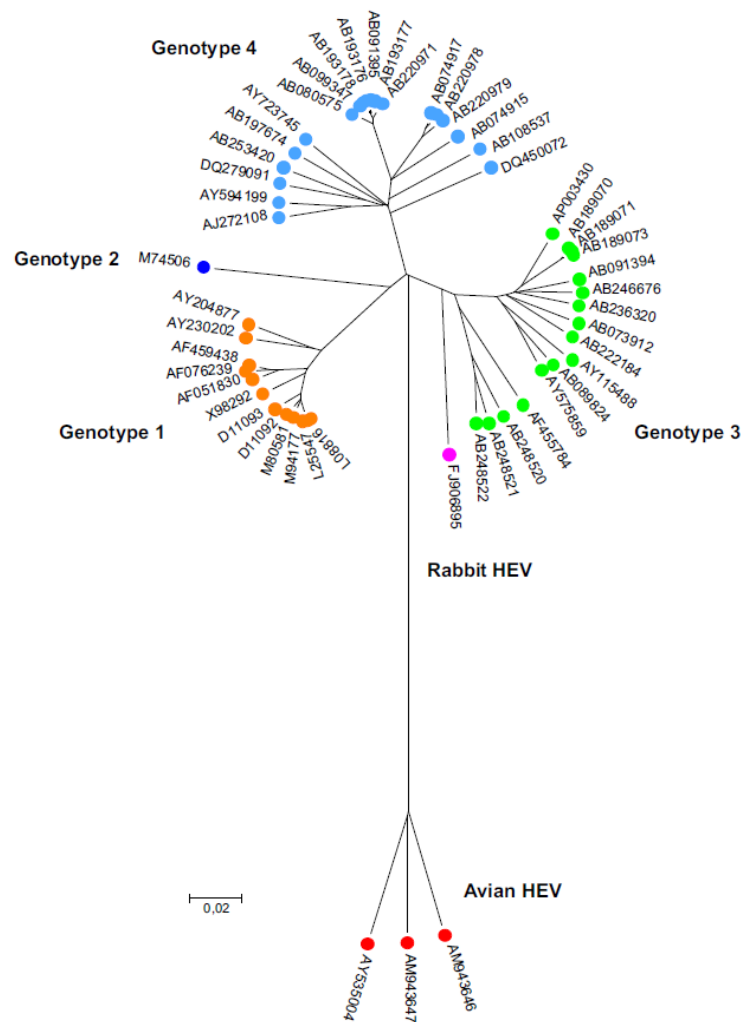
Za HEV je značilna velika genotipska raznolikost med sevi. Mogoč razlog za to je, da ima virusna od RNA odvisna polimeraza RNA visoko stopnjo napak in da nima popravljalnih mehanizmov (Okamoto, 2007). Trenutno so znane štiri večje skupine sesalskih genotipov HEV (Okamoto, 2007; Meng, 2010b):

- genotip 1 vključuje epidemične seve HEV iz azijskih in afriških držav v razvoju,
- v genotip 2 so uvrščeni edini mehiški sevi in nekaj afriških,
- genotip 3 je široko razširjen in vključuje seve HEV iz sporadičnih človeških primerov iz razvitih držav in živalske seve iz prašičev, srnjadi in mungov,
- v genotip 4 se uvrščajo sevi HEV iz sporadičnih človeških primerov v Aziji in prašičjih sevov iz prašičev.

Ptičji HEV je trenutno uvrščen v sistem kot začasna nova vrsta v rodu *Hepevirus*. Glede na to, da obstajajo vsaj trije genotipi ptičjega HEV in da je odstotek nukleotidnega ujemanja s sesalskimi sevi HEV zgolj 50 %, je verjetno, da bodo ptičje seve HEV uvrstili v nov, samostojen rod znotraj družine *Hepeviridae* (Meng, 2010b).

Nedavno so na Kitajskem odkrili nov sev HEV, ki so ga osamili iz zajcev na zajčji farmi (Zhao in sod., 2009). Zajčji HEV se genotipsko razlikuje od znanih štirih genotipov in najverjetneje predstavlja nov, peti genotip (Zhao in sod., 2009). Nadaljnje raziskave bi lahko usmerili v odkrivanje HEV pri zajčji populaciji v ostalih državah in analizirali, ali lahko zajčji HEV okužijo druge živalske vrste in človeka (Meng, 2010b).

Filogenetsko drevo 52 zaporedij celotnega genoma HEV do sedaj znanih genotipov je prikazano na Sliki 2.



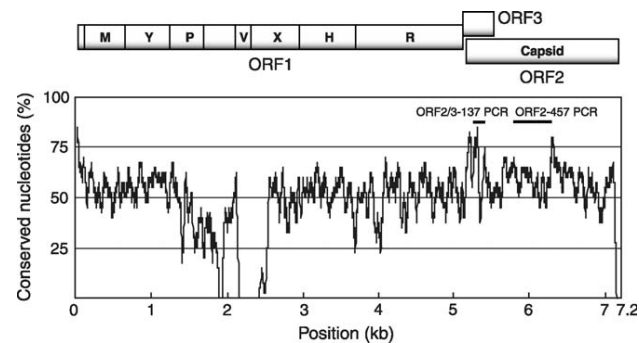
**Slika 2:** Filogenetsko drevo 52 zaporedij celotnega genoma HEV, pridobljenih iz genske banke (vpisne številke so označene). Zaporedja so poravnali s ClustalW v programu MEGA 3.1. Drevo so zrisali z metodo združevanja sosedov s 1.000 ponovitvami (Pavio in sod., 2010).

Na drevesu so razvrščeni genotipi 1 do 4 ter zajčji (roza) in ptičji (rdeča) HEV.

Na podlagi analize 75 zaporedij celotnih ali skoraj celotnih genomov HEV s primerjavo parov (ang. *pairwise comparison*) so določili 23,6 do 27,7 % raznolikost med genotipi (Okamoto, 2007). Sevi genotipa 1 so si med seboj različni do 11,8 %, medtem ko kažeta genotipa 3 in 4 večjo raznolikost: genotip 3 do 19,3 %, genotip 4 do 17 %. Sevi genotipa 3 HEV so med seboj bolj različni kot sevi genotipa 4 in jih glede na objavljene kriterije (Lu in sod., 2006) lahko razdelimo v 10 genotipskih linij: 3a-3j. Linije 3a in 3j se večinoma nahajajo v Severni Ameriki, 3b, 3d in 3g pa v Aziji. V Evropi se nahajajo sevi linij 3c, 3e, 3f, 3h, 3i. Seve genotipa 4 uvrščamo v 7 genotipskih linij: 4a-4g. Zaporedja sevov genotipa 1 so bolj homologna in jih glede na objavljene kriterije razdelimo v pet genotipskih linij: 1a-1e. Primerjava parov 179 nukleotidov dolgega zaporedja ORF2 mehiškega seva in afriških sevov genotipa 2 kaže, da so afriški sevi med seboj različni do 10,3 %, z mehiškim sevom pa od 12,3 do 16,8 %. Glede na filogenetsko analizo se sevi genotipa 2 razvrščajo v vsaj dve genotipski liniji, mehiško in afriško (Okamoto, 2007).

Pri primerjavi genomov HEV genotipov 1 do 4 so ugotovili, da je v genomu sevov genotipa 4 po drugem start kodonu AUG v regiji ORF3 vrinjen uracilov nukleotid. Insercija povzroči zamik bralnih okvirjev, ki so pomembni za translacijo ORF2 ali ORF3, in translacija poteče iz različnih start kodonov (Slika 1B). Zamik bralnega okvirja naj bi podaljšal beljakovino iz ORF2 za 14 aminokislin in skrajšal beljakovino iz ORF3 za 9 aminokislin (Wang in sod., 2000).

Kljub temu, da so sevi HEV genotipsko izjemno raznoliki, imajo njihovi genomi nekaj dobro ohranjenih regij. Za dokazovanje širokega nabora genotipov HEV z molekularnimi metodami je potrebno poznati ohranjene regije v genomu, ki so skupne vsem ali vsaj večini genotipov HEV. Glede na analizo poravnanih nukleotidnih zaporedij 70 sevov HEV uvrščenih v genotipe 1 do 4 so ugotovili, da v genomu HEV obstajajo tri ohranjene nukleotidne regije s 75 % ujemanjem v nukleotidnem zaporedju (Inoue in sod. 2006). Prva regija je nekdirajoči del genoma na 5'-koncu genoma in 5'-konec regije ORF1. Drugo področje je znotraj prekrivajoče regije ORF2/ORF3, kjer so opazili tri dele visokega nukleotidnega ujemanja. Tretje ohranjeno področje je osrednji del regije ORF2. Med temi ohranjenimi regijami so prekrivajočo regijo ORF2/ORF3 izbrali kot tarčno regijo za načrtovanje začetnih oligonukleotidov (Slika 3).



**Slika 3: Porazdelitev ohranjenih nukleotidnih mest na podlagi analize celotnega genoma 70 sevov HEV**  
 Na vrhu slike je prikazana organizacija genoma HEV: M – metiltransferaza, Y – domena Y, P – papainu podobna proteaza, V – domena bogata s prolinom, X – domena X, H – helikaza RNA, R – od RNA odvisna polimeraza RNA (Inoue in sod., 2006).

## 2.6 EPIDEMIOLOGIJA

### 2.6.1 Viri okužbe in način prenosa

Hepatitis E se pri ljudeh pojavlja v obliki obsežnih epidemij, manjših izbruhov in sporadičnih primerov (Okamoto, 2007). Glavni vir okužbe pri epidemijah, ki se pojavljajo zgolj v endemskih državah v razvoju, je s HEV kontaminirana voda. HEV se prenaša fekalno-oralno in se hitro širi s kontaminirano vodo. Obsežne epidemije so se pojavljale v mnogih tropskih in subtropskih državah, kjer je zaradi uživanja kontaminirane vode za akutnim hepatitisom zbolelo na tisoče ljudi (Mushahwar, 2008). Dejavniki tveganja pri sporadičnih primerih, ki se pojavljajo tako v državah v razvoju kot v razvitih državah, so uživanje s HEV kontaminiranega mesa, školjk ter neposreden stik z okuženo živaljo (Meng, 2010a). Sporadični primeri so v razvitem svetu lahko povezani tudi s potovanjem v države z endemskimi okužbami (Okamoto, 2007). V nasprotju s HAV in drugimi enteričnimi virusi je prenos med ljudmi redek (Aggarwal in Nalik, 1994).

Možen je prenos HEV s krvjo (Mushahwar 2008). Posreden dokaz za to je dokaz viremije med krvodajalci brez vidnih kliničnih znakov, a s povišano stopnjo encima alanin aminotransferaze (ALT) (Fukunda in sod., 2004). Iz več držav celo poročajo o neposrednem dokazu prenosa HEV s transfuzijo (Khuroo in sod., 2004; Tamura A. in sod., 2007). Prav tako poročajo o možnem prenosu z matere na otroka med nosečnostjo in pri porodu (Khuroo in sod., 1995).

### 2.6.2 Zemljepisna razširjenost

Genotip 1 je v azijskih državah razširjen v Bangladešu, Kambodži, Kitajski, Indiji, Kirgizistanu, Mjanmaru, Nepal, Pakistanu, Uzbekistanu in Vietnamu, v Afriki pa v Alžiriji, Centralni afriški republiki, Čadu, Maroku, Sudanu, Tuniziji, Namibiji, Egiptu in Južni Afriki. Prototip genotipa 2 predstavlja mehiški sev, poleg tega se v to skupino uvrščajo sevi iz endemskih afriških držav kot so Centralna afriška republika, Čad, Demokratična republika Kongo, Egipt, Namibija in Nigerija (Okamoto, 2007).

Sevi genotipov 1 in 2 povzročajo epidemije in izbruhe hepatitisa E v tropskih in nekaterih subtropskih področjih. Večinoma so vir okužbe fekalno onesnažena vodna zajetja. Sevi genotipov 3 in 4 so vpleteni v sporadične primere akutnega hepatitisa E v ZDA, evropskih državah, Kitajski in Japonski. Ti primeri so najverjetneje zoonotskega izvora. V genski banki je izmed vseh sevov HEV vnesenih največ zaporedij sevov iz genotipa 3, saj je po svetu široko razširjen in ga najdemo po vseh kontinentih, razen v Afriki. Genotip 4 je omejen zgolj na azijske države ter vključuje človeške in/ali prašičje seve iz Kitajske, Indije, Indonezije, Japonske, Tajvana in Vietnama. Japonska je edina država, v kateri se pojavljajo trije različni genotipi HEV (1, 3 in 4). Najverjetneje se je genotip 1 prenesel iz držav, kjer je genotip 1 endemski (Okamoto, 2007).

Pregled razširjenosti HEV po kontinentih je predstavljen na Sliki 4.



Slika 4: Porazdelitev genotipov HEV po kontinentih (Okamoto, 2007)

## 2.7 HEPATITIS E KOT ZOONOZA

Dandanes je hepatitis E poznan kot zoonotska bolezen. Domači prašiči in druge živali so rezervoar za HEV (Meng, 2010a). Že pred časom so dokazali, da so ljudje s tesnejšim stikom s prašiči (prašičerejci in veterinarji), tvegana skupina za okužbo s HEV (Drobeniuc in sod., 2001; Meng in sod., 2002; Meng, 2010b)

Identifikacija prvega živalskega seva HEV v ZDA je močno razširila raziskovalno področje HEV (Meng, 2010b). Od leta 1997, ko so Meng in sod. (1997) prvi poročali o prašičjem sevu HEV, sorodnemu človeškemu, so objave o odkritju prašičjih sevov sledile skoraj iz vseh držav, ki se ukvarjajo s prašičerejo (Meng, 2003). HEV, ki so jih identificirali iz prašičev, se uvrščajo v genotip 3 ali 4 (Meng, 2010a). Oba genotipa povzročata sporadične primere hepatitis E pri ljudeh. Prašičji HEV je genetsko soroden ali celo identičen sevom genotipa 3 in 4, ki so jih osamili iz bolnikov s hepatitisom E (Mizuo in sod., 2002). Sevi genotipov 3 in 4 so domnevno prašičji sevi, ki lahko okužijo ljudi. Nasprotno pa sevi genotipov 1 in 2 naj ne bi bili prašičji (Meng, 2010b). Glede na raziskave Meng in sod. (1998) imajo sevi genotipa 1 in 2 ožji gostiteljski razpon in so verjetno omejeni zgolj na človeka. Poskusna okužba prašičev s človeškima genotipoma 1 in 2 namreč ni uspela (Meng in sod., 1998).

Poleg domačih prašičev so bili HEV genetsko opredeljeni še iz kokoši, divjih prašičev, srnjadi, mungov in zajcev (Meng, 2010b). Ugotovili so, da se analizirani genom HEV iz divjih prašičev v 99,7 % ujema s HEV iz srnjadi, ki so jo ujeli v istem gozdu, in s HEV štirih bolnikov, ki so uživali surovo meso srnjadi in zboleli za hepatitisom E (Takahashi in sod., 2004). Rezultati nakazujejo mogoč prenos HEV med divjim prašičem in srnjadjo v naravi. Z raziskavo so potrdili še, da uživanje surovega ali premalo kuhanega mesa predstavlja verjeten vir okužbe.

Gostiteljsko območje za HEV se širi. Poleg zgoraj omenjenih živalih, pri katerih je bil genom HEV genetsko opredeljen, poročajo še o drugih živalih, pri katerih so zaznali



protitelesa proti HEV: psi, mačke, ovce, koze, glodavci, govedo in primati. Raziskave očitno dokazujejo, da so bile te živali izpostavljene HEV (Meng, 2010b).

Vir okužbe pri živalih še ni natančno določen. Domnevajo, da je vir okužbe lahko voda, trava in užitno gozdno rastlinstvo, ki je kontaminirano z iztrebki različnih s HEV okuženih živali. Takšen vir okužbe in rezervoar pri okuženih živalih omogočata prenos HEV med živalskimi vrstami in s tem učinkovito širjenje okužbe znotraj živalske populacije v gozdu (Mushawar, 2008).

### **2.7.1 Domači prašiči in HEV**

Okužba prašičev s HEV je široko razširjena med prašičjimi farmami po vsem svetu. O tem poročajo tako iz držav v razvoju kot iz razvitih držav, ne glede na to, ali je hepatitis E na tistem področju endemski v človeški populaciji. Prašiči se običajno okužijo pri dveh do treh mesecih starosti. Okuženi prašiči imajo običajno prehodno viremijo, ki traja en do dva tedna. Viruse izločajo v iztrebku približno tri do sedem tednov. Večina odraslih prašičev ne izloča virusov, čeprav imajo protitelesa IgG proti HEV. Po svetu sta razširjena vsaj dva prašičja genotipa HEV, 3 in 4. Oba povzročata sporadične primere hepatitis E pri ljudeh (Meng, 2003). Tako kot pri ljudeh je tudi pri prašičih prenos HEV fekalno-oralen. Iztrebki okuženih prašičev vsebujejo veliko število kužnih virusov in so najverjetneje glavni vir za prenos virusa. Prašiči se domnevno okužijo z neposrednim stikom z okuženim prašičem ali z zaužitjem kontaminirane krme ali vode (Bouwknegt in sod., 2008).

Ker iztrebki okuženih prašičev vsebujejo veliko število virusov, lahko prašičji gnoj ali iztrebki kontaminirajo površinsko ali morsko vodo ter kasneje poljske pridelke ali školjke (Meng, 2010a). Okužba prašičev s HEV je pomembna na vseh zemljepisnih področjih, kjer se ukvarjajo s prašičerejo (Meng, 2003). Okuženi prašiči nimajo kliničnih znakov, so pa dokazali izločanje HEV (Halbur in sod., 2001).

## 2.8 KLINIČNI ZNAKI PRI ČLOVEKU

Značilni simptomi hepatitisa E vključujejo zlatenico, temen urin, anoreksijo, povečana, mehka jetra, povišano raven ALT, bolečine v trebuhu, občutljivost, ki jo spremljajo slabost, bruhanje in povišana telesna temperatura. Okužba običajno mine brez kliničnih znakov. O resnejšem poteku bolezni poročajo pri nosečnicah iz endemskih področij, kjer okužba pogosto povzroči akutno odpoved jeter in smrt v 15 do 20 %. Običajni zapleti med nosečnostjo so še spontani splav, prezgodnji porod ali smrt novorojenčka kmalu po rojstvu (Mushahwar, 2008).

Inkubacijska doba je dolga od dveh tednov do dveh mesecev, povprečno pa do bolezni preteče 40 dni. Viremija izgine pred pojavom kliničnih znakov. Izločanje virusov v iztrebkih se začne približno pet dni pred pojavom zlatenice in se zmanjša v dveh do treh tednih po pojavu zlatenice (Aggrawal in sod., 2000).

V 20-letni raziskavi o povezavi HEV z akutno odpovedjo jeter v nosečnosti so odkrili, da je smrtnost nosečnic podobna smrtnosti žensk, ki niso noseče (Bhatia in sod., 2008). Pri patogenezi ima vlogo več različnih dejavnikov kot so sev HEV (genotip in podgenotip), virusno breme in druge okužbe (Renou in sod., 2008). Genotipa 1 in 2 sta v primerjavi z genotipoma 3 in 4 bolj patogena za ljudi (Navaneethan in sod., 2008). Tako bi lahko razlika genotipov HEV v različnih zemljepisnih področjih razložila resnost okužbe s HEV med nosečnostjo. Po drugi strani pa so v Egiptu in južni Indiji, kjer prevladuje genotip 1, med nosečnostjo opazili nižjo smrtnost. To nakazuje, da so pri visoki stopnji smrtnosti nosečnic na drugih zemljepisnih področjih vpleteni drugi dejavniki (Navaneethan in sod., 2008). Verjetno so značilnosti HEV na določenem področju skupaj s hormonskimi in imunološkimi spremembami med nosečnostjo vzrok visoke smrtnosti (Renou in sod., 2008). Do danes še ni poročila o resnejši obliki hepatitisa E med nosečnostjo zaradi genotipa 3 (Navaneethan in sod., 2008).

Na Japonskem so izvedli primerjalno raziskavo kliničnega poteka akutne okužbe z genotipom 3 in 4. Ugotovili so, da so imeli bolniki, okuženi z genotipom 4, značilno višjo raven encima ALT. Poleg tega so bili bolniki, okuženi z genotipom 4, povprečno dlje časa

hospitalizirani (26,5 dni; bolniki, okuženi z genotipom 3, 18 dni). Bolniki z genotipom 4 so imeli resnejše zaplete kot bolniki, okuženi z genotipom 3 (Ohnishi in sod., 2006).

V nasprotju z virusi hepatitisa B in C, ki povzročajo kronično okužbo, naj bi HEV povzročali samoomejujoči akutni virusni hepatitis (Meng, 2010b). Dolgotrajna okužba s HEV se lahko pojavi pri imunsko oslabljenih bolnikih po presaditvi organov (Kamar in sod., 2008a). Pojav kronične okužbe pri imunsko oslabljenih bolnikih potrjujejo tudi Tamura A. in sod. (2007), Kamar in sod. (2008b) ter Haagsma in sod. (2008).

### **2.8.1 Diagnostika**

V diagnostične in epidemiološke namene uporabljajo serološke teste in teste pomnoževanja nukleinskih kislin. S serološkimi testi v bolnikovem serumu določajo protitelesa proti HEV (IgA, IgG, IgM). S testi pomnoževanja nukleinskih kislin v serumu, žolču ali iztrebku določajo virusno RNA (Mushawar, 2008).

## **2.9 HEV V OKOLJU**

Glede na poročila Svetovne zdravstvene organizacije zaradi kontaminirane vode in slabe higiene vsako leto umre 1,7 milijonov ljudi (Verma in Arankalle, 2009). Enterični virusi se z iztrebki izločajo v okolje v velikem številu in lahko kontaminirajo vodo, ki je namenjena uživanju, rekreaciji, kmetijski in prehrambeni dejavnosti, ter tako povzročijo izbruhe (Verma in Arankalle, 2009). Primer problema kontaminirane vode sta v svoji raziskavi podala Verma in Arankalle (2009). Enterične viruse so dokazali v reki ob mestu Puna v Indiji, ne pa tudi v zajetju pitne vode tega mesta. Prisotnost virusov v rekah predstavlja tveganje za javno zdravstvo v monsunkem obdobju, ko reka poplavlja. V primeru poškodovanih vodovodnih cevi, lahko pride do kontaminacije pitne vode (Verma in Arankalle, 2009).

### 2.9.1 Določanje HEV v okoljskih vzorcih

Z virološkimi analizami vode lahko ocenimo tveganje in sposobnost preživetja virusov v vodnem okolju. Predpogoj takšnih analiz je učinkovita, cenovno ugodna in preprosta metoda koncentriranja virusov, saj se le-ti v okoljskih vzorcih pojavljajo v zelo nizkem številu (Verma in Arankalle, 2009). Za koncentriranje virusov imamo na voljo več materialov: od gaze in steklenega prahu do elektronegativno nabite in elektropozitivno nabite membrane.

Za uspešno vezavo virusov moramo pri negativno nabitih filtrih v vzorcu zagotoviti kisel pH in dodati katione. Prednost membranske filtracije z uporabo pozitivno nabite membrane je v tem, da vzorcu pred koncentracijo ni potrebno dodati kationov in filtracijo lahko izvedemo pri nevtralnem pH (Verma in Arankalle, 2009). Enterični virusi, ki so v vodi, so namreč pri nevtralnem pH negativno nabiti in se vežejo na pozitivno nabit filter (Farrah in sod., 1981). Spiranje vezanih virusov z membrane po navadi poteka pri visokem pH z raztopino govejega ekstrakta, posnetega mleka v prahu, ureo ali bazičnih aminokislin (glicin, lizin). Viruse lahko dalje koncentriramo z metodami sekundarne koncentracije in jih določamo z metodami, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin (Verma in Arankalle, 2009).

## 2.10 PREPREČEVANJE OKUŽBE S HEV

Glavni način prenosa HEV je fekalno-oralni ali s kontaminirano vodo in hrano, zato mora biti preprečevanje okužbe usmerjeno v vzdrževanje neokrnjenosti vodnih zajetij in izboljšanje higienskih razmer z ustreznim ravnanjem in odstranjevanjem človeških in živalskih iztrebkov. Pozorni moramo biti pri pripravi hrane in se izogibati uživanju surovega ali premalo kuhanega mesa in zelenjave (Mushahwar, 2008). V ZDA je na prodajnih policah v trgovinah 11 % prašičjih jeter okuženih s HEV (Feagins in sod., 2007a). Ustrezna zaščita pred okužbo je 15-minutna toplotna obdelava hrane pri 56 °C (Emerson in sod., 2005; Feagins in sod., 2007b).

Glede na to, da obstaja zgolj en serotip HEV, je uporaba učinkovitega cepiva le še vprašanje časa. Znanstveniki iz Laboratorija za nalezljive bolezni (Bethesda, Maryland,

ZDA) so pod vodstvom dr. Roberta H. Purcella s pionirskim in vztrajnim delom uspešno pridobili možno cepivo proti HEV, ki vsebuje rekombinantno 56 kDa kapsidno beljakovino (Mushahwar, 2008). Pri ljudeh z visokim tveganjem okužb s HEV v Nepalju so dokazali, da cepivo uspešno preprečuje okužbo (Shrestha in sod., 2007). Ugotovili so, da je bilo cepivo varno in učinkovito v 95,5 %. S cepivom bi prenos HEV v svetu bistveno zmanjšali. Zagotavljalo bi namreč dolgotrajno imunost, kar je še posebno pomembno v endemskih državah s pogostimi izbruhi. Potrebne so nadaljnje raziskave, s katerimi bi pridobili informacije o trajanju imunosti, stroškovni učinkovitosti in tolerantnosti pri nosečnicah in otrocih (Mushahwar, 2008).

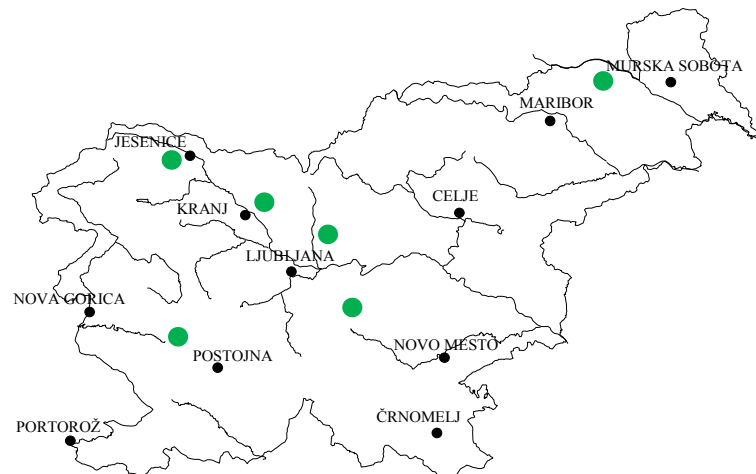
### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

###### 3.1.1.1 Prašičji vzorci

Prašičje iztrebke so v letih 2004 in 2005 v okviru predhodnih raziskav o medvrstnih prenosih različnih virusov zbrali na šestih slovenskih farmah z različnih zemljepisnih področij (Slika 5) (Steyer in sod., 2008; Zimšek-Mijovski in sod., 2010; Reuter in sod., 2010).



Slika 5: Zemljepisna porazdelitev prašičjih farm (zelene pike)

Vzorci iztrebkov so odvzeli prašičem v različnih starostnih skupinah: sesni (do treh tednov), odstavljeni (od treh do deset tednov) in pitani (več kot deset tednov). Zaradi lažjega pregleda večjega števila prašičev smo v določenih primerih uporabili le združke iz štirih ali petih vzorcev. Podatki o številu vzorcev so zbrani v Preglednici 1.

**Preglednica 1: Število testiranih vzorcev po starostnih skupinah prašičev in po vrsti vzorcev**

	<b>Posamezni vzorci</b>	<b>Združki vzorcev</b>
sesni	38	21
odstavljeni	21	14
pitani	26	16
SKUPAJ	85	51

### 3.1.1.2 Površinske vode

Odvzetih je bilo 60 vzorcev površinskih voda iz 18 slovenskih rek in 4 potokov v letih 2008 in 2009. Dva litra vode so odvzeli v sterilne steklenice in jih pri +4 °C prenesli v laboratorij. Testirani vzorci so bili odvzeti iz naslednjih rek in potokov:

- reke (število odvzetih vzorcev): Drava (5), Graben (2), Idrijca (2), Kamniška Bistrica (5), Krka (1), Ljubljanica (1), Matavun (1), Meža (4), Mislinja (4), Mura (8), Murica (1), Nadiža (2), Paka (2), Pivka (2), Sava (2), Soča (1), Vipava (10).
- potoki (število odvzetih vzorcev): Hercegovščak (2), Medlja (1), Potok (1), Trboveljščica (1).

## 3.1.2 Reagenti

### 3.1.2.1 Reagenti za pripravo iztrebkov

- fosfatni pufer, PBS (pH 7,4)

### 3.1.2.2 Reagenti za membransko filtracijo

- pufer TGBE (tris glicin z 1 % govejim ekstraktom) (pH 9,5)
- 1 N HCl
- fosfatni pufer, PBS (pH 7,4)

### 3.1.2.3 Reagenti za osamitev virusne RNA

- TRIZOL<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen)

- kloroform
- izopropanol
- 75 % etanol
- sterilna voda, prosta nukleaz
- epruvetke z ločevalnim gelom MaXtract™ (Qiagen)

#### 3.1.2.4 Reagenti za RT-PCR

- komplet reagentov SuperScript® One Step RT-PCR with Platinum® Polymerase (Invitrogen)
- začetni oligonukleotidi (Preglednica 2, RT-PCR)
- sterilna voda, prosta nukleaz

#### 3.1.2.5 Reagenti za vgnezdno PCR

- komplet reagentov *Tfi* DNA Polymerase (Invitrogen)
- začetni oligonukleotidi (Preglednica 2, vgnezdna PCR)
- sterilna voda, prosta nukleaz

#### 3.1.2.6 Začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih izbrali za dokazovanje HEV v vzorcih in pomnoževanje genomskih odsekov za filogenetsko analizo, so zbrani v Preglednici 2.



**Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za dokazovanje HEV (A) in pomnoževanje genomskih odsekov za filogenetsko analizo (B)**

	Reakcija	Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5' proti 3'	Dolžina pomnožka in mesto v genomu	Vir
A	RT-PCR	HE361-F	GCR GTG GTT TCT GGG GTG AC	164 bp 5302-5465 nt	Inoue in sod. (2006)
		HE364-R	CTG GGM YTG GTC DCG CCA AG		
	vgnezdena PCR	HE366-F	GYT GAT TCT CAG CCC TTC GC	137 bp 5325-5461 nt	
		HE363-R	GMY TGG TCD CGC CAA GHG GA		
B	RT-PCR	3156N-F	AAT TAT GCY CAG TAY CGR GTT G	731 bp 5697-6427 nt	Huang in sod. (2002)
		3157N-R	CCC TTR TCY TGC TGM GCA TTC TC		
	vgnezdena PCR	3158N-F	GTW ATG CTY TGC ATW CAT GGC T	348 bp 5982-6329 nt	
		3159N-R	AGC CGA CGA AAT CAA TTC TGT C		

Legenda: R = A ali G; M = A ali C; Y = T ali C; D = G, A ali T; H = A, T ali C; W = A ali T

F – pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid (ang. *forward*)

R – negativno usmerjen začetni oligonukleotid (ang. *reverse*)

### 3.1.2.7 Reagenti za čiščenje pomnožkov PCR

- komplet reagentov WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

### 3.1.2.8 Reagenti za določanje nukleotidnega zaporedja

- komplet reagentov za reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem)
- začetni oligonukleotidi (Preglednica 2, vgnezdena PCR)
- sterilna voda, prosta nukleaz
- komplet reagentov za čiščenje pomnožkov po reakciji določanja nukleotidnega zaporedja DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)
- formamid

### 3.1.2.9 Reagenti za agarozno elektroforezo

- čista agaroz (Invitrogen)
- 1× koncentrirani pufer TAE (tris acetat EDTA) (pH 8,3)
- etidijev bromid (5 mg/ml)
- nanašalno barvilo (Fermentas)
- molekularni označevalec 100 bp lestvica (Fermentas)

### 3.1.3 Potrošni material

- epruvete
- ultracentrifugirke
- epruvetke (0,2 ml, 1,5 ml)
- erlenmajerice
- nastavki za avtomatske pipete (StarLab)
- plastične pipete
- plastične bakteriološke zanke
- staničevina
- zaščitne rokavice

### 3.1.4 Laboratorijska oprema

- aparatura za dokumentiranje gelov GelDoc-It™ Imaging System (UVP)
- avtomatske pipete (0,5-10 µl, 2-20 µl, 50-200 µl, 10-1000 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf)
- biološka varnostna komora SMBC122 (Iskra PIO)
- brezprašna komora LFV9 (Iskra PIO)
- digestorij
- merilni valj
- mešalec Vibromix 313 EVT (Tehtnica)
- namizna centrifuga za izolacijo 5415R (Eppendorf)
- namizna centrifuga za pripravo vzorcev 5702R (Eppendorf)
- napajalnik za elektroforezo

- avtomatski sekvenator ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)
- sistem za membransko filtracijo (Sartorius)
- stojalo za epruvetke
- laboratorijska tehtnica
- termopomnoževalnik GenAmp System 2400 (Applied Biosystem)
- termopomnoževalnik GenAmp System 9700 (Applied Biosystem)
- ultracentrifuga L8-80M (Beckman)
- vakuumška centrifuga
- vakuumška črpalka (KNF Laboport)
- vibracijsko mešalo

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava vzorcev

#### 3.2.1.1 Prašičji iztrebki

V epruveto smo odpipetirali 1 ml fosfatnega pufru (PBS, ang. *phosphate buffer saline*) in dodali iztrebek na sledeči način:

- trd iztrebek smo v PBS prenesli s plastično bakteriološko zanko, da smo pripravili 10-20 % suspenzijo,
- tekoči iztrebek - odvzeli smo 100-200 µl in prenesli v PBS.

Epruveto smo premešali na vibracijskem mešalu in jo nato prenesli v namizno centrifugo 5702R (Eppendorf). Centrifugirali smo 5-10 minut pri 3.200 obratih na minuto (1.600 xg). Po končanem centrifugiranju smo supernatant prelili v 1,5 ml epruveto in ga do nadaljnje obdelave shranili pri -80 °C. Usedlino smo zavrgli.

#### 3.2.1.2 Površinske vode

Vzorci površinskih vod smo obdelali s koncentriranjem virusov iz vode z metodo membranske filtracije. Pri izvedbi membranske filtracije smo uporabili poliamidne pozitivno nabite membranske filtre Sartolon Polyamid (Sartorius) premera 47 mm in velikostjo por 0,45 µm. Celokupni površinski naboj HEV je negativen in se v območju nevtralne vrednosti pH (pH 7) zaradi tega virusi vežejo na pozitivno nabite filtre (Fong in sod., 2005; Verma in Arankalle, 2009). S filtra jih speremo z dodatkom pufru TGBE (triglicin z 1 % govejim ekstraktom) (pH 9,5) z močnim pozitivnim nabojem (Butot in sod., 2007; Croci in sod., 2008; Kovač in sod., 2009; Verma in Arankalle, 2009).

Pripravili smo vakuumsko črpalko in sistem za filtracijo (Sartorius), ki ga sestavljajo 2-litrska sesalna buča, stekleni nosilec za podlago filtra, podlaga filtra, klešče za stabilizacijo sistema, 250-mililitrska steklena časa. Koncentrirali smo 2 litra vzorca površinskih vod. Vkllopili smo vakuumsko črpalko in na membranski filter nalili 250 ml vzorca. Pazili smo, da se filter ni posušil in v čašo na filter vzorec prilivali, dokler nismo vsega porabili. Pustili smo, da je vsa tekočina stekla skozi filter. Filter smo po končani filtraciji s sterilno pinceto previdno prenesli v prazno sterilno petrijevko in pri tem pazili,

da filtra nismo obračali. Sledilo je spiranje virusov s filtra. Na filter v petrijevki smo nalili 5 ml pufru TGBE in petrijevko prenesli na mešalec Vibromix 313 EVT (Tehtnica). Vključili smo program horizontalnega mešanja pri 100 obratih na minuto. Po mešanju smo ves pufer iz petrijevke prenesli v ultracentrifugirko in dodali 500  $\mu$ l 1 N HCl za nevtralizacijo pufru. Ultracentrifugirke smo prenesli v ultracentrifugo L8-80M (Beckman) in pri 32.000 obratih na minuto ( $\sim$ 100.000  $xg$ ) pri 4 °C centrifugirali 1 uro. Po končanem ultracentrifugiranju smo supernatant zavrgli, usedlino pa razredčili z 250  $\mu$ l sterilnega PBS (pH 7,4). V ultracentrifugirko smo nanesti 750  $\mu$ l reagenta TRIZOL in nadaljevali z osamitvijo RNA.

### 3.2.2 Osamitev virusne RNA

Celokupno RNA iz vzorcev smo osamili (Chomczynski in Sacchi, 1987) in pri tem uporabili reagent TRIZOL<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen), ki med homogenizacijo ali lizo vzorca ohranja RNA neokrnjeno. Osamljena RNA ne vsebuje beljakovin in DNA ter je primerna za nadaljnjo analizo z molekularnimi metodami.

Celoten postopek osamitve RNA smo izvajali v brezprašni varnostni komori LVF9 (Iskra PIO). Pri delu smo uporabljali rokavice, ki smo jih med posameznimi stopnjami osamitve RNA menjali. Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno vodo, prosto nukleaz. Po koncu dela smo komoro obrisali s 70 % etanolom in vsaj za 30 minut vključili ultravijolično svetilko.

V 1,5 ml epruvetko smo prenesli 250  $\mu$ l vzorca iztrebka ali vode ter dodali 750  $\mu$ l ohlajenega reagenta TRIZOL<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen). Mešanico smo dobro premešali z avtomatsko pipeto in jo nato 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo dodali 200  $\mu$ l kloroforma. Epruvetko smo dobro premešali na vibracijskem mešalu. Vso vsebino epruvetke smo prenesli v epruvetko z ločevalnim gelom MaXtract High Density (Qiagen) in jo pri sobni temperaturi inkubirali 5-10 minut, da se je jasno ločila vodna faza od organske faze. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 14.000 obratih na minuto. Zgornjo vodno fazo, ki je vsebovala RNA, smo prenesli v novo 1,5 ml epruvetko in ji dodali 500  $\mu$ l ohlajenega izopropanola. Mešanico smo dobro premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Nato smo epruvetko centrifugirali 10 minut pri 16.000 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli, oborjeno RNA pa sprali s 500  $\mu$ l 75 %

etanola. Mešanico smo premešali na vibracijskem mešalu in jo 5 minut centrifugirali pri 9.300 obratih na minuto. Previdno smo odstranili supernatant in RNA sušili 15-30 minut na zraku v komori. Osušeno RNA smo razredčili s 30  $\mu$ l vode, proste nukleaz. Osamljene RNA vzorcev smo shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) omogoča hitro *in vitro* pomnoževanje želenih odsekov DNA z uporabo temperaturno obstojne polimeraze DNA. Pri virusih z RNA genomom je potreben predhodni prepis RNA v komplementarno zaporedje DNA, cDNA (ang. *complementary DNA*). Prepis omogoča encim reverzna transkriptaza (RT) (povzeto po Poljak, 1998). Za zaznavanje HEV v prašičjih in okoljskih vzorcih smo uporabili molekularno metodo vgnezdene verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR z vgnezdeno PCR). Za izvedbo reakcije potrebujemo dva para začetnih oligonukleotidov. Z zunanjim parom začetnih oligonukleotidov pomnožimo daljši odsek genomske cDNA, ki predstavlja tarčno DNA za pomnoževanje z drugim, notranjim parom začetnih oligonukleotidov. Pomnoževanje specifičnega odseka preverimo z gelsko elektroforezo.

#### 3.2.3.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Želeli smo določiti čim večje število krožečih različnih genotipov HEV, zato smo morali uporabiti široko specifične začetne oligonukleotide, ki nalegajo na visoko ohranjeno prekrivajočo regijo ORF2/ORF3 (Inoue in sod., 2006). Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi (Preglednica 2A) smo pomnoževali zaporedje 137 bp znotraj te prekrivajoče regije ORF2/ORF3.

#### 3.2.3.2 Pozitivne kontrole in preverjanje pogojev PCR

Za uspešen začetek dela smo potrebovali pozitivne kontrole HEV, ki smo jih pridobili v obliki liofilizirane virusne RNA od sodelavcev iz Veterinarske fakultete Univerze v Helsinkih iz Finske (dr. Leena Maunula, Oddelek za higieno živil in okolja). S štirimi pozitivnimi kontrolami smo preverili delovanje začetnih oligonukleotidov in pogoje za

pomnoževanje s PCR, povzete po objavi Inoue in sod. (2006), iz katere smo uporabili začetne oligonukleotide. Preverili smo vpliv predhodne denaturacije RNA pri 95 °C in zvišane koncentracije MgSO<sub>4</sub> v reakcijski mešanici.

### 3.2.3.3 RT-PCR

Pred nastavitvijo RT-PCR smo osamljeno RNA testiranih vzorcev denaturirali. V 0,2 ml epruvetko smo odpipetirali 3 µl destilirane vode in 1 µl 20 µM negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida in dodali 2 µl osamljene RNA. Mešanico smo v aparaturi GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) inkubirali 5 minut pri 95 °C. Za izvedbo RT-PCR smo uporabili komplet reagentov SuperScript® One Step RT-PCR with Platinum® Polymerase (Invitrogen), iz katerega smo uporabili 2× reakcijski puffer z dNTP-ji in MgSO<sub>4</sub> ter encimsko mešanico RT/Platinum® *Taq* z reverzno transkriptazo in polimerazo Platinum® *Taq* DNA. Po denaturaciji smo v epruvetko z denaturirano RNA dodali reagente do skupne prostornine 50 µl reakcije mešanice:

- 25 µl 2× reakcijskega pufra
- 1 µl pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (20 µM)
- 1 µl encimske mešanice RT/Platinum® *Taq*
- sterilno vodo, prosto nukleaz, do skupne prostornine 50 µl.

Prepis molekul RNA v cDNA z reverzno transkriptazo je potekal 30 minut pri 45 °C. Sledila je 2-minutna inkubacija pri 94 °C, s čimer smo inaktivirali reverzno transkriptazo in aktivirali polimerazo Platinum® *Taq* DNA. Sledilo je pomnoževanje cDNA v 40 ciklih:

- denaturacija cDNA: 15 sekund pri 94 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 58 °C
- pomnoževanje cDNA: 1 minuta pri 72 °C.

Zadnjemu ciklu je sledila dodatna 5-minutna inkubacija pri 72 °C ter ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

#### 3.2.3.4 Vgnezdena PCR

Uporabili smo reagente encimskega kompleta *Tfi* DNA Polymerase (Invitrogen), ki vsebuje 5× reakcijski pufer, 50 mM MgCl<sub>2</sub> in polimerazo *Tfi*. Poleg tega smo uporabili 10 mM dNTP Mix (Invitrogen) in ustrezne začetne oligonukleotide.

Pripravili smo 50 µl reakcijsko mešanico:

- 33 µl 5× reakcijskega puffra
- 2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl mešanice dNTP-jev
- 1 µl pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (20 µM)
- 1 µl negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida (20 µM)
- 1 µl polimeraze *Tfi*
- 1 µl pomnožene DNA
- sterilno vodo, prosto nukleaz, do skupne prostornine 50 µl.

Reakcijsko mešanico smo 2 minuti inkubirali pri 94 °C, s čimer smo aktivirali polimerazo *Tfi*. Sledilo je pomnoževanje v 40 ciklih:

- denaturacija DNA: 30 sekund pri 94 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 58 °C
- podaljševanje verige DNA: 1 minuto pri 72 °C.

Zadnjemu ciklu je sledila še 10-minutna inkubacija pri 72 °C in ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Pri vseh reakcijah smo vključili tudi pozitivno kontrolo, s katero smo določali pozitivne vzorce, in negativno kontrolo, s katero smo preverjali ustreznost izvedbe PCR. Za negativno kontrolo smo uporabili sterilno vodo, prosto nukleaz.

#### 3.2.3.5 Pomnoževanje odsekov za filogenetsko analizo

Vse vzorce smo najprej testirali z začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo pomnoževanje 137 bp dolgega odseka prekrivajoče regije ORF2/ORF3. Vzorce, pri katerih se je specifični odsek genoma HEV pomnoževal, smo testirali še z začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo pomnoževanje 348 bp dolgega odseka v regiji ORF2 (Preglednica 2B).



Pomnožene daljše odseke smo uporabili za filogenetsko analizo. Uporabili smo enake reagente in postopke priprave PCR kot predhodno pri reakcijah določanja HEV v vzorcih. Enaka sta bila tudi časovna in temperaturna poteka reakcij PCR. Glede na začetne oligonukleotide je bila spremenjena zgolj temperatura prileganja le-teh na tarčno molekulo DNA, ki znaša 42 °C.

Vse reakcije pomnoževanja smo izvedli v aparaturi GenAmp PCR System 2400 oz. GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem). Po končanem programu pomnoževanja smo pomnoženo DNA shranili pri 4 °C, za dlje časa pa pri -20 °C.

#### 3.2.3.6 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja odsekov s PCR smo preverili z elektroforezo v agaroznem gelu. Pomnožke PCR smo ločevali v 2 % agaroznem gelu. V čisto in suho erlenmajerico smo zatehtali 1,3 g čiste agaroze (Invitrogen) ter dodali 75 ml 1× koncentriranega pufra TAE (tris acetat EDTA). Raztopino smo segrevali do vrelišča oziroma toliko časa, dokler se vsa agarosa ni raztopila. Ohlajeni raztopini smo ob uporabi nitrilnih rokavic dodali 7 µl etidijevga bromida (5 mg/ml). Ta se vrine med bazne pare nukleinske kisline in pomnožke PCR lahko pod ultravijolično svetlobo vidimo. Raztopino z etidijevim bromidom smo rahlo premešali in vlili v plastičen nosilec, ki smo mu namestili glavniček, ki omogoča nastanek vdolbinic za vnos vzorcev. Odstranili smo morebitne mehurčke, ki so nastali pri vlivanju gela v nosilec in počakali, da se je gel strdil. Plastični nosilec s strjenim gelom smo prenesli v elektroforezno kadičko in jo napolnili z 1× koncentriranim pufrom TAE, tako da je bil s pufrom prekrit celoten gel. Previdno smo odstranili glavniček in pričeli z nanašanjem pomnoženih odsekov v vdolbinice gela. V vsako vdolbinico smo nanegli 3 µl nanašalnega barvila (Fermentas) in 10 µl vzorca. V prvo vdolbinico smo nanegli 10 µl molekularnega označevalca s 100 bp lestvico DNA (Fermentas), ki nam omogoča določanje velikosti pomnožkov PCR. Elektroforezno kadičko smo za 40 minut pri sobni temperaturi priklopili na vir napetosti (80 V). Gel smo v UV presvetljevalniku (GelDoc-It™ Imaging System, UVP) presvetlili z ultravijolično svetlobo in ga fotografirali.

### 3.2.3.7 Izračun pogostosti in verjetnosti okužbe s HEV

Rezultate smo želeli prikazati kot pogostost okužbe prašičev s HEV. Pri posameznih prašičjih vzorcih in površinskih vodah smo pogostost okužbe prašičev s HEV izračunali po naslednji enačbi:

$$p = \frac{\sum x}{\sum n} \quad \dots (1)$$

$p$  – pogostost okužbe prašičev s HEV;  $x$  – število pozitivnih vzorcev;  $n$  – število vseh testiranih vzorcev

Pri zdruških vzorcih smo verjetnost okužbe posameznega prašiča v skupini izračunali po enačbi, ki temelji na binomalni porazdelitvi (Norval in sod., 1990):

$$p = 1 - \left( \frac{n-x}{n} \right)^k \quad \dots (2)$$

$p$  – verjetnost okužbe posameznega prašiča s HEV;  $n$  – število testiranih skupin;  $x$  – število pozitivnih skupin;  $k$  – število prašičev v skupini

Na podlagi enačbe statističnega izračuna smo ocenili pogostost okužbe prašičev s HEV.

## 3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

### 3.2.4.1 Čiščenje pomnožkov PCR

Pred pripravo reakcije za določitev nukleotidnega zaporedja pomnožkov PCR moramo le-te očistiti, da odstranimo ostanke začetnih oligonukleotidov, deoksinukleotidov in polimeraze. Za čiščenje pomnožkov PCR smo uporabili komplet reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Čiščenje pomnožkov temelji na vezavi DNA na silika membrano v posebni koloni. Pomnožku PCR smo dodali 40 µl raztopine za vezavo na membrano Membrane Binding Solution. Pripravili smo si zbiralno epruvetko in v njo vstavili kolono z membrano. Pripravljeno mešanico smo previdno nanesli na membrano in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo kolono centrifugirali 1 minuto pri 14.000 obratih na minuto. Na membrano smo nanesli 700 µl spiralne raztopine za spiranje nečistoč s pomnožka PCR. Kolono smo centrifugirali 1 minuto pri 14.000 obratih na minuto. Tekočino v zbiralni epruvetki smo zavrgli. Spiranje

smo ponovili s 500 µl spiralne raztopine. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 14.000 obratih na minuto. Tekočino v zbiralni epruvetki smo zavrgli. Kolono smo nato centrifugirali še 1 minuto pri 14.000 obratih na minuto. Notranji pokrov centrifuge smo pustili odprt, da je ostanek etanola, ki je v spiralni raztopini, izhlapel. Zbiralno epruvetko smo zavrgli in kolono z membrano previdno prenesli v čisto 1,5 ml epruvetko. V kolono z membrano smo za spiranje PCR pomnožka v 1,5 ml epruvetko dodali 50 µl čiste vode brez nukleaz. Inkubirali smo 1 minuto pri sobni temperaturi, nato pa centrifugirali 1 minuto pri 14.000 obratih na minuto. Odstranili smo kolono z membrano, očiščen pomnožek PCR pa shranili pri -20 °C.

#### 3.2.4.2 Ocena koncentracije očiščenih pomnožkov PCR

Pred reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja moramo preveriti koncentracijo očiščene DNA. V ta namen smo pripravili 2 % agarozni gel (gl. Agarozna gelska elektroforeza). V vdolbinico smo nanесли 1 µl nanašalnega pufru (Fermentas) in 3 µl očiščenega pomnožka PCR. Elektroforeza je potekla v 15 minutah pri napetosti 100 V in pri sobni temperaturi. Gel smo nato pogledali pod ultravijolično svetlobo in ocenili jakost odsekov DNA.

#### 3.2.4.3 Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja

Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja v molekuli DNA temelji na Sangerjevi terminacijski metodi (Sanger in sod., 1977). Princip metode je *in vitro* sinteza DNA z uporabo označenih dideoksinukleozidtrifosfatov, ddNTP-jev, ki so specifični terminatorji reakcije. Za nastanek fosfodiestrskе vezi pri sintezi DNA je na mestu 3' na deoksiribozi že vgrajenega deoksinukleozidtrifosfata (dNTP) potrebna hidroksilna skupina. Če se v sintezo DNA namesto dNTP vgradi ddNTP, ki ima na mestu 3' na deoksiribozi vodik namesto hidroksilne skupine, se podaljševanje verige konča, saj nastanek fosfodiestrskе vezi z naslednjim dNTP ni možen. Vsak ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) je označen z drugim barvilom. Za izvedbo reakcije določanja nukleotidnega zaporedja smo uporabili komplet reagentov ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem). Za vsak očiščen pomnožek PCR smo pripravili dve reakciji, v katerih smo uporabili po en začetni oligonukleotid. Uporabili smo enake začetne

oligonukleotide kot pri vgnezdni PCR za dokazovanje HEV v vzorcih. Pri vzorcih, kjer je prišlo do pomnoževanja 348 bp dolgega odseka regije ORF2, smo uporabili začetne oligonukleotide vgnezdene reakcije. Reakcijska mešanica je vsebovala po en začetni oligonukleotid, polimerazo DNA FS (različica polimeraze DNA *Taq*), dNTP-je, ddNTP-je, reakcijski pufer in očiščeno DNA. Količino DNA smo dodali glede na oceno jakosti očiščenih pomnožkov po agarozni elektroforezi (gl. Ocena koncentracije očiščenih pomnožkov PCR).

Za reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja smo pripravili 20  $\mu$ l reakcijsko mešanico:

- 1-5  $\mu$ l očiščene DNA
- 1,3  $\mu$ l začetnega oligonukleotida (50  $\mu$ M)
- 2  $\mu$ l mešanice za določanje nukleotidnega zaporedja BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100
- 3  $\mu$ l reakcijskega pufera BigDye Terminator v3.1 5 $\times$ Sequencing Buffer
- sterilno vodo, prosto nukleaz, do skupne prostornine 20  $\mu$ l.

Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja je potekla v 25 ciklih, v katerih so si sledili:

- denaturacija DNA: 10 sekund pri 96 °C
- naleganje začetnih oligonukleotidov: 5 sekund pri 50 °C
- podaljševanje verige DNA: 4 minut pri 60 °C.

Zadnjemu ciklu je sledilo ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C. Reakcijo smo izvedli v aparaturi GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem).

Po reakciji določanja nukleotidnega zaporedja smo pomnožke DNA očistili z reagenti kompleta DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). Odstranili smo neporabljene začetne oligonukleotide, polimerazo FS, dNTP-je in ddNTP-je. Čiščenje pomnožkov temelji na vezavi DNA na gel v koloni. Kolone z gelom smo dobro premešali na vibracijskem mešalu, da se je gel enakomerno razporedil. Če so nastali mehurčki, smo jih odstranili. Pokrovček epruvetke smo delno odvili in odlomili spodnji del – s tem smo omogočili pretok tekočine skozi gel. Kolono z gelom smo vstavili v zbiralno epruvetko in centrifugirali 3 minute pri 3.000 obratih na minuto. Zbiralno epruvetko smo zavrgli,

kolono z gelom pa prenesli v svežo avtoklavirano 1,5 ml epruvetko. Na površino gela smo previdno nanесли 20  $\mu$ l mešanice reakcije določevanja nukleotidnega zaporedja. Pazili smo, da se z nastavkom za pipete nismo dotaknili površine gela. Epruvetko smo centrifugirali 3 minute pri 3.000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo kolono z gelom zavrgli, epruvetko z očiščenim pomnožkom pa prenesli v vakuumsko centrifugo, kjer smo ga posušili. Sušenje je trajalo približno 20 minut.

Epruvetke z očiščenimi in posušenimi pomnožki smo prenesli v digestorij, kjer smo v vsako epruveto dodali 25  $\mu$ l formamida. V formamidu smo DNA dobro raztopili in nato celotno količino prenesli v 0,2 ml epruvetke. V aparaturi GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) smo očiščene pomnožke denaturirali 2 minuti pri 95 °C, saj morajo biti pomnožki pred analizo z avtomatskim sekvenatorjem v enoverižni obliki. Epruvetke z denaturiranimi pomnožki smo prestavili v hladni blok in pri -20 °C inkubirali 5 minut. S tem smo preprečili ponovno združitev verig dvojne vijačnice. Po končani inkubaciji smo vsebino epruvetk prenesli v epruvetke za določanje nukleotidnega zaporedja in jih zatesnili z gumijastim zamaškom. Vsakega smo preverili, da je imel režo, ki je nujno potrebna za vstavev kapilare avtomatskega sekvenatorja. Epruvetke smo shranili pri -20 °C. Tako pripravljene pomnožke smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), ki pomnožke ločuje v kapilari s polimerom (POP6) in laserskim čitalcem, ki zaznava različno fluorescenco barvil, vezanih na ddNTP-jih.

#### 3.2.4.4 Filogenetska analiza zaporedij

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo računalniško obdelali s programskim paketom Vector NTI (Invitrogen). Vsako posamezno nukleotidno zaporedje smo pregledali in odrezali zaporedja začetnih oligonukleotidov. Tako urejene pare zaporedij pozitivno in negativno usmerjenih verig smo vzporedili s programom ContigExpress in sestavili v soglasno zaporedje. Soglasno zaporedje smo pregledali, neberljive konce smo odstranili in uredili morebitna neujemanja. Urejena nukleotidna zaporedja smo vnesli v spletni algoritem BLAST (NCBI, 2010a) in jih primerjali z zaporedji v genski banki. Nukleotidna zaporedja 348 bp dolgega odseka regije ORF2 smo uporabili za filogenetsko analizo in določanje sorodstvene povezave z referenčnimi sevi iz genske banke. Za umestitev

pridobljenih nukleotidnih zaporedij v genotipske podskupine HEV smo iz genske banke GenBank (NCBI, 2010b) preko spletnega servisa Entrez Nucleotide izbrali nukleotidna zaporedja različnih sevov HEV. Referenčni sevi različnih genotipov HEV so urejeni po imenu seva in vpisni številki: TK104/91/Nepal (AF020603), TK78/87/Nepal (AF020608), hev037 (X98292), mexican strain (M74506), JJT-Kan (AB091394), swJSZ1-1 (AB194524), swJ15-3 (AB094258), swJL82 (AB105898), S17\_p0 (AB525072), NLSW20 (AF336290), NLSW105 (AF336298), Arkell (AY115488), HEV-US1 (AF060668), Meng (AF082843), 01-19248-3 (AF466660), 01-21160-1 (AF466659), 941HRC (EF523420), HEV-Mars\_9205733 (GU994211), TLS21 (EU495193), 189\_Herd-10 (EU684329), P143/11/02 (AF503512), swJ8-6 (AB094231), Osh205 (AF455784), HEVSw/BO139/IT/06 (GU178998), swCH25 (AY594199).

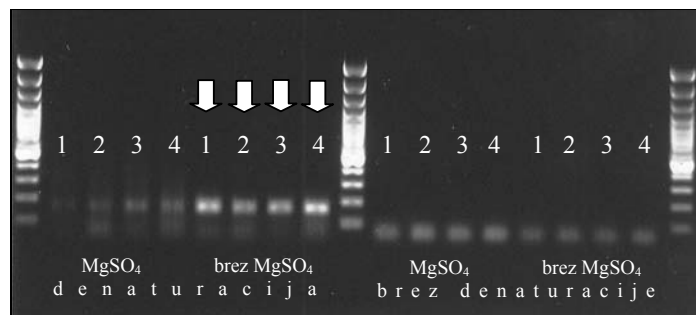
Filogenetsko analizo smo naredili s programskim paketom MEGA 4 (Tamura in sod., 2007). Zaporedja smo poravnali z algoritmom ClustalW. Za izračun filogenetskih razdalj med posameznimi zaporedji smo uporabili Kimurin dvoparametričnim model in iz matrike izračunanih razdalj z metodo povezovanja sosedov (ang. *neighbour-joining*) izrisali filogenetsko drevo. Z metodo vezanja (ang. *bootstrapping*) smo ga statistično ovrednotili. Vrednosti analize z metodo vezanja prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča na drevesu pri 1.000 ponovitvah (Fanedl in sod., 2002). Za izračun odstotkov nukleotidnega ujemanja med zaporedji referenčnih sevov in sevov iz naše raziskave smo s programom BioEdit (Hall, 1990) izračunali matriko nukleotidnega ujemanja.

Za izračun odstotkov nukleotidnega ujemanja 137 bp dolgega zaporedja prekrivajoče regije ORF2/ORF3 smo uporabili naslednje referenčne seve HEV, ki smo jih izbrali iz genske banke GenBank (NCBI, 2010b) preko spletnega servisa Entrez Nucleotide. Urejeni so po imenu seva in vpisni številki: Meng (AF082843), wbJYG1 (AB222184), swJ570 (AB073912), HEV-US2 (AF060669), JKK-Sap (AB074917), mexican strain (M74506), China (M94177).

## 4 REZULTATI

### 4.1 PREVERJANJE POGOJEV PCR

Pogoje pomnoževanja s PCR smo preverili s štirimi pozitivnimi kontrolami. Opazili smo, da pomnoževanje izbranih odsekov poteka najbolje, če vzorce predhodno denaturiramo pri 95 °C in če v reakcijski mešanici dodatno ne zvišujemo koncentracijo MgSO<sub>4</sub>. Rezultati so prikazani na Sliki 6.



**Slika 6:** Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR štirih vzorcev pozitivnih kontrol s predhodno 5-minutno denaturacijo pri 95 °C in brez nje ter z dodatkom MgSO<sub>4</sub> in brez njega. Najbolj jasne pasove opazimo pri pogojih s predhodno denaturacijo in brez dodatka MgSO<sub>4</sub> (puščice).

### 4.2 DOKAZ HEV V VZORCIH

#### 4.2.1 Prašičji vzorci

Skupno smo testirali 136 vzorcev prašičjih iztrebkov, od katerih smo RNA HEV dokazali v 40 vzorcih. Pri posameznih vzorcih smo izračunali odstotek pogostosti okužbe prašičev s HEV (Enačba 1), pri zdruških vzorcih pa odstotek verjetnosti okužbe prašičev s HEV (Enačba 2). Rezultati po starostnih skupinah prašičev in skupinah vzorcev so prikazani v Preglednici 3.

**Preglednica 3: Pogostost in verjetnost okužbe prašičev po pregledu posameznih in združkov vzorcev glede na starostne skupine prašičev**

	Posamezni vzorci			Združki vzorcev		
	skupaj	pozitivni	pogostost okužbe	skupaj	pozitivni	verjetnost okužbe
sesni	38	2	5,3 %	21	7	7,8 %
odstavljeni	21	6	28,6 %	14	6	10,6 %
pitani	26	7	26,9 %	16	12	24,2 %
SKUPAJ	85	15	20,3 %	51	25	14,2 %

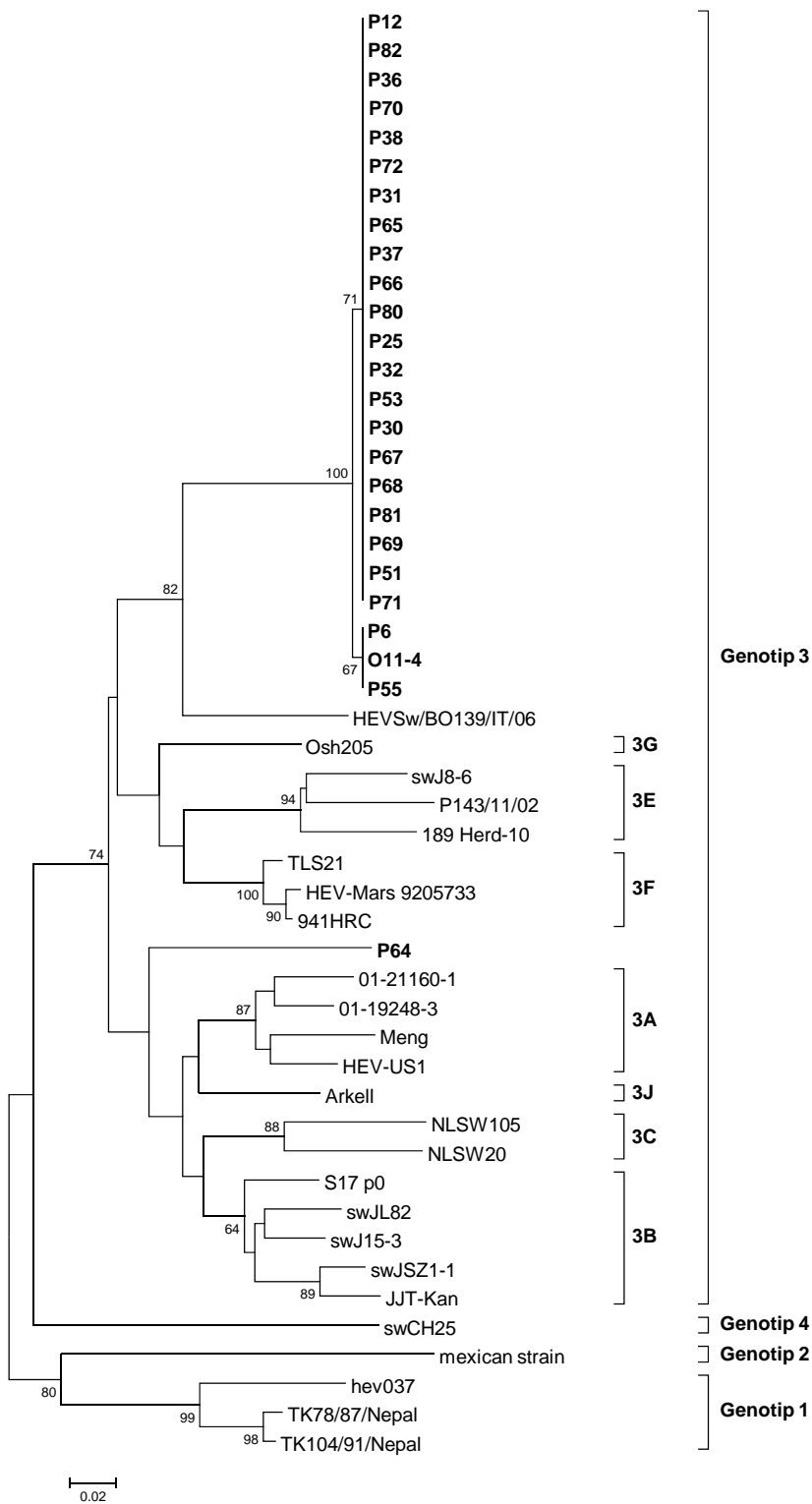
#### 4.2.2 Površinske vode

Izmed 60 testiranih površinskih vod smo virusno RNA dokazali v 3 vzorcih, in sicer v vzorcu iz Kamniške Bistrice, Save Bohinjke in Pivke. Pogostost okužbe testiranih površinskih vod s HEV smo izračunali po Enačbi 1 in je znašala 5 %.

### 4.3 FILOGENETSKA ANALIZA

RNA HEV iz 40 prašičjih vzorcev, ki smo jih dokazali s pomnoževanjem 137 bp dolgega odseka prekrivajoče se regije ORF2/ORF3, smo dodatno analizirali tako, da smo iz izhodne virusne RNA poskušali pomnožiti 348 bp dolgo zaporedje regije ORF2. Izmed 40 testiranih vzorcev smo daljši odsek uspeli pomnožiti pri 26 vzorcih. Pomnožene odseke smo uporabili za filogenetsko analizo. Pridobljena nukleotidna zaporedja pomnoženih odsekov smo uredili s programskim paketom Vector NTI (Invitrogen). Ustrezno smo uredili vsa zaporedja, razen P58, ki ga zaradi slabe kvalitete analize nukleotidnega zaporedja nismo vključili v filogenetsko analizo. Po obdelavi smo dobili 251 bp dolga soglasna zaporedja. Filogenetsko analizo smo opravili s programskim paketom MEGA 4 (Tamura in sod., 2007). Urejena zaporedja smo poravnali z algoritmom Clustal W (Priloga A). V filogenetsko analizo smo uvedli referenčne seve različnih genotipov in genotipske linije genotipa 3. Na podlagi vrednosti distančne matrike, ki smo jo izračunali s Kimurinim dvoparametričnim modelom, smo z metodo povezovanja sosedov (ang. *neighbour joining*) izrisali filogenetsko drevo, ki smo ga statistično ovrednotili z metodo vezanja (ang. *bootstrapping*) (1.000 ponovitev) (Slika 7).





Slika 7: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij 348 bp dolgega odseka regije ORF2 virusnega genoma HEV iz prašičev, testiranih v tej raziskavi (krepki tisk), in referenčnih sevov HEV

Ugotovili smo, da se vsi prašičji sevi HEV iz naše raziskave na filogenetskem drevesu uvrščajo znotraj genotipa 3. S programom BioEdit (Hall, 1990) smo izračunali matriko nukleotidnega ujemanja med predstavniki prašičjih sevov HEV iz naše raziskave in referenčnimi sevi HEV iz genske banke. Vrednosti v odstotkih so prikazani v Preglednici 4.

**Preglednica 4: Odstotek nukleotidnega ujemanja predstavnikov prašičjih sevov HEV treh različnih genotipskih skupin znotraj genotipa 3 iz naše raziskave (krepki tisk, senčeno) med seboj ter z referenčnimi sevi predstavnikov podtipov genotipov 3, 1, 2 in 4 na podlagi 348 bp dolgega odseka regije ORF2**

	<b>P64</b>	<b>P6</b>	<b>P69</b>
<b>P64</b>	-	81,7	81,4
<b>P6</b>	81,7	-	98,4
<b>P69</b>	81,4	98,4	-
Meng (Genotip 3A)	82,7	80,1	80,8
JJT-Kan (Genotip 3B)	84,3	81,1	81,4
NLSW20 (Genotip 3C)	84,0	79,2	80,1
P143/11/02 (Genotip 3E)	81,1	79,8	79,2
HEV-Mars_9205733 (Genotip 3F)	82,1	84,0	84,6
Osh205 (Genotip 3G)	80,8	82,7	82,4
Arkell (Genotip 3J)	84,3	84,3	84,0
hev037 (Genotip 1B)	74,4	77,9	78,5
mexican strain (Genotip 2A)	74,1	72,8	73,8
swCH25 (Genotip 4D)	75,0	77,9	76,9

Pri preostalih 14 prašičjih vzorcih in treh pozitivnih vzorcih vod, kjer daljšega odseka (348 bp) regije ORF2 nismo uspeli pomnožiti, smo po določitvi nukleotidnega zaporedja in vzporeditvi pozitivno in negativno usmerjenih začetnih oligonukleotidov odstotek nukleotidnega ujemanja izračunali na krajših, 137 bp dolgih odsekih prekrivajoče se regije ORF2/ORF3. Rezultati so podani v Preglednici 5, kjer smo za primerjavo z referenčnimi sevi HEV izbrali 7 sevov, določenih pri prašičih, in 2 seva, dokazana v vzorcih vod.

**Preglednica 5:** Odstotek nukleotidnega ujemanja sevov HEV določenih v vzorcih površinskih voda (V26/08, V165/08) in sedmih prašičjih sevov HEV iz naše raziskave (krepki tisk, senčeno) z referenčnimi sevi predstavnikov genotipov 3, 1, 2 in 4 na podlagi 137 bp dolgega odseka prekrivajoče se regije ORF2/ORF3

		Površinske vode	
		V26_08_HE363	V165_09_HE363
Prašiči	<b>23_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>40_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>50_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>O11_2_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>O17_2_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>P14_1_HE363</b>	100,0	100,0
	<b>P14_2_HE363</b>	100,0	100,0
	Meng (Genotip 3)	94,8	94,8
	wbJYG1 (Genotip 3)	94,8	94,8
	swJ570 (Genotip 3)	96,1	96,1
	HEV-US2 (Genotip 3)	96,1	96,1
	China (Genotip 1)	44,3	44,3
	mexican strain (Genotip 2)	44,3	44,3
	JKK-Sap (Genotip 4)	82,0	82,0

Vsa obdelana zaporedja smo pred filogenetsko analizo vnesli v spletni algoritem BLAST (NCBI, 2010a), kjer smo zaporedja primerjali z zapisi v genski banki in potrdili, da so v naši raziskavi pridobljena nukleotidna zaporedja najsorodnejša s HEV, genotip 3. Nejasne zadetke z nizko podobnostjo nukleotidnega zaporedja smo opazili zgolj pri nukleotidnem zaporedju, ki smo ga dokazali v vzorcu površinske vode iz Save Bohinjke.

Prašičje seve, pri katerih smo uspeli pomnožiti 348 bp dolg odsek regije ORF2, bomo vnesli v gensko banko GenBank (NCBI, 2010b).

## 5 RAZPRAVA

Hepatitis E še zdaleč ni več problem zgolj endemskih držav v razvoju, ampak predstavlja pomembno bolezen javnega zdravstva tudi v razvitih državah. V zadnjem času se število sporadičnih primerov v razvitih državah povečuje, večinoma zaradi zoonotskih genotipov 3 in 4 HEV (Meng, 2010a). Pomemben rezervoar HEV so domači prašiči, ki so glede na evropske in svetovne raziskave okuženi v razmeroma visokem odstotku (Rutjes in sod., 2007; Forgách in sod., 2010; Huang in sod., 2002). Z našo raziskavo smo določili pogostost okužbe prašičev na testiranih slovenskih farmah. Zanimalo nas je tudi, ali so testirane slovenske površinske vode kontaminirane s HEV. V ta namen smo uporabili molekularno metodo RT-PCR z vgnezdno PCR s široko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Dokazane HEV smo z uporabo filogenetskih orodij uvrstili v genotipske skupine.

### 5.1 PREVERJANJE POGOJEV PCR

S preverjanjem pogojev pomnoževanja s PCR smo ugotovili, da pomnoževanje najučinkoviteje poteka ob predhodni denaturaciji RNA pri 95 °C in brez dodatnega višanja koncentracije MgSO<sub>4</sub>. Najverjetneje z denaturacijo razbijemo morebitne sekundarne strukture v RNA. Tvorba sekundarnih struktur v RNA lahko ovira vezavo začetnih oligonukleotidov ali prekrije mesto za vezavo začetnih oligonukleotidov znotraj zvite sekundarne strukture (Wei in To, 2003). Predhodna denaturacija tako omogoča razvitje RNA in pravilno naleganje začetnih oligonukleotidov na tarčna mesta. Dodatek MgSO<sub>4</sub> v reakcijsko mešanico sicer stabilizira polimerazo, vendar pa hkrati vpliva na nespecifično vezavo začetnih oligonukleotidov. Ker je v našem primeru dodatek MgSO<sub>4</sub> zaviral pomnoževanje, smo ga v nadaljnji analizi izpustili.

### 5.2 DOKAZ HEV V VZORCIH

Po pričakovanjih smo dokazali, da se HEV pri domačih prašičih na slovenskih farmah pojavlja v razmeroma visokem odstotku (20,3 % po pregledu posameznih vzorcev; 14,2 % po pregledu združkov vzorcev), kar je primerljivo z drugimi evropskimi državami kot so

Italija, Madžarska in Nizozemska (Di Bartolo in sod., 2006; Martelli in sod., 2010; Forgách in sod., 2010; van der Poel in sod., 2001; Rutjes in sod., 2009). Pri interpretaciji rezultatov smo testirane vzorce razdelili na dva sklopa: posamezne vzorce prašičjih iztrebkov in združke posameznih vzorcev. Pri naši raziskavi smo namreč uporabili vzorce, ki so vključeni v eno izmed evropskih raziskav. Odvzete vzorce so zaradi velikega števila in lažjega testiranja združili v skupine po štiri ali pet vzorcev. Posameznih vzorcev nekaterih združkov nismo obdržali, zato imamo ponekod v raziskavo zajete zgolj združke vzorcev, ne pa posameznih vzorcev iz teh združkov. Skupna verjetnost okužbe pri združkih vzorcev je precej nizka v primerjavi s skupno pogostostjo okužbe pri posameznih vzorcih. Možen vzrok za to odstopanje bi lahko bil v znižani občutljivosti zaznavanja HEV v združenih vzorcih. Pri združevanju vzorcev smo le-te v pripravljenih 10 % suspenzijah še dodatno redčili za faktor števila združenih vzorcev ( $4\times-5\times$  redčenje). Torej je bila koncentracija virusne RNA v združkih mnogo manjša kot bi bila, če bi testirali posamezne vzorce. Dodatno smo pri testiranju prašičjih vzorcev opazili, da se virusi verjetno izločajo v razmeroma nizkih koncentracijah, saj smo večino dokazali le z vgnezdno PCR ob pomnoževanju kratkega, 137 bp dolgega odseka ohranjene regije genoma. Verjetno je realen podatek o pogostosti okužbe prašičev s HEV v Slovenji lahko nekoliko višji. Glede na rezultate (Preglednica 3) opazimo, da je verjetnost okužbe po pregledu združkov vzorcev pri odstavljenih in pitanih prašičih manjša kot je pogostost okužbe po pregledu posameznih vzorcev, večja pa je pri sesnih prašičih. Pogostost okužbe prašičev s HEV je po pregledu obeh skupin vzorcev najmanjša pri sesnih prašičih (do treh tednov). Pri obeh skupinah je pogostost pri pitanih prašičih (več kot deset tednov) velika in primerljiva med obema skupinama. Največje odstopanje lahko opazimo pri odstavljenih prašičih (od treh do deset tednov), kjer je pogostost okužbe po pregledu posameznih vzorcev bistveno večja od verjetnosti okužbe po pregledu združkov vzorcev. Rezultati bi bili bolj verodostojni, če bi imeli vzorce od vseh v raziskavo vključenih prašičev in ne bi imeli združkov vzorcev. V raziskavi so združki vzorcev testirani zgolj pri eni izmed večjih prašičjih farm v Sloveniji, pri drugih testiranih farmah pa imamo izključno posamezne vzorce.

V naši raziskavi smo želeli prikazati pogostost HEV pri domačih prašičih v celotni Sloveniji, zato smo izbrali več prašičjih farm na različnih geografskih področjih. Pri nekaterih farmah smo imeli malo vzorcev, zato ni bilo smiselno računati pogostosti HEV

po posameznih farmah ali regijah. Za tovrstne podatke bi morale biti vzorčenje bolj enakomerno.

Po pričakovanjih smo HEV dokazali tudi v površinskih vodah. RNA HEV smo dokazali v treh izmed 60 vodnih vzorcev. Potrdili smo naše domneve, da se HEV lahko pojavlja tudi v površinskih vodah in s tem v okolju. V naši raziskavi smo HEV v vzorcih dokazovali s pomnoževanjem cDNA odseka virusnega genoma. Potrditev nukleinske kisline HEV v vzorcih vsekakor ne dokazuje kužnega virusa. Kužnost HEV bi lahko preverili na živalskem modelu z izpostavitvijo živali s HEV okuženim vodnim vzorcem (Kasorndorkbua in sod., 2005).

Pri dokazovanju HEV iz prašičjih iztrebkov in površinskih vod smo uporabili molekularno metodo vgnezdene PCR. Izbrana metoda je primerna, kadar pričakujemo, da so virusi v vzorcih prisotni v nizkih koncentracijah, saj je s tem nizka tudi koncentracija virusnih nukleinskih kislin. Nizko koncentracijo virusov smo kljub koncentriranju pričakovali pri površinskih vodah. Izkazalo se je, da je bila metoda primerna tudi za združke prašičjih vzorcev. Prednost metode je tudi visoka občutljivost. Tako smo v vzorcih, kjer je bil HEV prisoten, le-tega najverjetneje tudi zares dokazali. Občutljivost metode smo dodatno povečali z izbiro začetnih nukleotidov, ki pomnožujejo kratko regijo genoma HEV (137 bp ORF2/ORF3).

Vzorčenje prašičjih in vodnih vzorcev je potekalo v dveh različnih obdobjih. Za bolj primerljive rezultate bi bilo potrebno vzorčenje na prašičjih farmah in v površinskih vodah opraviti v enakem obdobju. Prašičji vzorci so iz let 2004 in 2005, medtem ko so vzorce površinskih vod odvzeli v letih 2008 in 2009. Naši rezultati kažejo zgolj pogostost HEV znotraj populacije prašičev in testiranih vod v danem obdobju vzorčenja.

### 5.3 FILOGENETSKA ANALIZA

HEV iz prašičjih vzorcev, testiranih v tej raziskavi, so se pri filogenetski analizi po pričakovanjih uvrstili znotraj genotipa 3, ki je edini genotip HEV, ki se pojavlja v Evropi (Okamoto, 2007). Vsi prašičji HEV iz naše raziskave, z izjemo vzorca P64, se uvrščajo v

posebno skupino znotraj genotipa 3, ločeno od izbranih referenčnih sevov. Najbolj sorodni so sevu HEVSw/Bo139/IT/06, ki so ga osamili iz prašičev v Italiji (Martelli in sod., 2010) (Slika 7), kar bi lahko nakazovalo na možnost širjenja HEV z mednarodno preprodajo živali. Pri filogenetski analizi se sevi HEV testiranih prašičjih vzorcev razdelijo v tri skupne. Najbolj podoben izbranim referenčnim sevom je HEV P64, ki tvori svojo skupino. Znotraj ločene skupine prašičjih HEV iz naše raziskave opazimo dve različni skupini, ki se delita z visoko vrednostjo metode vezanja (ang. *bootstrapping*). V eni skupini so vzorci P6, O11-4 in P55, v drugo skupino pa se uvrščajo vsi preostali prašičji sevi HEV iz naše raziskave. Omenjene tri seve iz prve skupine smo dokazali iz dveh različnih farm. Najverjetneje znotraj ene farme kroži več različnih sevov HEV. Predvidevamo, da je selitev prašičev med farmami redka in se prašiče večinoma vzreja za zakol, zato do premeščanj ne pride. Možno je, da HEV preide na prašiče s krmo, ki je kontaminirana s HEV in enako krmo uporablja več farm. Glede na filogenetsko drevo (Slika 7) lahko sklepamo, da HEV iz testiranih prašičjih iztrebkov predstavljajo novo linijo znotraj genotipa 3 ali pa se uvrščajo v podskupine genotipa 3, ki jih zaradi pomanjkljivih podatkov v genski banki nismo uvrstili v našo analizo. To se sklada tudi z nukleotidno poravnavo 348 bp dolgih zaporedij HEV iz testiranih prašičev, saj so si HEV med seboj zelo podobni (Priloga A), a hkrati zelo različni v primerjavi z izbranimi referenčnimi sevi HEV. Od večine slovenskih sevov HEV iz naše raziskave se močno razlikuje le sev P64, ki se, kot že rečeno, uvršča v ločeno linijo. Ugotovitev se sklada tudi z odstotki nukleotidnega ujemanja, ki so prikazani v Preglednici 4, kjer opazimo, da je odstotek nukleotidnega ujemanja P64 s predstavnikoma ostalih dveh skupin HEV (P6 in P69) nižji kot to ujemanje znaša med tema dvema predstavnikoma. Opazimo tudi, da so glede na nukleotidno ujemanje prašičji sevi iz naše raziskave najbolj podobni genotipu 3, manj genotipu 4, najmanj pa genotipu 1 in 2. To se ujema z dejstvom, da se sevi genotipov 1 in 2 pojavljajo izključno pri ljudeh in ne okužujejo živali (Meng, 2010b).

V filogenetsko analizo vodnih vzorcev smo izmed treh pozitivnih vzorcev zajeli zaporedji dveh. Eno zaporedje (vzorec iz Save Bohinjke) namreč močno odstopa od preostalih dveh (vzorec iz Kamniške Bistrice in Pivke), hkrati je analiza nukleotidnega zaporedja bila nezanesljiva, zato smo se odločili, da tega zaporedja ne bomo uvrstili v filogenetsko analizo. Nezanesljive rezultate smo dobili tudi v spletnem algoritmu BLAST (NCBI,

2010a), ki poleg genotipa 3 vrne tudi druge genotipe. Testirana zaporedja so zelo kratka in pri takšnem odstopanju težko zanesljivo trdimo, katero nukleotidno zaporedje smo pomnožili. Glede na to, da se odstopajoče zaporedje močno razlikuje tako od vodnih kot od prašičjih sevov HEV, je verjetno, da je vir katera druga žival, morda divji prašič ali srnjad, ki je prav tako lahko rezervoar za HEV (Meng, 2010a). Za natančno določitev bi bile potrebne nadaljnje analize tega odstopajočega seva. Za verodostojne rezultate bi lahko pomnožili daljši odsek virusne RNA tega vzorca in ga nato primerjali z referenčnimi sevi v genski banki. Ostala dva vodna seva iz Kamniške Bistrice in Pivke se v nukleotidnem zaporedju 137 bp dolgega odseka prekrivajoče regije ORF2/ORF3 ujemata v 100 % s sedmimi izbranimi testiranimi prašičjimi sevi HEV (Preglednica 5). Glede na te rezultate bi lahko sklepali, da je mogoča povezava med prašičjimi in vodnimi sevi HEV. Ker pa vzorčenje ni bilo istočasno, sklepamo, da prašičji sevi lahko ostanejo v okolju dalj časa. Da bi ugotovili, ali smo dokazali celo isti sev HEV, bi bile potrebne nadaljnje analize, testirati bi morali koeficient sorodstvene povezave na podlagi večjega odseka genoma. HEV, podoben prašičjim na testiranih slovenskih farmah, se očitno pojavlja tudi v okolju. To se sklada z dejstvom, da smo en pozitiven vzorec vode odvzeli v neposredni bližini ene izmed večjih prašičjih farm v Sloveniji. To bi lahko sprožilo razmislek o učinkovitosti čistilnih naprav na prašičjih farmah ali vplivu gnojenja kmetijskih površin s prašičjimi iztrebki. Kontaminirane rekreacijske vode s HEV bi lahko predstavljale mogoč vir okužbe.

## 5.4 ZAKLJUČEK

Z našo raziskavo in to diplomsko nalogo smo posegli v neraziskano področje v slovenskem prostoru. Odkrili smo, da so prašiči na testiranih slovenskih farmah okuženi s HEV v razmeroma visokem odstotku. Glede na to, da je hepatitis E opredeljen kot zoonoza (Meng, 2010a), je prenos okužbe na slovenske prašičerejce verjeten. Zaskrbljujoče pa je tudi dejstvo, da smo HEV dokazali v testiranih slovenskih površinskih vodah. Nadaljnje raziskave bi bile lahko usmerjene v iskanje HEV pri gozdnih živalih, predvsem divjih prašičih in srnjadi v Sloveniji, saj predstavljajo poleg domačih prašičev možen virusni rezervoar.



## 6 SKLEPI

- Pogostost HEV pri testiranih domačih prašičih v Sloveniji je po pregledu posameznih vzorcev 20,3 % (verjetnost okužbe po pregledu združkov vzorcev je 14,2 %).
- Največja pogostost HEV pri domačih prašičih je v skupini pitanih in odstavljenih prašičev, najmanjšo pogostost pa smo zaznali pri sesnih prašičih.
- Pri filogenetski analizi smo odkrili, da so v raziskavo zajeti prašičji sevi HEV glede na nukleotidno zaporedje 348 bp dolgega odseka regije ORF2 med seboj zelo podobni, a različni v primerjavi z izbranimi referenčnimi sevi.
- Večina analiziranih prašičjih sevov HEV se uvršča v ločeno skupino znotraj izbranih referenčnih sevov HEV genotipa 3 (Slika 7).
- Po pričakovanjih smo HEV dokazali tudi v okoljskih vzorcih, tj. v površinskih vodah. Po pregledu vzorcev površinskih voda smo HEV dokazali v 5 %.
- HEV smo dokazali tudi v reki, ki teče v neposredni bližini prašičje farme, kar se sklada s teorijo o kontaminaciji površinskih vod z živalskimi izločki. Analiza nukleotidnega ujemanja 137 bp dolgega zaporedja regije ORF2/ORF3 vodnih in prašičjih sevov, testiranih v naši raziskavi, kaže na 100 % ujemanje le-teh.

## 7 POVZETEK

HEV predstavljajo v svetu pereč problem javnega zdravstva, hkrati pa raziskovalno področje HEV dobiva nove razsežnosti. Pri človeku povzroča okužba s HEV akutni hepatitis. Resnejši potek bolezni z mogočim smrtnim izidom opazimo pri nosečnicah. V endemskih tropskih in subtropskih državah Azije, Afrike in Latinske Amerike povzročajo HEV obsežne epidemije, ki so posledica slabih higienskih razmer in stika s kontaminirano vodo. V razvitih državah sporadični primeri bolezni naraščajo, predvsem zaradi uživanja kontaminirane hrane in stika z okuženo živaljo. Potovanje v endemska področja hepatitisa E ni več edini znani dejavnik tveganja. Dokazano je namreč, da je hepatitis E zoonoza in da pomemben rezervoar HEV predstavljajo domači prašiči, verjetno pa tudi nekatere druge divje in domače živali. Genotipska mnogoličnost sevov HEV je velika. Obstajajo vsaj štiri večje genotipske skupine. Genotipa 1 in 2 se pojavljata izključno pri človeku in povzročata epidemije v endemskih državah. Genotipa 3 in 4 vključujeta tako človeške kot živalske seve HEV in sta razlog za pojav sporadičnih primerov tako v razvitem svetu kot v državah v razvoju. V nasprotju z veliko genotipsko raznolikostjo pa obstaja zgolj en serotip HEV.

V naši raziskavi smo dokazovali RNA HEV v iztrebkih prašičev iz 6 slovenskih farm in v vzorcih voda iz 22 vzorčnih mest slovenskih rek in potokov. Vzorce smo analizirali z molekularno metodo RT-PCR in vgnezdno PCR. Uporabili smo široko specifične začetne oligonukleotide. Pregledali smo 85 posameznih prašičjih iztrebkov, od tega 38 vzorcev sesnih, 21 odstavljenih in 26 pitanih prašičev. Poleg tega smo pregledali 51 združkov prašičjih iztrebkov, od tega 21 združkov sesnih, 14 združkov odstavljenih, 16 združkov pitanih prašičev. Testirali smo 60 vzorcev površinskih voda. Okoljske vzorce smo predhodno koncentrirali z membransko filtracijo in koncentrirane vzorce nato ultracentrifugirali. Zanimala nas je genotipska raznovrstnost dokazanih sevov HEV, zato smo s filogenetskimi orodji opravili analizo z izbranimi referenčnimi sevi HEV, ki smo jih pridobili iz genske banke GenBank (NCBI, 2010b).

HEV smo dokazali pri skupno 40/136 prašičjih vzorcih. Pri posameznih vzorcih smo HEV dokazali v 15/85 vzorcih, od tega 2/38 pri sesnih, 6/21 pri odstavljenih in 7/26 pri pitanih

prašičih. Pri zdruških vzorcev smo pomnoževanje dela virusnega genoma dokazali pri 25/51 zdruških, od tega je bilo 7/21 sesnih, 6/14 odstavljenih, 12/16 pitanih združkov prašičev. Pogostost okužbe s HEV pri domačih prašičih na slovenskih farmah je bila po pregledu posameznih vzorcev 20,3 %, verjetnost okužbe s HEV pa je bila po pregledu združkov 14,2 %. HEV smo dokazali pri 3/60 vodnih vzorcih, kar pomeni, da smo HEV dokazali pri 5 % testiranih površinskih vod. Pri filogenetski analizi pomnoženega odseka genoma HEV znotraj ORF2 smo ugotovili, da se dokazani prašičji sevi HEV uvrščajo v samostojno skupino znotraj genotipa 3, ki najverjetneje predstavljajo novo genotipsko linijo. Opazili smo še, da med testiranimi prašiči očitno krožijo trije različni genotipski sevi. Analiza nukleotidnega ujemanja kratkega pomnoženega zaporedja znotraj prekrivajoče regije ORF2/ORF3 testiranih prašičjih in vodnih sevov HEV je pokazala, da se ta ujemajo v 100 %.

Z našo raziskavo smo pokazali, da se HEV pri domačih prašičih na slovenskih farmah pojavljajo v razmeroma visokem odstotku, največjo pogostost okužbe pa smo dokazali v skupini odstavljenih in pitanih prašičev. Glede na to, da je hepatitis E zoonoza, so prašičerejci tvegana skupina za okužbo s HEV. Z analizo vzorcev slovenskih površinskih vod smo dokazali, da se HEV pojavljajo tudi v okolju. Glede na 100 % nukleotidno ujemanje pomnoženega dela virusnega genoma vodnih sevov HEV in testiranih prašičjih sevov predstavljajo prašičje farme najverjetnejši dejavnik tveganja za prenos HEV v okolje.

## 8 VIRI

- Aggrawal R., Kini D., Sofat S., Naik S. R., Krawczynski K. 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*, 356: 1081-1082
- Aggarwal R., Naik S. R. 1994. Hepatitis E: Intrafamilial transmission versus waterborne spread. *Journal of Hepatology*, 21, 5: 718-723
- Aye T. T., Uchida T., Ma X. Z., Iida F., Shikata T., Zhuang H., Win K. M. 1992. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Research*, 20, 13: 3512-3512
- Balayan M. S., Andjaparidze A. G., Savinskaya S. S., Ketiladze E. S., Braginsky D. M., Savinov A. P., Poleschuk V. F. 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 20, 1: 23-31
- Banks M., Bendall R., Grierson S., Heath G., Mitchell J., Dalton H. 2004. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 5: 953-955
- Bhatia V., Singhal A., Panda S. K., Acharya S. K. 2008. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: Is the prognosis really worse? *Hepatology*, 48, 5: 1577-1585
- Bouwknegt M., Frankena K., Rutjes S. A., Wellenberg G. J., de Roda Husman A. M., van der Poel W. H. M., de Jong M. C. M. 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Veterinary Research*, 39, 5: 40-50
- Butot S., Putallaz T., Sánchez G. 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1: 186-192

- Chen G. B., Meng H. J. 2004. Identification of 5' capped structure and 3' terminal sequence of hepatitis E virus isolated from Morocco. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 14: 2045-2049
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159
- Clemente-Casares P., Pina S., Buti M., Jardi R., Martin M., Bofill-Mas S., Girones R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 4: 448-454
- Croci L., Dubois E., Cook N., de Medici D., Schultz A. C., China B., Rutjes S. A., Hoorfar J., van der Poel W. H. M. 2008. Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: Towards international standards. *Food Analytical Methods*, 1, 2: 73-84
- Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F. M. 2008. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Veterinary Microbiology*, 132: 47-55
- Drobeniuc J., Favorov M. O., Shapiro C. N., Bell B. P., Mast E. E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B. H., Margolis H. S. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *Journal of Infectious Diseases*, 184: 1594-1597
- Emerson S. U., Anderson D., Arankalle A., Meng X. J., Purdy M., Schlauder G. G., Tsarev S. A. 2004. Hepevirus. V: Virus taxonomy. VIIIth report of the ICTV. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. (eds.). London, Elsevier/Academic Press: 851-855

- Emerson S. U., Arankalle V. A., Purcell R. H. 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *Journal of Infectious Diseases*, 192: 930-933
- Fanedl L., Nekrep F. V., Avguštin G. 2002. Analiza sekvenc genov za 16S rRNA izolatov bifidobakterij iz tankega črevesja podgan. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 80, 2: 157-167
- Farrah S. R., Shah D. O., Ingram L. O. 1981. Effects of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 2: 1229-1232
- Feagins A. R., Opriessnig T., Guenette D. K., Halbur P. G., Meng X. J. 2007a. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *Journal of General Virology*, 88: 912-917
- Feagins A. R., Opriessnig T., Guenette D. K., Halbur P. G., Meng X. J. 2007b. 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, 1-2: 32-37
- Fong T. T., Lipp E. K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risk, detection and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 2: 357-371
- Forgách P., Nowotny N., Erdélyi K., Boncz A., Zentai J., Szűcs G., Reuter G., Bakonyi T. 2010. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Veterinary Microbiology*, 143: 106-116
- Fukuda S., Sunaga J., Saito N., Fujimura K., Itoh Y., Sasaki M., Tsuda F., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H. 2004. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: Identification of three blood donors infected with genotype 3 hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*, 73, 4: 554-561

- Gouvea V., Snellings N., Popek M. J., Lomger C. F., Innis B. L. 1998. Hepatitis E virus: Complete genome sequence and phylogenetic analysis of a Nepali isolate. *Virus Research*, 57: 21-26
- Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S. U. 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *Journal of Virology*, 80, 12: 5919-5926
- Graff J., Zhou Y. H., Torian U., Nguyen H., St. Claire M., Yu C., Purcell R. H., Emerson S. U. 2008. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *Journal of Virology*, 82, 3: 1185-1194
- Haagsma E. B., van der Berg A. P., Porte R. J., Benne C. A., Vennema H., Reimerink J. H. J., Koopmans M. P. G. 2008. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transplantation*, 14: 547-553
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- Huang C. C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K. Y., Fry K. E., Bradley D. W., Tam A. W., Reyes G. R. 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 191, 2: 550-558
- Huang F. F., Haqshenas G., Guenette D. K., Halbur P. G., Schommer S. K., Pierson F. W., Toth T. E., Meng X. J. 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4: 1326-1332

- Huang Y. W., Opiessing T., Halbur P. G., Meng X. J. 2007. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity *in vivo*. *Journal of Virology*, 81, 6: 3018-3026
- Hussaini S. H., Skidmore S. J., Richardson P., Sherratt L. M., Cooper B. T., O'Grady J. G. 1997. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *Journal of Viral Hepatitis*, 4, 1: 51-54
- Inoue J., Takahashi M., Yazaki Y., Tsuda F., Okamoto H. 2006. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *Journal of Virological Methods*, 137: 325-333
- Kabrane-Lazizi Y., Fine J. B., Elm J., Glass G. E., Higa H., Diwan A., Gibbs Jr. C. J., Meng X. J., Emerson S. U., Purcell R. H. 1999a. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 2: 331-335
- Kabrane-Lazizi Y., Meng X. J., Purcell R. H., Emerson S. U. 1999b. Evidence that genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *Journal of Virology*, 73, 10: 8848-8850
- Kamar N., Mansuy J. M., Cointault O., Selves J., Abravanel F., Danjoux M., Otal P., Esposito L., Durand D., Izopet J., Rostaing L. 2008b. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney and kidney-pancreas-transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 8: 1744-1748
- Kamar N., Selves J., Mansuy J. M., Ouezzani L., Péron J. M., Guitard J., Cointault O., Esposito L., Abravanel F., Danjoux M., Durand D., Vinel J. P., Izopet J., Rostaing L. 2008a. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, 358: 811-817



- Kasorndorkbua C., Opriessnig T., Huang F. F., Guenette D. K., Thomas P. J., Meng X. J., Halbur P. G. 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7831-7837
- Khuroo M. S. 1980. Study of an epidemic of non-A, non-b hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *American Journal of Medicine*, 68, 6: 818-824
- Khuroo M. S., Kamili S., Jameel S. 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*, 345: 1025-1026
- Kitajima M., Matsubara K., Sour S., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S. 2009. First detection of genotype 3 hepatitis E virus RNA in river in Cambodia. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 9: 955-957
- Koonin E. V., Gorbalenya A. E., Purdy M. A., Rozanov M. N., Reyes G. R., Bradley D. W. 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: Delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 17: 8259-8263
- Kovač K., Gutiérrez-Aguirre I., Banjac M., Peterka M., Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M., Zimšek Mijovski J., Schultz A. C., Raspor P. 2009. A novel method for concentration hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods*, 162: 272-275
- Lu L., Li C., Hagedorn C. H. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology*, 16, 1: 5-36

- Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Caprioli A., Ruggeri F. M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F. 2010. Detection of hepatitis E virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Research in Veterinary Science*, 88: 492-496
- Meng X. J. 2003. Swine hepatitis E virus: Cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 278: 185-216
- Meng X. J. 2010a. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*, 140: 256-265
- Meng X. J. 2010b. Recent advances in hepatitis E virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 17: 153-161
- Meng X. J., Halbur P. G., Haynes J. S., Tsareva T. S., Bruna J. D., Royer R. L., Purcell R. H., Emerson S. U. 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Archives of Virology*, 143, 7: 1405-1415
- Meng X. J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehmann J. R., Webb D. M., Tsareva T. S., Haynes J. S., Thacker B. J., Emerson S. U. 1997. A novel virus in swine is closely related to human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 9860-9865
- Meng X. J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K., Toth T. E., Engle R. E., Emerson S. U., Purcell R. H. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1: 117-122
- Mizuo H., Suzuki K., Takikawa Y., Sugai Y., Tokita H., Akahane Y., Itoh K., Gotanda Y., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 9: 3209-3218

- Mushahwar I. K. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of Medical Virology*, 80: 646-658
- Navaneethan U., Al Mohajer M., Shata M. T. 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver International*, 28: 1190-1199
- NCBI. 2010a. BLAST: Basic local alignment search tool. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information:  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (25. jul. 2010)
- NCBI. 2010b. GenBank. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (25. jul. 2010)
- Norval R. A., Andrew H. R., Yunker C. E. 1990. Infection rates with *Cowdria ruminantium* of nymphs and adults of the bont tick *Amblyomma hebraeum* collected in the field in Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*, 36: 277-293
- Ohnishi S., Kang J. H., Maekubo H., Arakawa T., Karino Y., Takahashi K., Mishiro S. 2006. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatology Research*, 36, 4: 301-307
- Okamoto H. 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Research*, 127: 216-228
- Pavio N., Meng X. J., Renou C. 2010. Zoonotic hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary Research*, 41, 6: 46, doi: 10.1051/vetres/2010018: 20 str.
- Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J., Girones R. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *Journal of Hepatology*, 33, 5: 826-833

- Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- Renou C., Pariente A., Nicand E., Pavio N. 2008. Pathogenesis of hepatitis E in pregnancy. *Liver International*, 28: 1465-1465
- Reuter G., Zimšek-Mijovski J., Poljšak-Prijatelj M., Di Bartolo I., Ruggeri F. M., Kantala T., Maunula L., Kiss I., Kecskeméti S., Halaihel N., Buesa J., Johnsen C., Hjulsager C. K., Larsen L. E., Koopmans M., Böttlinger B. 2010. Incidence, diversity and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2: 363-368
- Rutjes S. A., Lodder W. J., Bouwknegt M., de Roda Husman A. M. 2007. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55 % by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 143: 112-116
- Rutjes S. A., Lodder W. J., Lodder-Verschoor F., van der Berg H. H. J. L., Vennema H., Duizer E., Koopmans M., de Roda Husman A. M. 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 3: 381-387
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467
- Shatkin A. J. 1976. Capping of eukaryotic mRNA. *Cell*, 9, 4: 645-653
- Shrestha M. P., McNair Scott R., Joshi D. M., Mammen M. P., Thapa G. B., Thapa N., Myint K. S. A., Fourneau M., Kushner R. A., Shrestha S. K., David M. P., Seriwatana J., Vaughn D. W., Safary A., Endy T. P., Innis B. L. 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *New England Journal of Medicine*, 356, 9: 895-903

- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Barlič-Magajna D., Marin J. 2008. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *Journal of General Virology*, 89: 1690-1698
- Takahashi K., Iwata K., Watanabe N., Hatahara T., Ohta Y., Baba K., Mishiro S. 2001. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology*, 287, 1: 9-12
- Takahashi K., Kitajama N., Abe N., Mishiro S. 2004. Complete or near-complete nucleotide sequence of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*, 330, 2: 137-140
- Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R. 1991. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185, 1: 120–131
- Tamura A., Shimzu Y. K., Tanaka T., Kuroda K., Arakawa Y., Takahashi K., Mishiro S., Shmizu K., Moriyama M. 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology Research*, 37: 113-120
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599
- Tsarev S. A., Emerson S. U., Reyes G. R., Tsareva T. S., Legters L. J., Malik I. A., Iqbal M., Purcell R. H. 1992. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2: 559-563

- Tyagi S., Korkaya H., Zafrullah M., Jameel S., Lal S. K. 2002. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25: 22759-22767
- van Cuyck H., Juge F., Roques P. 2003. Phylogenetic analysis of the first complete hepatitis E virus (HEV) genome from Africa. *FEMS Immunology and Microbiology*, 39, 2: 133-139
- van Cuyck-Gandre H., Zhang H. Y., Tsarev S. A., Warren R. I., Caudill J. D., Snellings N. J., Begot L., Innis B. I., Longer C. F. 2000. Phylogenetically distinct hepatitis E virus in Pakistan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62, 2: 187-189
- van der Poel W. H. M., Verschoor F., van der Heide R., Herrera M. I., Vivo A., Kooreman M., de Roda Husman A. M. 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 6: 970-976
- Vasickova P., Psikal I., Kralik P., Widen F., Hubalek Z., Pavlik I. 2007. Hepatitis E virus: A review. *Veterinarni Medicina*, 52, 9: 365-384
- Verma V., Arankalle V. A. 2009. Hepatitis E virus-based evaluation of a virion concentration method and detection of enteric viruses in environmental samples by multiplex nested RT-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 5: 1630-1641
- Wang Y., Ling R., Erker J. C., Zhang H., Li H., Desai S., Mushahwar I. K., Harrison T. J. 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology*, 80: 167-177
- Wang Y., Zhang H., Ling R., Li H., Harrison T. J. 2000. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *Journal of General Virology*, 81, 7: 1675-1686

- Wei S., To S. S. T. 2003. Influence of RNA secondary structure on HEV gene amplification using reverse-transcription and nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 27: 152-161
- Wong D. C., Purcell R. H., Sreenivasan M. A., Prasad S. R., Pavri K. M. 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet*, 2: 876-879
- Worm H. C., Schlauder G. G., Wurzer H., Mushahwar I. K. 2000. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: Sequence, phylogenetic and serological analysis. *Journal of General Virology*, 81: 2885-2890
- Wu J. C., Chen C. M., Chiang T. Y., Tsai W. H., Jeng W. J., Sheen I. J., Lin C. C., Meng X. J. 2002. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *Journal of Medical Virology*, 66, 4: 488-492
- Yamada K., Takahashi M., Hoshino Y., Takahashi K. I., Nagashima S., Tanaka T., Okamoto H. 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *Journal of General Virology*, 90: 1880-1891
- Zafrullah M., Ozdener M. H., Panda S. K., Jameel S. 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of Virology*, 71, 12: 9045-9053
- Zhai L., Dai X., Meng J. 2006. Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Research*, 120: 57-69
- Zhao C., Ma Z., Harrison T. J., Feng R., Zhang C., Qiao Z., Fan J., Ma H., Li M., Song A., Wang Y. 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *Journal of Medical Virology*, 81, 8: 1371-1379

Zimšek-Mijovski J., Poljšak-Prijatelj M., Steyer A., Barlič-Magajna D., Koren S. 2010. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Detection, Genetics and Evolution*, 10: 413-420



## ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju dr. Andreju Steyerju, da me je zbližal z raziskovalnim delom in mi omogočil delo na zanimivi in aktualni temi. S svojim znanjem in izkušnjami mi je bil v veliko pomoč tako pri samem laboratorijskem delu kot pri pripravi diplomske naloge. Zahvaljujem se mu za skrben in temeljit pregled le-te. Hvaležna sem mu, da si je vedno vzel čas za moja vprašanja in razpravo o tekočem delu.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Tatjani Avšič Županc za hiter pregled diplome, koristne napotke in vso prijaznost. Najlepša hvala tudi recenzentki prof. dr. Ines Mandić Mulec za natančen in objektivni pregled diplomske naloge ter vse nasvete. Za hiter in natančen pregled diplome se zahvaljujem tudi dr. Mateji Poljšak Prijatelj.

Hvala Ireni Šest, Marku Kolencu, Špeli Furar, dr. Andreju Steyerju in dr. Mateji Poljšak Prijatelj iz Laboratorija za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov, ki so me prijazno sprejeli medse tekom opravljanja diplomske naloge. Hvala vam za prijetno družbo v laboratoriju in zabavne trenutke. Lepo je delati z vami!

Hvala Anji Kovanda in Maji Lunar iz Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa za njun čas in pomoč pri obdelavi nukleotidnih zaporedij. Hvala Barbari Šoba iz Laboratorija za parazitologijo in dekletom iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko okužb sečil za prijetno družbo na inštitutu.

Najlepša hvala moji družini za brezpogojno podporo in spodbujanje: mami Urški za vse pogovore in prepotrebne nasvete, očiju Bojanu za nenadomestljivo pomoč pri študiju, bratu Luku za najboljše nasvete starejšega brata, spodbujanje in pomoč pri študiju. Hvala tudi ostalim sorodnikom za prijetne trenutke.

Ne nazadnje bi se rada zahvalila Matjažu, ki me je ves čas tekom študija in priprave diplomske naloge spremljal in me stalno spodbujal. Razumevajoče je prenašal moje veselje in skrbi ter me vedno znal spraviti v dobro voljo. Hvala ti!

## PRILOGE

### Priloga A: Poravnava zaporedij 251 bp dolgega fragmenta regije ORF2 prašičjih sevov HEV iz naše raziskave

```
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
P32  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACCAACACTCGTGTGTCT
O11-4 CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P6   CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P12  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P25  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P30  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P31  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P36  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P37  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P38  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P51  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P53  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P55  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P64  CCTTACACTGGAGCGCTTGGGCTTCTTGACTTTGCATTAGAGCTAGAGTTTAGAAATTAACCCCTGGGAATACTAATACTCGTGTGTCT
P65  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P66  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P67  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P68  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P69  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P70  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P71  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P72  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P80  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P81  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT
P82  CCTTATACTGGGGCCCTGGGGCTTCTTGATTTGCGGCTCGAGCTTGAGTTTCGTAACCTAACCCCTGGGAACACTAACACTCGTGTGTCT

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
P32  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
O11-4 CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P6   CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P12  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P25  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P30  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P31  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P36  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P37  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P38  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P51  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P53  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P55  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P64  CGGTATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P65  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P66  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P67  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P68  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P69  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P70  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P71  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P72  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P80  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P81  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
P82  CGATATACTAGTACAGCCC GCCACCGGCTGCGTCTGGTGTCTGACGGCACCCTGAGCTTACAACCACAGCTGTACACGCTTCATGAAA
```

se nadaljuje

## nadaljevanje Priloge A: Poravnava zaporedij 251 bp dolgega fragmenta regije ORF2 prašičjih sevov HEV iz naše raziskave

```
          190          200          210          220          230          240          250
P32  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
O11-4 GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P6   GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P12  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P25  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P30  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P31  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P36  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P37  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P38  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P51  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P53  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P55  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P64  GACCTACATTTCTGGGACTAATGGGTTGGCGAAGTTGGCCGAGGTATTGCCCTAACATTGTTCAATCT
P65  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P66  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P67  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P68  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P69  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P70  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P71  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P72  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P80  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P81  GATTTACATTTNAGNNGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
P82  GATTTACATTTTAGCGGGACTAACGGTGTGGTGAGGTAGGCCGCGGTATAGCCCTGACCTTGTTAATCT
```