

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 636.4.09:616.36-002:578.835:57.083.2:57.088.7:616-036.22:575.86(043.3)

Petra Raspor Lainšček, dr. vet. med.

**RAZŠIRJENOST OKUŽBE Z VIRUSOM
HEPATITISA E PRI PRAŠIČIH OB ZAKOLU**

Doktorska disertacija

**PREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION
IN PIGS AT SLAUGHTER**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Petra Raspor Lainšček

Razširjenost okužbe z virusom hepatitisa E pri prašičih ob zakolu

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje (Enota za varno hrano), na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani, v klavnicah v Celju (Celjske mesnine, d. o. o.), Šentjurju (Farne Ihan-MPR, d. o. o.), Kamniku (Meso Kamnik, d. d.) in Gornji Radgoni (Panvita MIR, d. d.).

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentor: prof. dr. Andrej Kirbiš

Somentor: izr. prof. dr. Ivan Toplak

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik (VF)

Član: prof. dr. Tadej Malovrh (VF)

Član: prof. dr. Mario Poljak (MF)

Ni pomembno, kako počasi greš, važno je, da se ne ustaviš.

Konfucij

IZVLEČEK

Ključne besede: Bolezni prašičev – virologija; zoonoze; hepatitis E – epidemiologija; hepatitis E virus – diagnostika – genetika; filogenija; blato – virologija; jetra – virologija; mesni izdelki – virologija; verižna reakcija s polimerazo – metode; encimsko vezani imunosorbentni test – metode; analiza zaporedja DNA; RNA, virusna – analize; prašiči

Naša raziskava sovпада s porastom zanimanja za »novo porajajočo se« bolezen virusa hepatitisa E (HEV) v svetu in prinaša nove izsledke o razširjenosti okužbe v slovenskih rejah prašičev. Ker gre za zoonozo, smo z raziskavo želeli ugotoviti, kakšno je stanje v slovenskih klavnicah in ali hepatitis E virus ogroža zdravje ljudi. Vzorčenje prašičev je potekalo v štirih klavnicah po Sloveniji med junijem in septembrom 2014. Vzorce blata, jeter in žolča smo odvzeli 811 klinično zdravim prašičem različnih starostnih kategorij. Ob vzorčenju v klavnici smo jemali tudi brise površin na klavni liniji, vzorčili mleto meso in pečenice. Z metodo RT-PCR v realnem času smo dokazovali prisotnost nukleinske kisline HEV v odvzetih vzorcih. Istim prašičem smo odvzeli tudi vzorec krvi in določali prisotnosti protiteles IgG proti HEV. Največ HEV pozitivnih živali smo ugotovili med 322 odojki, in sicer 17 %. Med 400 pitanci smo ugotovili en pozitiven vzorec jeter in en pozitiven vzorec žolča, kar je bistveno manj, kot smo pričakovali. Med 89 plemenskimi svinjami nismo ugotovili pozitivne živali. Med 63 brisi površin smo odkrili dva pozitivna vzorca. V vzorcih pečenic in mletega mesa prisotnosti HEV nismo ugotovili. Z genetsko tipizacijo 45 HEV pozitivnih vzorcev in filogenetsko primerjavo nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov skupaj z zaporedji sevov HEV, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank, smo ugotovili pojav velike genetske raznolikosti med vzorci ter prisotnost štirih različnih podtipov genotipa 3 (3a, 3b, 3e in 3f) HEV v Sloveniji. V izvedeni študiji genotipa 4 nismo ugotovili. V določanje nukleotidnega zaporedja smo vključili tudi pet humanih vzorcev, pozitivnih na prisotnost HEV. Zaradi premajhne količine virusne RNA v HEV pozitivnih humanih vzorcih nam pri nobenem ni uspelo določiti nukleotidnega zaporedja. Z dvema komercialnima encimskoimunskima testoma (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom) smo pregledali vzorce krvi domačih prašičev na prisotnost protiteles IgG proti HEV. Pregledali smo 351 vzorcev, naključno izbranih iz vzorcev odvzetih na celotnem območju Slovenije v okviru rednega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014, ter 359 vzorcev, odvzetih v klavnici ob zakolu leta 2014. Primerjava rezultatov obeh testov je pokazala, da je encimskoimunski test proizvajalca Axiom ustrežnejši za presejalna testiranja. Za razjasnitev 38 rezultatov, ki se pri vzorcih iz klavnice pri obeh encimskoimunskih testih niso ujemali, smo uporabili modificiran humani imunoblot test recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen diagnostik). Izvedena raziskava je prva tovrstna študija, ki dokazuje prisotnost HEV pri prašičih na klavni liniji v Sloveniji, prav tako je prva izvedena sistematična raziskava v tako širokem obsegu v Sloveniji. Rezultati raziskave prispevajo k boljšemu razumevanju stanja okužb prašičev s HEV ob vstopu na klavno linijo, in podajajo natančnejšo sliko o stanju prekuženosti prašičev v rejah. Glede na številčnost pregledanih vzorcev in razpršenost rej po državi, iz katerih so izhajali vzorčeni prašiči, lahko z gotovostjo trdimo, da rezultati podajajo natančen podatek o razširjenosti okužb s HEV med domačimi prašiči v Sloveniji.

ABSTRACT

Key words: Swine diseases – virology; zoonoses; hepatitis E – epidemiology; hepatitis E virus – diagnosis –genetics; phylogeny; feces – virology; liver – virology; meat products – virology; polymerase chain reaction – methods; enzyme-linked immunosorbent assay test – methods; sequence analysis DNA; RNA, viral – analysis; swine

Our research coincides with increasing interest in the newly emerging zoonosis, the hepatitis E virus, and provides new information regarding infection distribution in Slovenian pig herds. Since HEV is a zoonosis, our goal was to investigate the existing condition in Slovenian slaughterhouses and to assess associated health risks posed to consumers and personnel. Sampling of pigs was conducted in four Slovenian slaughterhouses, between June and September 2014. Feces, liver and bile samples were collected from 811 healthy pigs (different age categories). At the time of slaughter, swab samples of different surfaces and samples of minced meat and sausages were also taken. All samples were analyzed with real time PCR (RT-PCR) for the presence of HEV. Blood samples taken from the same pigs were analyzed for the presence of IgG HEV antibodies. The highest number of HEV positive animals was found in the 3 month old age group of pigs (322 animals), where 17% of animals were HEV positive. In the age group of 6 month old pigs (400 animals), only one liver sample and one bile sample was positive, which was significantly less than we would have expected. Out of 89 pigs that were older than 1 year, none was HEV positive. Out of 63 surface swabs, two were positive for the presence of HEV. None of the minced meat and sausage samples was positive. A phylogenetic tree, generated combining sequences obtained from Slovenian strains (45 positive samples) and nucleotide sequences of HEV strains derived from GeneBank, revealed high genetic variability between samples, allowing classification of the identified Slovenian strains into four different subtypes of genotype 3 (3a, 3b, 3e and 3f). Genotype 4 was not found. Additionally, five HEV positive human samples were sequenced, although sequencing was unsuccessful due to an insufficient amount of viral RNA. With two commercial ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet) and HEV-IgG ELISA porcine (Axiom)) we analyzed blood samples from domestic pigs for the presence of IgG HEV antibodies. We analyzed 351 randomly selected serum samples collected from pigs located in different parts of Slovenia (these samples were collected within the scope of annual monitoring of infectious diseases in 2013 and 2014) and 359 samples collected from pigs at slaughter in 2014. Comparison of results from both ELISA showed that Axiom ELISA is more suitable as a screening method. A human immunoblot test was optimized and standardized to test 38 serum samples that showed discrepancies in results obtained with Axiom and IDvet ELISA kits. The work presented herein represents the first systematic, wide scope analysis on the presence of HEV in pigs at slaughter in Slovenia. Results of the research have contributed to a better understanding of pig HEV infection status at slaughter and have shown a more detailed picture of seroprevalence status in pig farming. Since our research included a great number of samples and dispersion of different farms around the country, we can safely say that the obtained results show accurate information about pig HEV infections in Slovenia.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
1 UVOD	16
1.1 Namen raziskave	17
1.2 Hipoteze	18
2 PREGLED LITERATURE	19
2.1 Prvi pojavi izbruhov HEV pri ljudeh in prašičih	19
2.2 Lastnosti virusa	20
2.2.1 Taksonomska uvrstitev	20
2.2.2 Zgradba HEV	22
2.2.3 Razmnoževanje HEV v celicah	23
2.2.4 Ohranjanje kužnosti virusa na različni temperaturi	23
2.3 Način prenosa virusa in pojavljanje po svetu	25
2.3.1 Osnovne razlike med HEV iz genotipov 1, 2, 3 in 4	25
2.3.2 Načini prenosa HEV genotipov 3 in 4 na človeka	27
2.3.3 Pojavnost okužb s HEV po svetu	29
2.4 Klinična slika pri ljudeh	31
2.4.1 Akutni hepatitis	31
2.4.2 Kronični hepatitis	31
2.4.3 Ekstrahepatični zapleti okužbe s HEV	32
2.5 HEV kot zoonoza	33
2.5.1 Rezervoarji virusa HEV	33
2.5.2 Potek okužbe in razvoj bolezni pri prašičih	33
2.5.3 Kritične točke za prenos virusa	35
2.6 Laboratorijska diagnostika HEV	37
2.6.1 ELISA	38
2.6.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) ter verižna reakcija s polimerazo v realnem času	39
3 MATERIALI IN METODE	41
3.1 Vzorčenje	41

3.1.1 Vzorci blata, jeter, žolča in krvi ter način odvzema vzorcev	44
3.1.2 Vzorci brisov površin in način odvzema vzorcev	47
3.1.3 Vzorci mletega mesa in pečenic ter način odvzema vzorcev	49
3.2 Metode	53
3.2.1 ELISA	53
3.2.2 Metoda imunoblot (IB).....	55
3.2.3 Dokazovanje HEV z molekularnimi metodami	57
3.2.4 Statistične metode	64
4 REZULTATI	65
4.1 Dokaz prisotnosti protiteles proti HEV	65
4.1.1 Naključno izbrani serumski vzorci domačih prašičev s celotnega območja Slovenije (monitoring)	65
4.1.2 Serumski vzorci odvzeti pri prašičih ob zakolu v klavnici.....	71
4.1.3 Analiza serološko pozitivnih rezultatov v različnih starostnih obdobjih prašičev	77
4.1.4 Dokaz specifičnih protiteles proti HEV z metodo imunoblot	79
4.1.5 Določitev diagnostične občutljivosti in specifičnosti.....	82
4.2 Rezultati določanja prisotnosti nukleinske kisline HEV z metodo RT-PCR v realnem času	83
4.2.1 Analiza pozitivnih vzorcev na HEV po starostnih skupinah prašičev.....	86
4.2.2 Analiza prisotnosti HEV v rejah, iz katerih so izviral vzorčeni prašiči	86
4.3 Določanje nukleotidnega zaporedja pozitivnih vzorcev HEV v regijah ORF 1 in ORF 2	88
4.3.1 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij v regijah ORF 1 in ORF 2.....	88
5 RAZPRAVA	94
6 SKLEPI	108
7 POVZETEK	110
8 SUMMARY	112
9 ZAHVALE	114
10 LITERATURA	116
11 PRILOGE	126

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska razdelitev družine <i>Hepeviridae</i> (z rdečo so obrobljeni genotipi HEV, ki lahko povzročijo okužbo pri človeku).	21
Figure 1: Taxonomy of the family <i>Hepeviridae</i> (genotypes that are able to infect human are circled in red).	21
Slika 2: Sestava genoma HEV (Kamar in sod., 2017).	22
Figure 2: HEV genome structure (Kamar et al., 2017).	22
Slika 3: Načini prenosa okužbe s HEV, ki so uvrščeni v genotipa 3 in 4 (rdeče puščice - dokazani način prenosa, črne puščice - močan sum, da je prišlo do prenosa, in črtkane puščice - potencialni način prenosa) (Dalton in sod., 2008).	26
Figure 3: Transmission routes of HEV infection for genotype 3 and 4 (red lines-confirmed routes, black lines-strong evidence and broken lines- potential routes) (Dalton et al., 2008).	26
Slika 4: Geografski prikaz pojavljanja sevov HEV iz genotipov 1, 2, 3 in 4 po svetu (Treagus in sod., 2021).	30
Figure 4: Global geographical distribution of HEV strains from genotypes 1, 2, 3 and 4 (Treagus et al., 2021).	30
Slika 5: Odvzem vzorca blata iz kolona prašičev v klavnici.	45
Figure 5: Sampling of feces from porcine colon at the slaughterhouse.	45
Slika 6: Odvzem vzorca žolča iz žolčnika prašičev v klavnici.	45
Figure 6: Sampling of bile from porcine gall bladder at the slaughterhouse.	45
Slika 7: Odvzem vzorca jeter prašičev po odstranitvi žolčnika.	46
Figure 7: Sampling of porcine liver after removal of the gall bladder.	46
Slika 8: Kavelj, na katerem so obešeni notranji organi (pljuča, srce in jetra) prašičev po eksenteraciji.	47
Figure 8: Metal hook holding pigs' internal organs (lungs, heart and liver) after exenteration.	47
Slika 9: Kovinski zabojniki, v katere shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu.	48

Figure 9: Metal containers where porcine livers are stored after veterinary inspection.	48
Slika 10: Kavljji, na katere obešajo trupe prašičev v hladilnici.	48
Figure 10: Metal hooks holding pigs carcasses in the cooling room.	48
Slika 11: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz monitoringa kužnih bolezni prašičev).....	66
Figure 11: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from monitoring of infectious pig diseases).....	66
Slika 12: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih do šest mesecev, skupno pregledanih 25 živali.....	68
Figure 12: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs up to 6 months old, altogether 25 animals tested.....	68
Slika 13: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih od šest do dvanajst mesecev, skupno pregledanih 74 živali.....	69
Figure 13: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs from 6 to 12 months old, altogether 74 animals tested.....	69
Slika 14: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih nad dvanajst mesecev, skupno pregledanih 189 živali.....	70
Figure 14: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs older than 12 months, altogether 189 animals tested.....	70
Slika 15: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in neopredeljivih rezultatov (neopredeljivi z obema encimskoimunskima testoma) ter rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz klavnice).	72
Figure 15: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA), doubtful results (doubtful with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from the slaughterhouse).....	72

Slika 16: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starih tri mesece, skupno pregledanih 66 živali.	74
Figure 16: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in 3 months old pigs, altogether 66 animals tested.....	74
Slika 17: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starih šest mesecev, skupno pregledanih 165 živali.	75
Figure 17: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in 6 months old pigs, altogether 165 animals tested.....	75
Slika 18: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starejših od dvanajst mesecev, skupno pregledanih 40 živali.	76
Figure 18: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs older than 12 months, altogether 40 animals tested.....	76
Slika 19: Primerjava deleža pozitivnih rezultatov naključno izbranih serumskih vzorcev prašičev (vzorci iz monitoringa) v različnih starostnih obdobjih.	77
Figure 19: Comparisson of positive results percentage from randomly chosen swine serum samples at different ages.....	77
Slika 20: Primerjava deleža pozitivnih rezultatov serumskih vzorcev prašičev (vzorci iz klavnice) v različnih starostnih obdobjih.....	78
Figure 20: Comparisson of positive results percentage from swine serum samples (samples taken at the slaughterhouse) at different ages.....	78
Slika 21: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 1 (366 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇.	90
Figure 21: Phylogenetic tree, ORF 1 (366 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇.....	90

Slika 22: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 2 (300 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇. 92

Figure 22: Phylogenetic tree, ORF 2 (300 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇. 92

Slika 23: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 2 (300 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇; slovenski in italijanski vzorci označeni s (SLO) in (IT) (Steyer in sod., 2011; de Sabato in sod., 2018). 93

Figure 23: Phylogenetic tree, ORF 2 (300 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇; Slovenian and Italian samples are labelled with (SLO) and (IT) (Steyer in sod., 2011; de Sabato in sod., 2018). 93

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razporeditev rej po statističnih regijah Slovenije, število rej po krajih (mesto/vas) in število prašičev pri katerih smo odvzeli vzorce pri posamezni starostni kategoriji (vzorčenje v klavnicah).	42
Table 1: Distribution of farms by statistical regions of Slovenia, number of farms per town and number of sampled pigs from different age groups (sampling in slaughterhouses).	42
Tabela 2: Razporeditev rej po statističnih regijah Slovenije, število rej po krajih (mesto/vas) (izbrani serumski vzorci iz nabora vzorcev letnega monitoringa kužnih boleznih pri prašičih v letih 2013 in 2014).	50
Table 2: Distribution of farms by statistical regions of Slovenia, number of farms per town (serum samples picked out of samples collected as a part of annual monitoring of infectious pig diseases during year 2013 and 2014).	50
Tabela 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov regij ORF 1 in ORF 2 in velikost pomnoženega produkta.	60
Table 3: Nucleotide sequence for amplification of ORF1 and ORF 2 and amplicon size. .	60
Tabela 4: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in sond.	62
Table 4: Oligonucleotide and probe sequences.	62
Tabela 5: Rezultati opravljenih seroloških preiskav s testom ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom pri 351 naključno izbranih vzorcih iz monitoringa kužnih boleznih prašičev.	65
Table 5: Test results from both ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species IDvet in HEV-IgG ELISA porcine Axiom) for 351 randomly chosen samples from monitoring of infectious pig diseases.	65
Tabela 6: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemale (serumski vzorci iz monitoringa kužnih boleznih prašičev).	67

Table 6: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (sera samples from monitoring of infectious pig diseases).....	67
Tabela 7: Rezultati opravljenih seroloških preiskav s testoma ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom pri 271 vzorcih iz klavnice.....	71
Table 7: Test results from both ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species IDvet in HEV-IgG ELISA porcine Axiom) for 271 samples collected at slaughter.	71
Tabela 8: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma), neopredeljivih rezultatov (sumljivi z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz klavnice).....	73
Table 8: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA), doubtful results (doubtful with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from the slaughterhouse).....	73
Tabela 9: Rezultati primerjave treh metod (encimskoimunski test proizvajalcev IDvet in Axiom ter metoda imunoblot) na 17 vzorcih.....	79
Table 9: Results for 17 samples, comparison of three methods (ELISA IDvet, ELISA Axiom and immunoblot method).....	79
Tabela 10: Rezultati primerjave treh metod (encimskoimunski test proizvajalcev IDvet in Axiom ter metoda imunoblot) za 43 vzorcev.	81
Table 10: Results for 43 samples, comparison of three methods (ELISA IDvet, ELISA Axiom and immunoblot method).....	81
Tabela 11: Rezultati preiskav 57 HEV pozitivnih prašičev (rezultati metod RT-qPCR in ELISA/imunoblot).....	84
Table 11: 57 HEV positive animals (RT-qPCR and ELISA/immunoblot results).....	84
Tabela 12: Podatki o HEV pozitivnih rejah odojkov (razpored po rejah od I do XI): datum vzorčenja odojkov ob prihodu v klavnico, število vzorčenih odojkov in število pozitivnih odojkov na prisotnost HEV.	87

Table 12: Information about HEV positive farms housing 3 month old pigs (farms from number I to XI):. sampling date of 3 month old pigs at slaughter, number of sampled pigs and number od HEV positive pigs.....	87
---	----

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

Bp	bazni par (ang. base pair)
Ct	(ang. cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid (ang. deoxynucleotide triphosphate)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
GE	ekvivalent genoma (ang. genome equivalent)
HEV	hepatitis E virus
HIV	virus humane imunske pomankljivosti (ang. human immunodeficiency virus)
IB	imunoblot (ang. immunoblot)
i.v.	intravenozno
Kb	kilobaza; 1000 baznih parov (ang. kilobase)
Nt	nukleotid (ang. nucleotide)
ORF 1	odprt bralni okvir 1 (ang. Open Reading Frame 1)
ORF 2	odprt bralni okvir 2 (ang. Open Reading Frame 2)
ORF 3	odprt bralni okvir 3 (ang. Open Reading Frame 3)
p.o.	per os/peroralno
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PRRS	prašičji reproduktivni in respiratorni sindrom (ang. porcine reproductive and respiratory syndrome)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
RT-qPCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SPF	prost specifičnih patogenov (ang. specific pathogen free)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)

1 UVOD

Hepatitis E je zoonoza, ki jo povzroča virus hepatitisa E (HEV) iz družine *Hepeviridae*. Trenutno je znanih osem genotipov in 36 podtipov (Smith in sod., 2020). Virusi genotipov 1 in 2 povzročajo okužbo človeka in se pojavljajo v manj razvitih državah sveta za katere je značilen fekalno-oralen prenos HEV med ljudmi. Virusi genotipov 3 in 4 povzročajo okužbo tako ljudi kot živali, glavni rezervoar virusa predstavljajo domači in divji prašiči, kljub temu da so virus in protitelesa proti HEV dokazali že pri številnih drugih živalskih vrstah (Scobie in Dalton, 2013; Pavio in sod., 2010; Kenney, 2019). Načinov prenosa HEV genotipov 3 in 4 je več, največ raziskav pa se usmerja v prenos s toplotno neobdelanim oziroma premalo obdelanim svinjskim mesom/jetri in izdelki iz svinjskega mesa (Treagus in sod., 2021).

S prvim pojavom humane okužbe s HEV v Združenih državah Amerike, je postalo jasno, da ta virus ni več samo težava nerazvitih držav, temveč da gre za svetovno grožnjo (Kwo in sod., 1997). Mnoge razvite države so začele zbirati podatke o prekuženosti prašičev na farmah, nekatere so se usmerile predvsem v dokazovanje akutnih okužb z viremijo pri prašičih ob zakolu. Posebna težava pri tej bolezni je, da prašiči, okuženi s HEV, ne kažejo nobenih kliničnih znakov bolezni in lahko v času viremije nemoteno vstopajo v klavnico (Widén, 2016).

Virusno RNA dokazujemo z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času. Ta metoda je uporabna pri prepoznavanju akutnih okužb pri prašičih. Za nedvoumen dokaz infektivnosti virusa bi potrebovali standardiziran postopek izolacije virusa na celični kulturi, ki pa žal še vedno ni na voljo. Protitelesa proti virusu dokazujemo z encimskoimunskim testom (ELISA), vendar nam ti rezultati dajo podatek samo o tem, da je bil imunski sistem gostitelja v stiku z virusom HEV, ne pa tudi, ali je gostitelj v fazi izločanja virusa v okolje.

Okužba pri človeku večinoma poteka asimptomatsko, lahko pa okužba s HEV privede do hujših zapletov, kot so težave s strjevanjem krvi, zlatenica, hepatična encefalopatija, ascites, kar lahko vodi v odpoved jeter in smrt (Xin in Xiao, 2016).

1.1 Namen raziskave

Namen našega dela je bil izvesti prvo celovito raziskavo o stanju okužb prašičev s HEV v slovenskih klavnicah, ki bi vključevala večje število živali različnih starostnih kategorij, več vrst vzorcev vsake posamezne živali in večje število rej. Vsaki živali bi odvzeli vzorce blata, jeter in žolča ter z metodo RT-PCR v realnem času tako ugotovili, kolikšen odstotek prašičev predstavlja potencialni vir okužbe za človeka, če v vzorcih dokažemo nukleinsko kislino HEV.

Izbrali smo 45 RT-PCR pozitivnih vzorcev, pri katerih smo s sekvenciranjem dveh odsekov virusnega genoma analizirali nukleotidno zaporedje naših, slovenskih sevov in jih primerjali s sevi v podatkovni bazi GenBank. Tako smo ugotovili, kateri genotipi krožijo v rejah s slovenskimi prašiči in ali so v sorodu s sevi, ki se pojavljajo v drugih evropskih državah. Za primerjavo humanih in prašičjih sevov HEV smo pridobili tudi humane virusne izolate.

Približno polovici prašičev, katerih vzorce blata, jeter in žolča smo odvzeli, smo vzeli tudi vzorce krvi. Serume smo pregledali z dvema encimskoimunskima testoma (ELISA) za ugotavljanje protiteles proti HEV pri prašičih, ki sta bila v času naše raziskave dostopna na trgu. Na podlagi primerjave rezultatov smo določili, kateri encimskoimunski test je primernejši za rutinsko diagnostiko, kot potrditveni test pa smo v laboratoriju uvedli metodo imunoblot.

Za razjasnitev, ali obstaja potencialna možnost za okužbo ljudi z izdelki iz svinjskega mesa, smo vzorčili tudi mleto meso in pečenice ter jih testirali z metodo RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti RNA HEV.

1.2 Hipoteze

V raziskavi smo postavili naslednje hipoteze:

1. Dva komercialna testa ELISA za dokazovanje protiteles proti HEV v serumu prašičev dajeta primerljive rezultate.
2. Nukleinska kislina HEV je prisotna v različnih vzorcih na klavni liniji ob zakolu prašičev.
3. Virusi HEV v Sloveniji spadajo v genotip 3 in 4, isti sevi se pojavljajo pri prašičih in človeku.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Prvi pojavi izbruhov HEV pri ljudeh in prašičih

Prvi dokumentirani izbruh epidemije HEV je bil opisan med letoma 1955 in 1956 v New Delhiju v Indiji. Do izbruha je prišlo zaradi fekalnega onesnaženja pitne vode, okužilo se je 29.000 ljudi. Kot vzrok epidemije so takrat navedli virus hepatitisa A, a so retrospektivno, z analiziranjem shranjene plazme okuženih ljudi, ugotovili, da gre za nov virus, ki so ga poimenovali enterično prenesen ne-A, ne-B virus (Kumar in sod., 2013). Podobni izbruhi so se kasneje pojavili še v Nepal, Burmi, Pakistanu, Mehiki in na Kitajskem. Na mednarodnem srečanju v Tokiu leta 1989 so virus poimenovali hepatitis E virus (Wang in sod., 2016). S črko »E« so ga označili zaradi njegovih lastnosti: enteričen, epidemičen, endemičen (Kumar in sod., 2013).

Do začetka 90. let prejšnjega stoletja je veljalo, da je hepatitis E bolezen držav v razvoju, do katere prihaja zaradi slabih sanitarnih razmer, ki botrujejo k hitremu širjenju okužbe s fekalno onesnaženo vodo. Ko so se občasno začeli pojavljati tudi prvi primeri okužb ljudi v razvitih državah, je veljalo prepričanje, da so se ljudje okužili na potovanjih v nerazvite dele sveta ali s stikom s temi ljudmi. Vendar so kmalu ugotovili, da do okužb prihaja tudi pri ljudeh, ki niso potovali v države, kjer je HEV endemično prisoten. Prvi konkretniji dokazi, da se je HEV razširil tudi v druge države in da gre za avtohtone okužbe, so se pojavili leta 1993 med raziskovanjem primerov obolelih za hepatitisom E v Italiji in na Nizozemskem (Zanetti in sod., 2019; Zaaijer in sod., 1993) ter kasneje leta 1995 v Grčiji (Psichogiou in sod., 1995). Podrobneje so te in nekatere druge primere iz Združenih držav Amerike obravnavali leta 1998, ko so sekvencirali dele genoma in ugotovili, da se filogenetsko razlikujejo od preostalih do tedaj poznanih sevov in tvorijo nove genotipe (Schlauder in sod., 1999). Leta 1995 so v Nepal v vzorcih seruma in blata prašičev dokazali prisotnost HEV (Park in sod., 2016). Leta 1997 so odkrili pojav hepatitisa E tudi pri prašičih v ZDA. Ugotovili so nov genotip HEV, katerega nukleotidno zaporedje se je v visokem odstotku ujemalo s tistimi, ki so jih ugotovili pri okužbah ljudi iz ZDA. Tako je bilo leto 1997/98 za HEV prelomno, saj so s tem potrdili zoonotični potencial HEV (Nan in sod., 2017).

2.2 Lastnosti virusa

2.2.1 Taksonomska uvrstitev

Zaradi velikosti viriona, morfoloških lastnosti in koeficienta sedimentacije virusnih delcev se je HEV pred letom 2000 uvrščal v družino *Caliciviridae*. Med letoma 2000 in 2004 so ga iz družine *Caliciviridae* umaknili in ga prenesli med »neuvrščene« virusi. Leta 2004 so ga uvrstili v družino *Hepeviridae*, ta pa se je delila v različne genotipe in podtipe.

Z leti, ko je prihajalo do odkritij novih sevov pri vse več živalskih vrstah, takšna razdelitev ni bila več najprimernejša. Zato so leta 2014 predlagali reklasifikacijo in v družino *Hepeviridae* uvrstili roda *Ortohepevirus* in *Piscihepevirus*. V rod *Ortohepevirus* so razvrščene vrste od *Ortohepevirus A* do *D*, v rod *Piscihepevirus* je razvrščena le ena vrsta, *Piscihepevirus A* (Wang in sod., 2016) (Slika 1).

Trenutno je znanih osem genotipov HEV, ki spadajo v *Ortohepevirus A* (Treagus in sod., 2021).

HEV, ki so uvrščeni v genotipa 1 in 2, imajo med seboj 76% identičnost nukleotidnega zaporedja in povzročajo okužbo pri ljudeh. HEV iz genotipa 1 delimo v sedem podtipov (1a–1g), sevi podtipa 1a–1f imajo od 88,53- do 94,05% identičnost nukleotidnega zaporedja. HEV, ki spadajo v genotip 2, delimo v dva podtipa (2a in 2b).

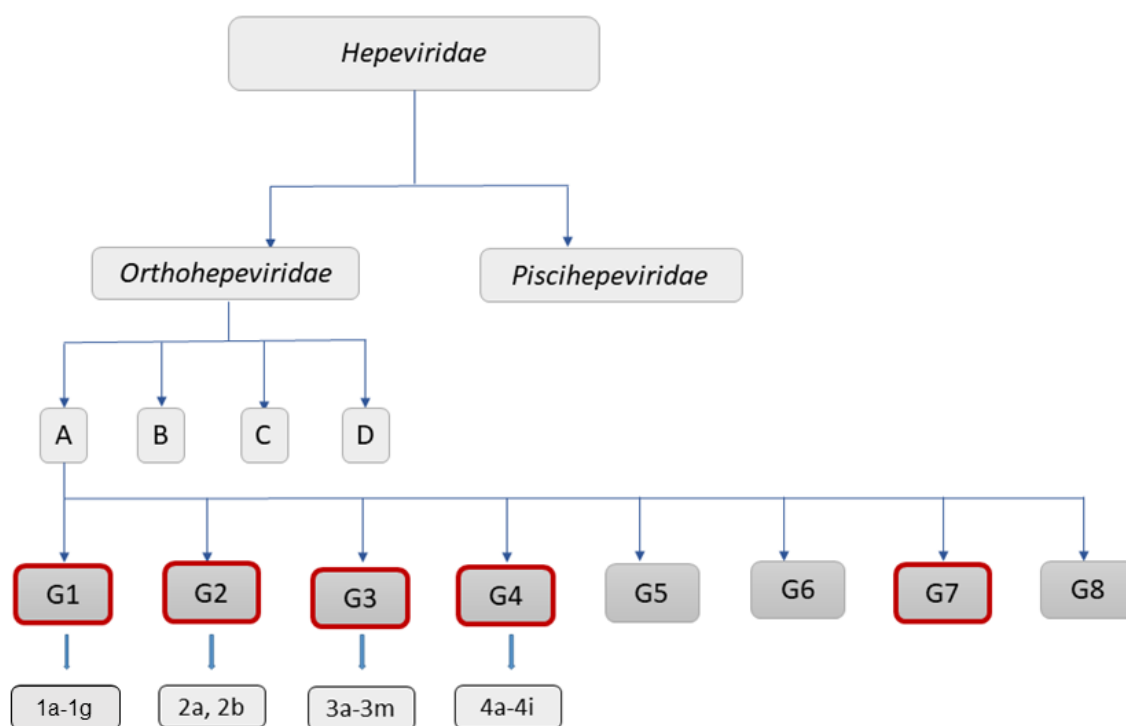
Ugotovljeni sevi HEV, ki spadajo v genotip 3, so v genski banki najštevilčnejši. Večina dostopnih nukleotidnih zaporedij HEV 3 izhaja od domačih prašičev, divjih prašičev in ljudi. Znanih je 13 podtipov (3a–3m). Podtipi 3a–3j imajo od 78,74- do 82,46% identičnost nukleotidnega zaporedja. Podtip 3ra se pojavlja pri zajcih.

Sevi HEV, uvrščeni v genotip 4, se razvrščajo v 9 podtipov (4a–4i), z drugimi genotipi pa si delijo od 71,79- do 77,38% identičnost nukleotidnega zaporedja. Genotipa 5 in 6 si delita več kot 78% nukleotidnega zaporedja, z drugimi genotipi pa od 71,58- do 77,38%. Genotip 7 si z drugimi genotipi deli od 72,55- do 76,13% nukleotidnega zaporedja. Leta 2020 je bil prvim sedmim genotipom dodan še genotip 8.

Vrsta *Ortohepevirus B* ima z drugimi vrstami od 51,47- do 55,05% identičnost nukleotidnega zaporedja, *Ortohepevirus C* od 51,68- do 60,57%, *Ortohepevirus D* pa od 52,8- do 56,06% (Doceul in sod., 2016; Smith in sod., 2020).

Iz vrste *Orthohepevirus A* lahko okužbo pri človeku povzročijo sevi HEV, ki so uvrščeni v genotipe 1, 2, 3, 4 in genotip 7. Razlika med njimi je v tem, da so HEV, uvrščeni v genotipa 1 in 2, ugotovljeni le pri človeku, sevi genotipov 3, 4 in 7 pa lahko okužijo tako človeka kot nekatere vrste živali, zato imajo zoonotični potencial. Do zdaj znani živalski gostitelji HEV iz genotipa 3 so: domači in divji prašiči, opice, zajci, podgane, podlasice, mungi, ovce, koze, delfini, konji in jastrebi. Gostitelji HEV iz genotipa 4 pa so: domači in divji prašiči, opice, skakači, psi, medvedi, leopardi, krave, koze, jelenjad, žerjavi in fazani. Genotip 5 so do sedaj odkrili pri opicah in prašičih, genotip 6 pri prašičih, genotip 7 in 8 pa pri kamelah (Treagus in sod., 2021).

Orthohepevirus B so ugotovili pri kokoših, *Orthohepevirus C* pri podganah, dihurjih in kunah, *Orthohepevirus D* pa pri netopirjih (Doceul in sod., 2016).

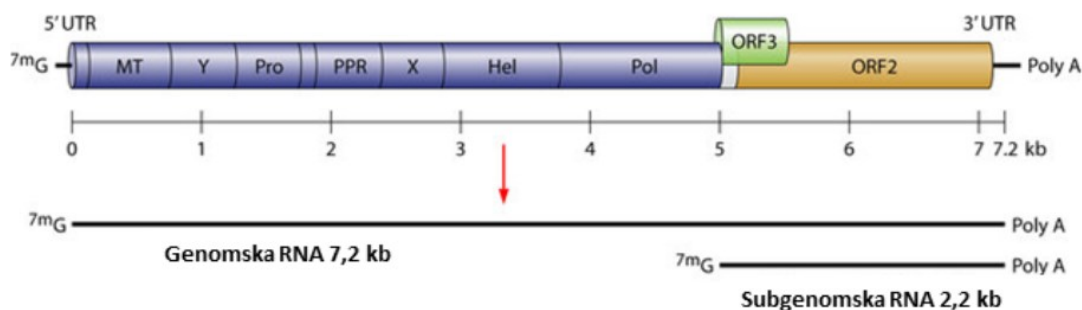


Slika 1: Taksonomska razdelitev družine *Hepeviridae* (z rdečo so obrobljeni genotipi HEV, ki lahko povzročijo okužbo pri človeku).

Figure 1: Taxonomy of the family *Hepeviridae* (genotypes that are able to infect human are circled in red).

2.2.2 Zgradba HEV

HEV je majhen virus, genom predstavlja 7,2 kb dolga enojnovijačna pozitivno polarna molekula RNA. V žolču in blatu ga najdemo brez ovojnice, v krvi pa je obdan z lipidno membrano (Donnelly in sod., 2017). Sestavljen je iz 5' nekodirajoče regije, treh odprtih bralnih okvirjev in 3' nekodirajoče regije (Slika 2). Prvi celoten genom je določil Tam s sodelavci leta 1991 (Khuro in sod., 2016). Dodatni četrti odprti bralni okvir so odkrili le pri genotipu 1, njegova funkcija pa za zdaj ni znana (Nan in sod., 2017).



Slika 2: Sestava genoma HEV (Kamar in sod., 2017).

Figure 2: HEV genome structure (Kamar et al., 2017).

Odprt bralni okvir 1 (ORF 1) je dolg 5082 baz, postavljen na 5' koncu genoma HEV in kodira nestrukturne proteine. Funkcionalna domena tega poliproteina je sestavljena iz encima (metiltransferaza in domena Y, ki tvorita kapo RNA), papainu podobne cisteinske proteaze, hipervariabilne regije, makro domene (domena X), helikaze RNA in od RNA odvisne polimeraze RNA. Sumi se, da ORF 1 kodira in določa patogene lastnosti virusa, saj se pri različnih potekih bolezni na tem delu genoma pojavljajo različne mutacije (Zhou in sod., 2016). Genotipsko specifične razlike v hipervariabilni regiji kažejo, da ta regija določa vrstni tropizem HEV in njegovo prilagajanje gostitelju (Nan in sod., 2017).

Odprt bralni okvir 2 (ORF 2) je dolg 1983 baz in kodira kapsidni protein, ki ima vlogo pri sestavljanju virusa, inkapsulaciji genoma, stabilizaciji kapsidnih delcev, infekciji in

imunskem odzivu gostitelja in je velik del viriona. Študije nakazujejo tudi, da ima ORF 2 pomembno vlogo pri vezavi in vstopu v celico (Donnelly in sod., 2017). Genetska primerjava zaporedij regije ORF 2 je pokazala več kot 85 % podobnost med genotipi 1–4.

Odprti bralni okvir 3 (ORF 3) se delno prekriva z ORF 2 in kodira poseben protein, katerega funkcije še niso popolnoma pojasnjene. Domneva se, da vpliva na odziv gostiteljske celice, tako da ga ta ne prepozna kot sovražnika in vzdržuje preživetje virusa. ORF 2 je nujno potreben za okužbo *in vivo* in sodeluje pri sproščanju virionov iz celice. Leta 2017 so odkrili, da so ključne strukturne lastnosti tega proteina enake kot pri viroporinih in da deluje kot ionski kanal, ki je nujno potreben pri sproščanju virusnih delcev iz celice (Zhou in sod., 2016).

2.2.3 Razmnoževanje HEV v celicah

Razmnoževanje HEV zaradi pomanjkanja primerne celične kulture, na kateri bi gojili virus HEV, še vedno ni povsem pojasnjeno. Virus v organizem najverjetneje vstopi skozi epitelne celice, se veže na površino hepatocitov prek heparin sulfat proteoglikanov in prek receptorjev vstopi v celico. Znotraj celice pride do slačenja virusa, sproščanja RNA in prepisovanja nestrukturnih proteinov. Pozitivna RNA se prepíše v negativno s pomočjo od RNA odvisne polimeraze RNA. Negativna RNA postane predloga za 7,2 kb dolgo pozitivno RNA in 2,2 kb dolgo subgenomsko RNA. S pomočjo subgenomske RNA se tvorijo proteini regij ORF 2 in ORF 3. Proteini regije ORF 2 se z RNA sestavijo v virion, proteini regije ORF 3 pa optimizirajo razmnoževanje. Virioni izstopijo iz hepatocitov, obdani s proteini ORF 3 in lipidno plastjo, nato se ločijo od viriona (Khuro in sod., 2016).

2.2.4 Ohranjanje kužnosti virusa na različni temperaturi

Temperaturno stabilnost virusa je težko določiti kljub številnim do zdaj izvedenim poskusom. Zaradi uporabe različnih metod, časa in temperature obdelave, materialov in seveda načinov dokazovanja virusne RNA rezultati različnih poskusov niso popolnoma primerljivi. Dokazali so, da virus na sobni temperaturi ostane infektiven več tednov. Inaktivacijo virusa povzroči segrevanje kužnega materiala pri 56 °C za 1 h. Toplotna obdelava virusa v albuminu pri 60 °C za 30 min je bila manj uspešna, saj so virusi, ki jih obdajajo tkiva oziroma hranilni matriksi, bolj zaščiteni pred vplivom višje temperature. Pri poskusu z jetri, pozitivnimi na HEV, obdelanimi na različne načine pri različni temperaturi in intravenozno inokuliranimi zdravim prašičem, so ugotovil naslednje: kuhanje v vreli vodi 5 min in cvrenje, s temperaturo v sredini

tkiva 71 °C, pri prašičih ni povzročilo okužbe, enaka obdelava jeter pri 56 °C za eno uro pa virusa ni uničila. Paštetam podobni pripravki, od 5 do 20 min obdelani s temperaturo od 62 do 71 °C, so povzročili okužbo prašičev. Obdelava pri temperaturi 71 °C za 20 min je virus popolnoma inaktivirala. HEV je ostal kužen po obdelavi 62 °C/120 min, 68 °C/20 min, 71 °C/10 min (Cook in van der Poel, 2015).

2.3 Način prenosa virusa in pojavljanje po svetu

Za HEV je značilno, da se način prenosa in razvoj okužbe razlikujeta glede na genotip virusa.

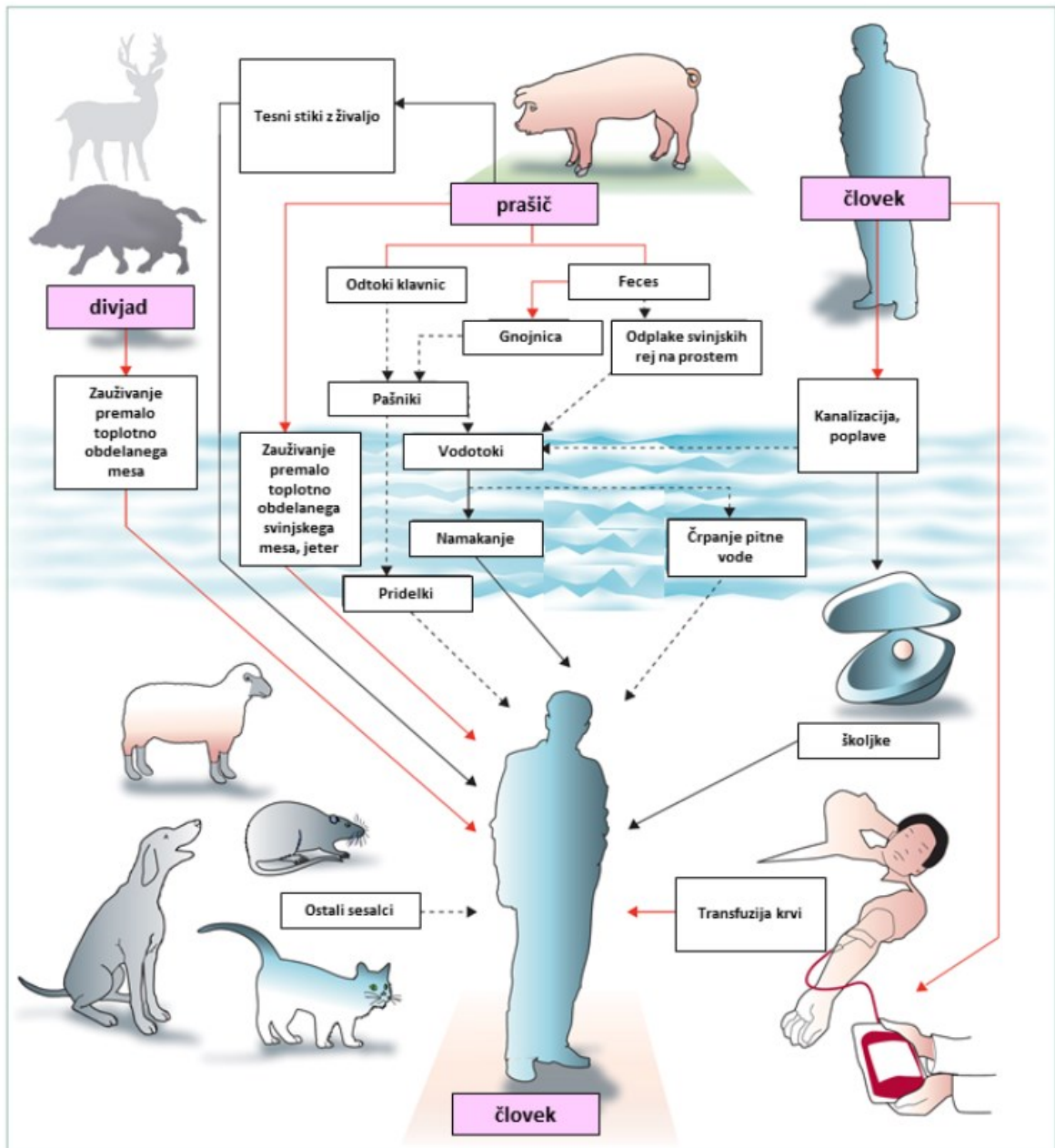
2.3.1 Osnovne razlike med HEV iz genotipov 1, 2, 3 in 4

2.3.1.1 HEV, uvrščeni v genotipa 1 in 2

HEV iz genotipov 1 in 2 se prenašajo po fekalno-oralni poti in povzročajo okužbo pri ljudeh. Pojavljajo se v manj razvitih državah, kjer imajo težave s prenaseljenostjo, slabimi sanitarnimi razmerami in higieno, dodatno pa k izbruhom bolezni prispevajo še deževna obdobja (Azija, Bližnji vzhod, S in Z Afrika, Srednja Amerika). Virusi se izločajo v okolje s fecesom klinično ali subklinično okuženih ljudi, kar ohranja okužbo v populaciji. Največkrat do okužbe pride prek pitne vode, kontaminirane s fekalijami. Na ta način se okužba izredno hitro širi in povzroči epidemije z več tisoč okuženimi ljudmi hkrati. Smrtnost je od 0,2 do 4 %. V redkih primerih lahko pride do vertikalnega prenosa okužbe iz matere na otroka, ta način okužbe je bil do zdaj dokazan samo pri HEV iz genotipa 1 (Donnelly in sod., 2017). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) ocenjuje, da se vsako leto okuži 20 milijonov ljudi, od tega je približno 3,3 milijona okužb simptomatskih. Zoonotski prenos je malo verjeten, saj HEV iz genotipov 1 in 2 še nikoli niso ugotovili pri živalih, prav tako do okužbe prašičev ni prišlo pri eksperimentalnih poskusih (Nan in sod., 2017).

2.3.1.2 HEV, uvrščeni v genotipa 3 in 4

HEV, ki spadajo v genotipa 3 in 4, se pojavljajo povsod po svetu, kjer redijo prašiče. Značilne so občasne okužbe, pojavljajo pa se tako v razvitih kot nerazvitih državah. Epidemični izbruhi niso dokumentirani, ker je za varno pitno vodo dobro poskrbljeno. Gre za zoonozo, glaven naravni rezervoar predstavljajo domači prašiči. Poznamo več načinov prenosa virusa kot pri genotipih 1 in 2 (Slika 3).



Slika 3: Načini prenosa okužbe s HEV, ki so uvrščeni v genotipa 3 in 4 (rdeče puščice - dokazani način prenosa, črne puščice - močan sum, da je prišlo do prenosa, in črtkane puščice - potencialni način prenosa) (Dalton in sod., 2008).

Figure 3: Transmission routes of HEV infection for genotype 3 and 4 (red lines-confirmed routes, black lines- strong evidence and broken lines- potential routes) (Dalton et al., 2008).

2.3.2 Načini prenosa HEV genotipov 3 in 4 na človeka

2.3.2.1 Prenos s hrano

Do okužbe s HEV iz genotipov 3 in 4 v razvitih državah v večini primerov pride z uživanjem surovega ali premalo toplotno obdelanega svinjskega mesa, svinjskih jeter ali izdelkov iz svinjine. Prvi neposreden dokaz zoonotičnega prenosa HEV so dokumentirali leta 2003. Okužila se je skupina ljudi, ki so zboleli po uživanju surovega jelenjega mesa, jedi značilne za Japonsko. V ostankih mesa so dokazali virusno RNA HEV, primerjali nukleotidna zaporedja vzorcev mesa in okuženih pacientov, in ugotovili popolno ujemanje (Tei in sod., 2003). Tej objavi so sledile še druge, kot je prenos HEV z mesom divjega prašiča, pečenega na žaru, na Japonskem (Li in sod., 2005), svinjsko meso v Španiji (Riveiro-Barciela in sod., 2015) in okužba s klobaso figatellu na Korziki (Renou in sod., 2014).

Obstaja še veliko drugih opisanih primerov okužbe s svinjskim mesom oziroma izdelki, vendar je pogosto težko potrditi izvor okužbe, saj je inkubacijska doba bolezni precej dolga, okužba je pogosto asimptomatska in redko imamo priložnost naknadno vzorčiti izdelek, za katerega sumimo, da bi lahko bil vzrok za okužbo (Doceul in sod., 2016).

Na Japonskem, v ZDA, Nemčiji, na Nizozemskem, v Angliji, Italiji, Španiji in na Češkem so v trgovinah vzorčili svinjska jetra za prodajo ter dokazali prisotnost RNA HEV (Geng in Wang, 2016).

2.3.2.2 Prenos s transfuzijo

Okužba ljudi s HEV prek transfuzije krvi je mogoča. Seroprevalenca med krvodajalci v evropskih državah ima velik razpon, od 5 % na Irskem pa do 52 % v Franciji. Velike razlike so ugotovili tudi med različnimi regijami v istih državah. Tipičen primer je Francija, razlaga za ta pojav pa je najverjetneje v različnih prehranskih navadah in nekaterih tipičnih jedeh, ki so značilne za posamezne dele države, na primer klobasa figatellu (Clemente-Casares in sod., 2016). Prevalenca virusne RNA HEV med krvodajalci znaša od 0,007 % do 0,03 %. Primere okužb prek transfuzije so že dokumentirali v Franciji, Angliji in na Japonskem (Geng in Wang, 2016).

2.3.2.3 Prenos z vodo

Epidemiologi ugotavljajo, da virusi genotipov 3 in 4 v razvitih državah ne povzročajo epidemij, saj je higienski standard bistveno višji kot v nerazvitem delu sveta. Vendar to ne pomeni, da prenos z vodo ni mogoč, saj odplake iz prašičjih farm lahko okužijo vodne vire. V

Sloveniji je leta 2011 prve podatke objavil Steyer s sod. in ugotovil, da je 3,3 % vzorcev vode rek pozitivnih na virusno RNA HEV (Steyer in sod., 2011), znan pa je tudi primer iz ZDA in Italije (Doceul in sod., 2016). Ob vzorčenju reke Meuse, ki teče iz Francije, skozi Belgijo, do Nizozemske so potrdili 17 % pozitivnih vzorcev (Geng in Wang, 2016). Z eksperimentalnim poskusom so tudi že dokazali, da z odpadki s prašičjih farm lahko okužimo prašiče (Kasorndorkbua in sod., 2004; Doceul in sod., 2016).

Do okužbe lahko prihaja tudi z uživanjem sadja ali zelenjave, kadar se polja namakajo z vodo, ki je onesnažena z živalskimi odpadki. Virusno RNA so našli na jagodah v Kanadi ter v zamrznjenih malinah, solati in zeliščih v Evropi (Doceul in sod., 2016; Treagus in sod., 2021).

Znani so tudi primeri okužbe z morskimi školjkami. Te namreč filtrirajo ogromne količine vode, v njih pa lahko pride do koncentriranja virusa, če se v bližini iztekajo odpadki iz prašičjih farm, ki onesnažujejo vodo (Mesquita in sod., 2016; Crossan in sod., 2012; Song in sod., 2010; Li in sod., 2007; Gao in sod., 2015). HEV iz genotipa 3 so izolirali iz školjk na Japonskem, v Koreji, Italiji, Veliki Britaniji, na Finskem, v Grčiji in Španiji (Geng in Wang, 2016; Yugo in sod., 2013).

2.3.2.4 Vertikalni prenos

Kljub temu da trdnih dokazov o vertikalnem prenosu HEV genotipov 3 in 4 ni, je bil ta način prenosa s HEV genotipa 3 eksperimentalno dokazan pri kuncih, kar potrjuje možnost za vertikalni prenos (Geng in Wang, 2016).

2.3.2.5 Prenos s transplantacijo

Okužba s HEV je mogoča tudi pri transplantaciji jeter oziroma drugih organov (Schlosser in sod., 2012; Geng in Wang, 2016).

2.3.2.6 Prenos z mlekom

Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je po oceni strokovne skupine podala mnenje, da je mleko lahko potencialni vir okužbe s HEV, vendar v Evropi do zdaj še niso potrdili vzorca mleka, ki bi vseboval virusno RNA HEV. Mleko bi lahko bila težava v državah v razvoju, in sicer na manjših kmetijah, na katerih v tesnem stiku sobivajo različne živalske vrste (Ferri in Vergara, 2021).

2.3.3 Pojavnost okužb s HEV po svetu

Okužbe s HEV se pojavljajo povsod po svetu (Slika 4).

2.3.3.1 Evropa

V evropskih državah so za največji delež okužb s HEV pri prašičih odgovorni sevi, ki spadajo v genotip 3. Okužbe se med državami najpogosteje širijo z živimi prašiči, ki ne kažejo znakov okužbe. Humane okužbe, ki jih ljudje prinesejo s potovanj, spadajo večinoma v genotip 1. V zadnjih letih se je v Evropi začel pojavljati tudi genotip 4. Leta 2008 so ga ugotovili pri pacientu iz Nemčije (Wichmann in sod., 2008), leta 2011 pri prašičih v Belgiji (Hakze-van der Honing in sod., 2011), v Franciji pa so potrdili dva primera okužbe z genotipom 4 s tradicionalno sušeno klobaso figatellu, ki vsebuje prašičja jetra (Colson in sod., 2012; Tessé in sod., 2012). Leta 2011 so pri obolelih v Italiji dokazali okužbo s HEV, ki spada v genotip 4 (Garbuglia in sod., 2011). Kljub temu da se v zadnjih letih tako pri ljudeh kot pri prašičih pojavljajo sevi HEV, ki spadajo v genotip 4, se v Evropi še vedno največkrat odkrijejo sevi genotipa 3 (Geng in Wang, 2016a).

2.3.3.2 Azija

V Indiji, Nepal, Pakistanu in Bangladešu se v humanih izbruhih HEV vedno pojavlja genotip 1, so pa v vzorcih prašičev iz Indije našli tudi genotip 4. Na Kitajskem so do leta 2000 prevladovali sevi HEV iz genotipa 1, po tem obdobju pa prevladuje genotip 4. Prisoten je tudi genotip 3, za katerega sumijo, da je prišel iz Japonske. Genotipa 3 in 4 sta dominantna na Japonskem, v Južni Koreji in Singapurju, okužbe se pojavljajo občasno. V Srednji Aziji se pojavljajo tako izbruhi kot tudi občasni primeri genotipa 1 (Geng in Wang, 2016a).

2.3.3.3 Afrika

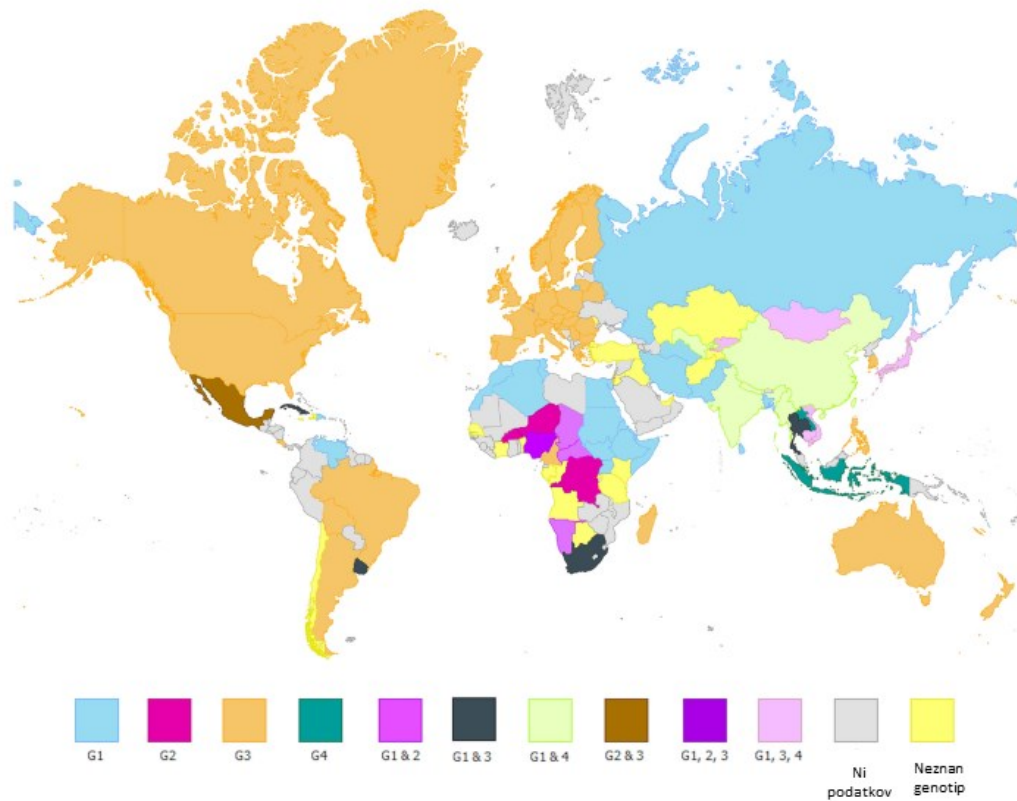
Obstaja malo podatkov o okužbah s HEV v Afriki. V Srednjeafriški republiki, Sudanu, Čadu, Egiptu in Namibiji so dokazali prisotnost genotipa 1. V Zahodni Afriki, Nigeriji in Namibiji prevladujejo sevi HEV, ki se uvrščajo v genotip 2. Genotip 3 je zelo redek, do zdaj so ga potrdili le pri enem pacientu v Egiptu (Geng in Wang, 2016a).

2.3.3.4 Amerika

V Ameriki prevladuje genotip 3, tako med ljudmi kot prašiči. V Venezueli, Argentini, Braziliji, Urugvaju in Boliviji kroži genotip 3, medtem ko so na Kubi pri izbruhih in tudi med občasnimi primeri izolirali genotip 1. Na Karibih so poleg genotipa 3 našli tudi genotip 1. V Mehiki so našli genotip 2 (Geng in Wang, 2016a).

2.3.3.5 Nova Zelandija in Avstralija

Na Novi Zelandiji so izolirali genotip 3, iz Avstralije pa prihajajo podatki, da je avtohtonih okužb zelo malo, večinoma gre za primere, povezane s potovanji (Geng in Wang, 2016a).



Slika 4: Geografski prikaz pojavljanja sevov HEV iz genotipov 1, 2, 3 in 4 po svetu (Treagus in sod., 2021).

Figure 4: Global geographical distribution of HEV strains from genotypes 1, 2, 3 and 4 (Treagus et al., 2021).

2.4 Klinična slika pri ljudeh

2.4.1 Akutni hepatitis

Okužba s HEV pri človeku povzroča akutni hepatitis s smrtnostjo od 0,5 % do 3 %. Klinična slika je pri okuženih podobna drugim virusnim hepatitisom. Epidemiološke študije kažejo, da se večina okužb pojavi pri mlajši populaciji (15–45 let) (Park in sod., 2016). Inkubacijska doba traja od 2 do 8 tednov, značilno je, da se najprej pojavijo nespecifični klinični znaki, podobni prehladu. Po kratki prodromalni fazi se lahko pojavijo bruhanje, svetlo blato, temen urin in zlatenica. Akutna faza traja različno dolgo, od nekaj dni pa tudi do nekaj tednov. Pri obolelih so lahko povišani jetrni encimi: jetrne transaminaze, bilirubin, alkalna fosfataza in γ -glutamyltransferaza. Bolezen v večini primerov izzveni sama od sebe, pacient pa popolnoma okreva. V redkih primerih pride do odpovedi jeter, smrtnost pa lahko doseže tudi 50 % v primeru nepravočasne transplantacije jeter. Patološka slika akutnega hepatitisa se kaže z nejasno lobularno strukturo jeter, nekoliko povečanim portalnim delom, infiltracijo limfocitov, proliferacijo Kupferjevih celic, povečanjem kapilar s holestazo, degeneracijo in fokalno nekrozo hepatocitov (Xin in Xiao, 2016).

Diagnostika akutnega hepatitisa temelji predvsem na epidemiološki poizvedbi, kliničnih znakih in laboratorijskih rezultatih. Pomembna je dobra anamneza, s katero pridemo do podatkov o morebitnem zaužitju termično neobdelanih svinjskih izdelkov ali morebitnih potovanjih v endemične dele sveta. Ker so klinični znaki enaki pri okužbi z vsemi virusnimi hepatitisimi, je na podlagi teh nemogoče vedeti, ali gre za okužbo s HEV. Najbolj zanesljiva je laboratorijska diagnostika, s katero dokažemo prisotnost virusne RNA v vzorcu blata ali dokaz specifičnih IgG/IgM v serumu. Virusno RNA lahko z RT-PCR zaznamo že dva tedna pred pojavom kliničnih znakov pa tudi dva meseca po okužbi. IgM lahko zaznamo z encimskoimunskim testom od štiri do pet mesecev po okužbi, IgG pa tudi leta kasneje (Xin in Xiao, 2016).

2.4.2 Kronični hepatitis

Kronično obliko okužbe definira prisotnost RNA HEV v serumu, ki traja več kot 6 mesecev. Kronične oblike okužb s HEV so najprej opazili leta 2008 pri nekaterih pacientih po transplantaciji jeter ali ledvic (Kamar in sod., 2015), kasneje se je takih primerov začelo pojavljati čedalje več. Sevi HEV iz genotipa 3 lahko povzročijo kronični hepatitis pri imunokomprimiranih pacientih, dokazano pa je bilo, da ga lahko sproži tudi genotip 4.

Genotipa HEV 1 in 2 za zdaj nista bila dokazana pri kronični obliki. Kombinacija okužbe z virusom humane imunske pomankljivosti (HIV) in HEV lahko povzroči stalno prisotnost HEV pri pacientu. Kronična okužba pri imunokomprimiranih pacientih pogosto vodi do kroničnega hepatitisa, fibroze in ciroze jeter. Pacienti le redko kažejo tipične klinične znake (Xin in Xiao, 2016).

2.4.3 Ekstrahepatični zapleti okužbe s HEV

Nevrološki zapleti so redki, kljub vsemu pa so znani primeri pojava Guillain-Barréjevega sindroma, Bell-ove paralize obraza, nevralgične amiotrofije, akutnega transverznega mielitisa in akutnega meningoencefalitisa.

Okužba s HEV se povezuje tudi s trombocitopenijo, hemolizo, akutnim pankreatitisom in nekaterimi avtoimunimi boleznimi (Xin in Xiao, 2016).

2.5 HEV kot zoonoza

Leta 1997 so prvič odkrili prisotnost RNA HEV pri prašičih in tako posumili, da gre pravzaprav za zoonozo (Meng in sod., 1997). V letih, ki so sledila, so humane seve HEV iz genotipov 3 in 4 genetsko primerjali s prašičjimi sevi HEV in ugotovili, da so si nukleotidna zaporedja zelo podobna. Dodatno so to hipotezo potrdili tudi s poskusom, pri katerem so SPF (ang. *specific pathogen free*) prašiče intravenozno okužili z vzorci ljudi, okuženih s HEV. Po okužbi so prašiči z blatom izločali HEV, potrdili so viremijo in serokonverzijo (Feagins in sod., 2008). Nadaljevali so s poskusom okužbe med različnimi živalskimi vrstami, prašiče so uspešno okužili z zajčjim sevom HEV, ne pa tudi s podganjim (Cossaboom in sod., 2012). Kasneje so s poskusom dokazali tudi okužbo pri stiku divjega in domačega prašiča (Schlosser in sod., 2014). Vsi dosedanji poskusi okužbe prašičev z genotipoma 1 in 2 so bili neuspešni (Meng in sod., 1998).

V razvitih državah je po letu 2000 zaznati porast okužb z genotipoma 3 in 4. Najverjetneje gre vzrok iskati tudi v večjem zavedanju možnosti okužbe s HEV ter bolj razviti diagnostiki hepatitisnih okužb in ne gre le za dejansko povečevanje števila okuženih ljudi (Geng in Wang, 2016).

2.5.1 Rezervoarji virusa HEV

Seznam živalskih vrst, ki so dovzetne za okužbo s HEV, se je v zadnjih letih močno podaljšal in se še naprej širi. Kljub temu še vedno glavni rezervoar virusa predstavljajo domači in divji prašiči. Pri nekaterih živalskih vrstah so uspeli izolirati RNA HEV, pri drugih so potrdili samo prisotnost specifičnih protiteles. RNA HEV so dokazali pri zajcih, nekaterih primatih, petih vrstah netopirjev, podganah, rovkah, jelenih, mungih, losih, podlasticah, kunah, kamelah in postrvih. V skupino morebitnih prenašalcev HEV so do zdaj uvrstili azijskega črnega medveda, dimastega leoparda, psa, mačko, lisico, konja, govedo, jaka, ovco in kozo (Widén, 2016; Kenney, 2019).

2.5.2 Potek okužbe in razvoj bolezni pri prašičih

2.5.2.1 Starost pri okužbi

Navadno do okužbe prašičev pride pri starosti od osem do dvanajst tednov, ko pasivna imunost, ki jo mladički dobijo prek matere s kolostrumom, upade. Vendar pa do okužbe lahko pride tudi že veliko prej. Bistveno razliko so dokazali pri svinjah z različnim imunskim statusom in njihovih mladičih. Pri seropozitivnih svinjah z visokim nivojem specifičnih IgG

so pri prašičkih potrdili maternalno imunost do devet tednov starosti, pri svinjah s slabo protitelesno imunostjo proti HEV pa le od enega do tri tedne po rojstvu. V več študijah so tudi že ugotovili RNA HEV v fecesu plemenskih svinj (16–21 % pozitivnih), kar pomeni, da pozitivne živali lahko predstavljajo rezervoar virusa v reji in v periodičnih presledkih izločajo virus v okolje. Tako lahko do okužbe pride že pred odstavljanjem. Kljub temu velja, da v večini primerov prihaja do okužb v času odstavljanja in mešanja različnih skupin prašičkov (de Deus in sod., 2008; Meester in sod., 2021; Krog in sod., 2019).

2.5.2.2 Poti prenašanja okužbe med prašiči

Okužba se največkrat vnese v rejo z nakupom nove živali. Prašiči izločajo virus s fecesom in urinom. Virus se tako akumulira v okolju, zato je vrsta tal v hlevu nadvse pomembna, saj so ob slabših higienskih razmerah v hlevu, živali v stalnem stiku z virusom. Živali izločijo čez dan bistveno večjo količino urina kot fecesa in obstaja sum, da se z urinom HEV izloča dalj časa. Če so napajalniki in krmilniki nezaščiteni, lahko prihaja do kontaminacije le teh s fecesom in urinom, kar še dodatno poveča možnost za okužbo, saj je virus v okolju stabilen in dolgo časa ohrani kužnost. Največjo nevarnost za razširitev in kroženje virusa v reji in med rejami predstavlja mešanje različnih skupin prašičev (Meester in sod., 2021). Reprodukcijsko število za HEV, ki nam poda oceno koliko prašičev lahko en prašič okuži med celotno dobo izločanja virusa, se giblje od 1 pa vse do 8,8, odvisno od študije (Berto in sod., 2012). Višje ko je reprodukcijsko število, lažje se virus prenaša in ostaja ter kroži v populaciji oziroma na farmi. Veliko tveganje predstavlja tudi uvajanje novih prašičev v rejo in s tem potencialno vnašanje novih sevov HEV od zunaj (Meester in sod., 2021).

2.5.2.3 Količina virusa, potrebna za okužbo

Minimalna količina za okužbo *per os* (p.o.) pri HEV še vedno ni čisto jasna, v poskusih so ocenili, da bi bilo potrebno uživanje 20 mg fecesa, ki vsebuje 10^8 GE (ekvivalent genoma, ang. *genome equivalent*) na dan, 3 dni zapored, za doseganje 50 % uspešnosti okužbe (Bouwknegt in sod., 2011). Poskus, ki so ga izvedli z različnimi odmerki virusnih suspenzij, pripravljenih iz jeter eksperimentalno okuženih prašičev, je pokazal, da je za okužbo prašiča p.o. in nadaljnje širjenje virusa s fecesom potrebnih najmanj 10^6 GE. Pri intravenozni (i.v.) okužbi je dovolj že 10^2 GE (Andraud in sod., 2013).

2.5.2.4 Potek okužbe in imunski odziv

Okužbi sledi viremija, ki traja od enega do dveh tednov. Temu sledi izločanje virusa s fecesom in urinom, kar običajno traja do osem tednov, lahko pa tudi dlje. Ugotovili so že primer prašiča, ki je virus izločal 3 mesece (Clemente-Casares in sod., 2016). Hkrati z izločanjem virusa s fecesom se v serumu pojavijo specifični IgM, kasneje pa še IgG (Yugo in sod., 2013). S starostjo živali prevalenca HEV pozitivnih prašičev pada, prevalenca seropozitivnih prašičev pa narašča. Nekatere študije nakazujejo, da je protitelesna zaščita razmeroma kratka in da lahko prihaja do ponovnih okužb (Chandra in sod., 2008).

Sočasna okužba z virusom prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) močno vpliva na potek okužbe s HEV. Izločanje HEV z blatom ali urinom se pojavi kasneje (začetek izločanja virusa se podaljša za 1,9 kratni faktor), količina izločenega virusa se poveča, podaljša se obdobje izločanja virusa v okolje z izločki (v povprečju 48,6 dni pri sočasni okužbi s PRRS, pri samostojni okužbi s HEV pa le 9,7 dni), prihaja pa lahko tudi do kroničnih oblik okužbe s HEV, kar seveda poveča možnost vstopa viremičnih prašičev v klavnico v fazi izločanja virusa (Salines in sod., 2019; Salines in sod., 2015).

2.5.2.5 Klinični znaki okužbe

Naravno ali eksperimentalno okuženi domači prašiči ne kažejo nobenih kliničnih znakov bolezni. To je nevarno iz vidika prepoznavanja okužbe v času zakola, saj prašiči, okuženi s HEV, nemoteno vstopajo v klavnico in tako prek mesnih izdelkov kontaminiranih s HEV, tudi do potrošnika (Yugo in sod., 2013). Pri eksperimentu, ki ga je izvedel Bouwknegt s sodelavci, so pri prašičih, okuženih s stikom z drugimi prašiči, s histopatološko preiskavo ugotovili blag multifokalen limfohistiociten hepatitis. Spremembe so našli tudi v žolčniku (subepitelialne infiltracije limfohistiocitnih celic), v ileumu hiperplazijo Payerjevih plošč ter hiperplazijo bezgavk. Kljub temu da se virus razmnožuje v jetrih, ga dokažemo tudi v drugih organih, kot so želodec, ledvica, mišice (Clemente-Casares in sod., 2016).

2.5.3 Kritične točke za prenos virusa

2.5.3.1 Reje domačih prašičev

Obvladovanja okužb s HEV se je potrebno lotiti na več ravneh. Kritičnih točk, kjer lahko prihaja do prenosa virusa, je namreč veliko. Izvor HEV je seveda na ravni okužene reje. Kot prej omenjeno se virus izloča s fecesom in urinom, zato se brez težav pojavi in zadržuje v okolju. Potrebni sta sprotno čiščenje boksov ter dezinfekcija prostorov in opreme pred vsako

novo naselitvijo živali. Prav tako je zelo pomembno, da se lastniki reje in delavci zavedajo pomena biovarnosti. Kadar se oskrbniki živali gibljejo med različnimi starostnimi kategorijami živali, se morajo ob tem preobleči in preobuti, da preprečijo prenos virusa v reji. Največkrat do okužb prihaja v času, ko sesne prašičke odstavijo od matere in se živali različnih gnezd meša med seboj, zato bi bilo treba mešanje živali, kolikor je to mogoče, zamejiti. Težava je tudi vhlevljanje novih živali v reji, saj tako lahko vnesemo tudi nov sev HEV in pride do izbruha okužbe med prašiči, ki boleznijo še niso preboleli in/ali nimajo specifičnih zaščitnih protiteles. Če gre za starejšo kategorijo živali, je tveganje še večje, saj lahko okužene živali, namenjene klanju, s tem v klavnico zanesejo HEV (Meester in sod., 2021; Salines in sod., 2019). Dodaten izziv pri obvladovanju okužb s HEV lahko predstavljajo tudi neozaveščeni rejci. Prašiči, okuženi s HEV, ne kažejo kliničnih znakov, okužba ne vpliva na prirast in na velikost legla. Zato se hitro lahko zgodi, da rejci niti ne vedo za okužbo prašičev s HEV v reji in niso tako pazljivi pri zaježitvi okužbe, kot bi bili, če bi se bolezen kazala v klinični obliki (Teixeira-Costa in sod., 2020).

2.5.3.2 Klavnica

HEV spada med zoonoze, zato zakol okuženih prašičev lahko predstavlja določeno tveganje za potrošnika. V klavnici sta sicer nujna pregleda *ante* in *post mortem*, vendar kot že omenjeno kliničnih znakov, po katerih bi okuženega prašiča prepoznali, ni. Da ne bi prihajalo do navzkrižnih kontaminacij, je v klavnici in tudi kasneje v mesnopredelovalnem obratu treba slediti dobri praksi. Če se prašiče gara, je verjetnost, da se virus s površine kože prenese na meso, bistveno manjša, saj so temperature v bazenu približno 64 °C. Večjo nevarnost navzkrižne kontaminacije mesa in notranjih organov predstavlja odstranjevanje prebavil, pri katerem lahko pride do predrtja črevesja in kontaminacije trupa s fecesom, ter odstranjevanje žolčnika, pri katerem ravno tako lahko pride do predrtja in kontaminacije jeter z žolčem, v katerem se pri okuženi živali nahaja izredno velika količina virusa. Virus lahko delavci z rokami prenesejo tudi na druge dele prašičjega trupa.

2.5.3.3 Priprava hrane doma

Zadnja kritična točka so potrošniki in na koncu je edini način, da potencialno okužbo s HEV preprečimo ta, da meso oziroma mesne izdelke dovolj termično obdelamo. Pozorni moramo biti tudi pri pripravi hrane in upoštevati dobre prakse (ne samo zaradi HEV). To pomeni, da kuhinjskih pripomočkov, ki so bili v stiku s surovim mesom, jetri ali pripravki, nato ne uporabljamo pri rokovanju s termično že obdelano hrano.

2.6 Laboratorijska diagnostika HEV

Pri diagnostiki okužb s HEV se uporabljajo serološke metode, ELISA in imunoblot (IB), ter molekularne metode, klasično metodo RT-PCR in RT-PCR v realnem času.

Z encimskoimunskim testom se dokazuje prisotnost specifičnih protiteles proti HEV v serumu prašičev oziroma drugih živalskih vrst. Obstaja nekaj komercialnih diagnostičnih encimskoimunskih testov, vsem pa je skupno to, da so slabo specifični. Za dokazovanje specifičnih protiteles proti HEV v serumu prašičev lahko uporabljamo tudi metodo imunoblot, vendar komercialnega testa, za uporabo pri prašičjih serumskih vzorcih, na trgu trenutno ni. Za potrebe naše raziskave smo modificirali test, ki je sicer namenjen za dokazovanje specifičnih protiteles proti HEV v humani medicini.

Molekularne metode so visoko specifične in z njimi lahko ugotavljamo RNA HEV v različnih vrstah vzorcev. Pri nekaterih vzorcih ni nikakršnih težav z izolacijo RNA HEV, kot na primer v blatu, jetrih, žolču in serumu, v katerih jo največkrat dokazujemo pri prašičih. Veliko več je težav pri mesnih oziroma jetrnih izdelkih, predvsem tistih pri katerih gre za mešanice in vsebujejo maščobe (Salines in sod., 2019).

Raziskovalci po vsem svetu si že več let prizadevajo razviti stabilno celično kulturo za izolacijo in gojenje HEV, vendar do zdaj niso bili uspešni (Meister in sod., 2019).

2.6.1 ELISA

Encimskoimunski test so izumili leta 1971, z uporabo mikrotiterskih plošč pa so jo nadgradili leta 1980. Z leti je metoda postala del rutinske diagnostike v laboratorijih kot tudi med raziskovalci. Na dno mikrotiterske plošče je vezan antigen na katerega se vežejo iskana specifična protitelesa iz vzorca ali pa so na dnu vezana specifična protitelesa, s katerimi v preiskovanem vzorcu lovimo določen antigen. Za označevanje dokazovalnih protiteles (konjugat) se uporabljajo različni encimi: beta galaktozidaza, glukooksidaza, peroksidaza ali alkalna fosfataza. Za ustavitev reakcije se dodajo NaOH, HCl ali H₂SO₄. Rezultat reakcije se odčita s spektrofotometrom na dolžini 400–600 nm. Poznamo več tipov encimskoimunskih testov, ki s svojo specifičnostjo lahko podajo zelo natančne rezultate.

2.6.1.1 Sendvič ELISA

Pri tem tipu je na mikrotitersko ploščo vezan antigen. Ko dodamo vzorec, se nanj veže protitelo in tvori se antigen protitelo kompleks. Da bi ta postal viden se doda specifičen konjugat, ki se veže na kompleks antigen-protitelo. Po dodatku substrata se sproži katalizirana reakcija, ki povzroči obarvanje substrata in nam omogoči odčitavanje rezultata.

2.6.1.1.1 Lovilna ELISA

Gre za podtip sendvič ELISA (ang. *capture ELISA*), pri katerem je na mikrotitersko ploščo vezano specifično protitelo, in ko dodamo vzorec z antigenom, nastane kompleks protitelo-antigen. Nato dodamo za antigen specifičen konjugat, ki se veže na antigen in tako nastane kompleks protitelo-antigen-protitelo. Rezultat odčitamo iz barvne reakcije. Sendvič ELISA je od dva do petkrat občutljivejši od drugih tipov ELISA.

2.6.1.2 Kompetitivna ELISA

Na mikrotitersko ploščo je vezan specifičen antigen ali protitelesa, specifična za iskani antigen. V jamico hkrati dodamo preiskovani vzorec in z encimom označena protitelesa ali antigen (konjugat), zato v času inkubacije pride med iskanimi elementi iz vzorca ter konjugatom do kompeticije za vezavna mesta. Če je v vzorcu prisotno veliko iskanih elementov, bo obarvanost substrata obratno sorazmerna s količino iskanih elementov iz preiskovanega vzorca, kar pomeni, da pri negativnem rezultatu nastane močna obarvanost substrata (Aydin, 2015).

2.6.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) ter verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo (ang. “*polymerase chain reaction*”; PCR) je molekularno-biološka metoda, ki omogoča tarčno pomnožitev specifičnega zaporedja DNA (Rahman in sod., 2013). PCR je leta 1983 odkril biokemik Kerry Mullis (Saiki in sod., 1985) ob encimsko posredovani amplifikaciji genomskega zaporedja gena beta-globulina v namene diagnoze srpaste anemije. Po letu 2000 je diagnostika v virološkem laboratoriju pri večini patogenov prešla s klasičnih metod na PCR.

Metoda PCR temelji na uporabi encima DNA polimeraze, ki omogoča *in vitro* pomnožitev specifičnega zaporedja DNA. Sledi nastanek več kot 10^6 – 10^9 kopij določene regije genoma (specifična tarčna DNA, bodisi kodirajoče ali nekodirajoče zaporedje DNA). PCR tako omogoča pomnoževanje vzorca DNA (zadostuje minimalna količina tarčne specifične DNA) za določitev prisotnosti, na primer patogena v določenem vzorcu (kri, slina, celice ipd.), ali pa se uporablja kot metoda izbora pri kloniranju različnih genskih konstruktov. PCR se tako uporablja v namene diagnostike, kloniranja, raziskovanja, forenzike ipd.

Celotna reakcija PCR poteka v termopomnoževalniku (cikličnem termostatu), ki omogoča hitro in natančno ogrevanje ter ohlajanje reakcijskega okolja. Običajno PCR zajema 20–40 ciklov temperaturnih sprememb ali t. i. termičnih ciklov, pri čemer vsak cikel vsebuje dva ali tri različne korake. Reakcija PCR se začne s fazo denaturacije, pri kateri se reakcijska mešanica ogreje na 94–98 °C (20–30 sekund), kar povzroči razcep vodikovih vezi med verigama DNA in nastanek dveh enoverižnih DNA (ang. *single-stranded DNA*; ssDNA). Pri uporabi določenih DNA polimeraz, ki za delovanje potrebujejo visoko temperaturo, se pred fazo denaturacije reakcija ogreje, na primer za 1–10 minut na 94–96 °C ali celo 98 °C; govorimo o fazi inicijacije. Fazi denaturacije sledi faza naleganja, pri kateri začetni oligonukleotidi nalegajo na komplementarno zaporedje DNA. Pri tej fazi je pomembna temperatura naleganja, ki je odvisna od koncentracije posameznih nukleotidov oligonukleotida. Nastanek dvojno verižne DNA (dsDNA) (po naleganju oligonukleotidov na ssDNA) oziroma hibridizacija je ključna, saj encim DNA polimeraza lahko pomnožuje DNA le ob prisotnosti dsDNA. Prav tako je pomembno, da so oligonukleotidi specifični in prepoznavajo samo zaporedje tarčne DNA. Sledi faza elongacije ali ekstenzije (podaljševanja verige), pri kateri je temperatura pomnoževanja odvisna od uporabljene DNA polimeraze (Rahman in sod., 2013; Zhu in sod., 2020). Denaturacija, naleganje in elongacija predstavljajo

en posamezni cikel PCR reakcije. Določenim številom ciklov sledi posamezna stopnja končnega podaljševanja ter končno ohlajanje reakcijske mešanice na nizko temperaturo. Učinkovitost PCR določamo po formuli 2^n , pri čemer je n število ciklov. Ob optimalnem delovanju bi v vsakem ciklu morali nastati dve kopiji molekule DNA iz vsake DNA.

Produkti PCR se v glavnem vizualizirajo z uporabo interkalirajočih se DNA barvil (na primer etidijev bromid) ali fluorescenčnih oligonukleotidov (Garibyan in Avashia, 2013). Največkrat se uporablja agarozna gelska elektroforeza, ki omogoča potovanje PCR produktov od katode proti anodi ter posledično ločevanje produktov PCR na podlagi različnih velikosti.

Glede na različne pogoje oziroma lastnost posameznih ciklov ter zelenega rezultata ločimo več različnih PCR. Če želimo določiti količino specifične DNA ali gena v vzorcu, se odločimo za t. i. kvantitativni real-time ali qRT-PCR. Pri tej metodi se količina DNA izmeri v danem oziroma realnem času, torej v času sinteze novih specifičnih verig DNA. Detekcijo DNA v realnem času omogoča uporaba bodisi fluorescenčnih DNA interkalirajočih se barvil (na primer SyberGreen) bodisi specifičnih DNA fluorescenčnih sond (na primer Taq-man Probes). Uporaba slednjih omogoča dokazovanje DNA po hibridizaciji sonde s komplementarno tarčno DNA. RT-PCR se lahko kombinira z reverzno transkripcijo, reakcijo, pri kateri se mRNA (izolirana iz vzorca, ki ga preiskujemo) prepíše v komplementarno DNA ali cDNA. Količina slednje se nato določa v reakciji qPCR (Garibyan in Avashia, 2013; Kralik in Ricchi, 2017).

Fluorescenca nastalega PCR produkta se izmeri na koncu vsakega cikla, s tem da intenzivnost fluorescenčnega signala korelira s količino tarčnega specifičnega DNA pomnožka, kar sovпада s količino prisotne preiskovane DNA. Točka, pri kateri intenziteta fluorescence preide v eksponentno rast se smatra kot vrednost *Ct* (ang. *cycle threshold*) vzorca in določa absolutno vrednost količine DNA v preiskovanem vzorcu ob upoštevanju ustrezne kalibracijske krivulje ali standardov. Če standardov nimamo in se uporabljajo le ustrezne referenčne kontrole, govorimo o semi-kvantitativnih rezultatih, pri katerih ugotavljamo, da je količina posameznega gena v vzorcu večja ali manjša od kontrole. RT-PCR v eni stopnji se standardno uporablja tudi v diagnostiki patogenov, saj metoda omogoča hitro in natančno diagnozo, je varna in razmeroma poceni metoda, in po začetni amplifikaciji ni več mogoča navzkrižna kontaminacija vzorcev (Kralik in Ricchi, 2017).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorčenje

V raziskavo smo vključili 811 prašičev ob prihodu v zakol. Razdelili smo jih v tri starostne skupine: 322 odojkov (starost tri mesece), 400 pitancev (starost šest mesecev) in 89 plemenskih svinj (starost od enega do štirih let). Vzorčili smo v štirih različnih klavnicah: Celjske mesnine, Meso Kamnik, klavnica farm Ihan v Šentjurju in klavnica Panvita Gornja Radgona. Vzorčenje je potekalo od začetka junija do konca septembra 2014, v tem obdobju smo vzorčili skupno 29 dni. Pri izboru živali, pri katerih smo nameravali odvzeti vzorce, smo si pomagali s spremno dokumentacijo in sproti spremljali, iz katerih rej živali izvirajo, saj smo želeli dobiti čim bolj reprezentativne vzorce. Iz starostne skupine pitancev smo iz vsake reje odvzeli vzorce petim živalim. Ker odojkov in plemenskih svinj v zakol pripeljejo bistveno manj kot pitancev, smo pri teh dveh kategorijah vzorce odvzeli večjemu številu živali iz iste reje, saj smo le tako lahko zagotovili zadostno število vzorcev iz teh dveh starostnih kategorij. Živali (811) so izvirale iz 81 različnih rej (Tabela 1), iz nekaterih rej smo pri prašičih odvzeli vzorce večkrat, iz drugih rej samo enkrat. Devetnajst rejcev prašičev, od katerih so prašiče pripeljali v zakol v klavnico v času našega vzorčenja, je uvažalo prašiče iz Avstrije, Nemčije, Slovaške in Nizozemske.

Tabela 1: Razporeditev rej po statističnih regijah Slovenije, število rej po krajih (mesto/vas) in število prašičev pri katerih smo odvzeli vzorce pri posamezni starostni kategoriji (vzorčenje v klavnicah).

Table 1: Distribution of farms by statistical regions of Slovenia, number of farms per town and number of sampled pigs from different age groups (sampling in slaughterhouses).

Regija	Mesto/vas	Število rej	Število prašičev, od katerih smo odvzeli vzorce		
			odojki	pitanci	plemenske svinje
Jugovzhodna regija	Gradac	1		5	
	Trebnje	1			2
	Podturn	1	5		
	Klinja vas	1	15		49
Osrednje-slovenska regija	Kamnik	1	8	10	
	Dol pri Ljubljani	1		5	1
Podravska regija	Rače	1		4	
	Drvanje	1	5		
	Slov. Bistrica	1		24	
	Benedikt	1		10	
	Sv. Ana	3		24	
	Ormož	1		15	
	Miklavž	1	30	10	
	Starše	1		4	
	Sv. Trojica	1	10		
	Zg. Duplek	1	12		
	Destrnik	3		20	
	Gorišnice	1		5	
	Cerkvenjak	2		10	
	Jurovski Dol	2	5	5	
	Pernica	1		5	
Podgorci	2		15		

	Vitomarci	1		5	
	Orehova vas	1	26		
	Markovci	1		5	
	Cirkovce	2		26	
	Videm pri Ptuju	1		10	
Pomurska regija	Sp. Kamenščak	1	2		
	Apače	4		20	
	Sp. Ivanjci	1	5		
	Križevci	5	29	10	
	Bakovci	1	35	15	8
	Lastomerci	1		5	
	Mala Nedelja	2		19	
	Radenci	1	9		
	Gornja Radgona	5	15	31	
	Bodonci	2		10	
	Rakičan	1		12	
	Bogojina	1		5	
	Tišina	1		10	
	Murska Sobota	1	3		
	Šratovci	1		2	
	Nemščak	1	8	15	
	Zbigovci	1		5	
	Selišči	1		5	
	Stara nova vas	1	5		
	Vanča vas	1	5		
	Plitvica	1	5		
	Ljutomer	2	75		
	Gerlinci	1	5		
Krašči	1	5			

	Puconci	1		10	
Posavska regija	Pristava Krško	1			25
Savinjska regija	Žalec	1			1
	Štore	1			2
	Šoštanj	1		5	
	Bučje	1		2	
	Celje	1		2	
Zasavska regija	Trbovlje	1			1
Skupaj	60 vasi/mest	81	322	400	89

3.1.1 Vzorci blata, jeter, žolča in krvi ter način odvzema vzorcev

Posameznim prašičem smo ob zakolu odvzeli štiri vrste vzorcev:

- blato (811 vzorcev),
- jetra (811 vzorcev),
- žolč (811 vzorcev),
- kri (359 vzorcev).

Na čistem delu klavne linije smo vzorčili blato, jetra in žolč. Blato smo odvzeli pri posameznem prašiču iz kolona, po odstranitvi črevesja iz telesa. Kolon smo zarezali s sterilnim skalpelom ter odvzeli vzorec blata (30 g) v sterilne 50-mililitrske epruvete (Slika 5). Žolč (2 ml) smo odvzeli iz žolčnika s sterilno iglo (Slika 6). Po odstranitvi žolčnika, pri čemer smo pazili, da ga nismo prebodli, smo s skalpelom odvzeli še vzorec jeter (košček 5 cm x 3 cm, debeline 1 cm). Jetrno tkivo smo vzorčili vedno na istem mestu, kjer smo odstranili žolčnik (Slika 7).



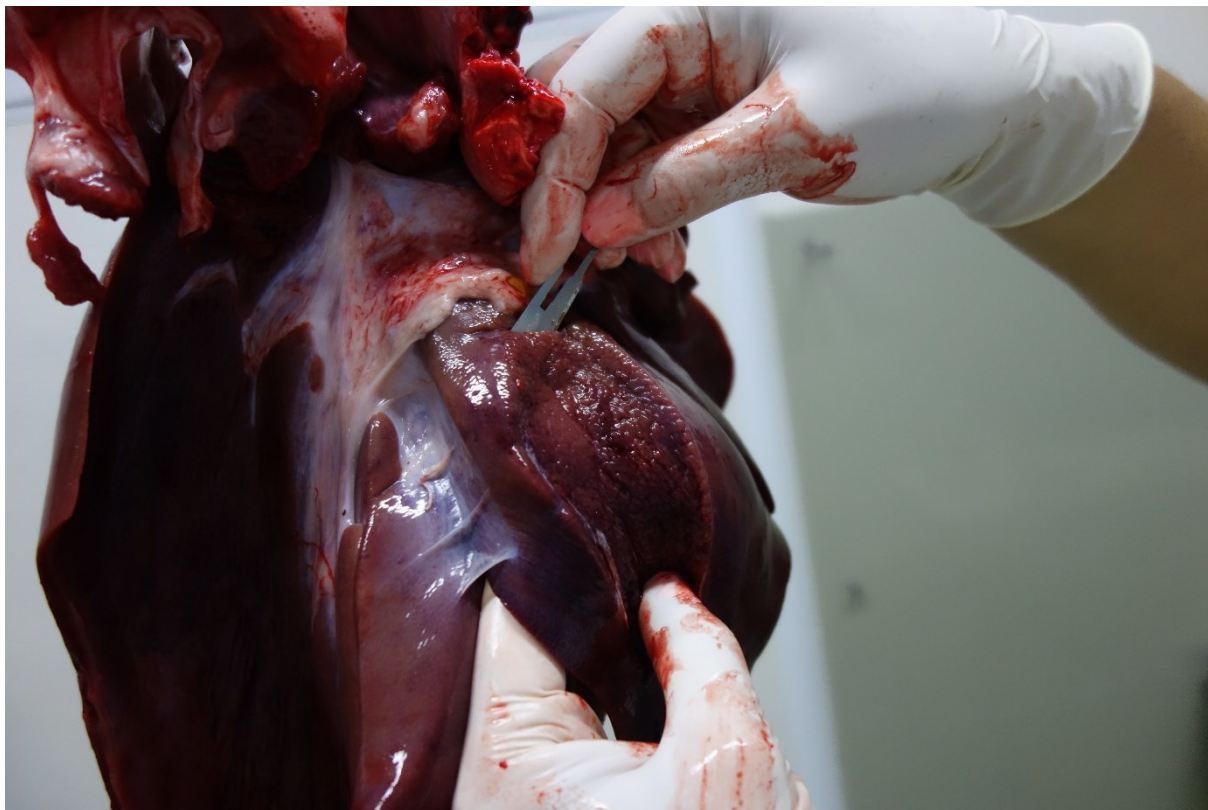
Slika 5: Odvzem vzorca blata iz kolona prašičev v klavnici.

Figure 5: Sampling of feces from porcine colon at the slaughterhouse.



Slika 6: Odvzem vzorca žolča iz žolčnika prašičev v klavnici.

Figure 6: Sampling of bile from porcine gall bladder at the slaughterhouse.



Slika 7: Odvzem vzorca jeter prašičev po odstranitvi žolčnika.

Figure 7: Sampling of porcine liver after removal of the gall bladder.

Pri odvzemu vzorcev smo bili pozorni, da smo za vsako posamezno vzorčenje uporabili nove rokavice, uporabili nov sterilni skalpel in novo sterilno injekcijo z iglo. S tem smo preprečili medsebojno (navzkrižno) kontaminacijo vzorcev med postopkom odvzema.

Vzorke smo na Veterinarsko fakulteto transportirali v hladilni torbi in jih do nadaljnje obdelave shranili v zamrzovalniku pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ob zakolu prašičev smo skupno odvzeli 359 vzorcev krvi, od tega 101 vzorec krvi odojkov, 205 vzorcev krvi pitancev in 52 vzorcev krvi plemenskih svinj. Kri smo vzorčili na klavni liniji, na točki izkrvavitve živali po omamljanju. Vzorce smo odvzeli v 15-mililitrske sterilne epruvete brez antikoagulant (epruvete 15 ml, PP, sterilne; TPP, Švica), jih transportirali na Veterinarsko fakulteto v hladilni torbi ter jih shranili v hladilniku na temperaturi $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ do naslednjega jutra, ko smo epruvete centrifugirali, odvzeli 1 ml seruma in ga shranili v zamrzovalniku pri temperaturi $< -15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Vzorci brisov površin in način odvzema vzorcev

Med odvzemom vzorcev pri prašičih smo na liniji klanja odvzeli tudi brise površin. Na treh mestih na klavni liniji, za katera smo ocenili, da obstaja največja nevarnost navzkrižne kontaminacije, smo odvzeli 63 vzorcev brisov. Vzorce brisov smo odvezemali s sterilnimi suhimi vatiranimi palčkami (bris) (Golias labortechnika, Slovenija). V vsako epruvetko za shranjevanje suhega brisa smo pred uporabo dodali 2 ml transportnega medija RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Velika Britanija).

Določili smo tri kritične točke na klavni liniji kjer smo odvezemali brise:

1. Kavlj, na katere se obešajo jetra, pljuča in srce živali po eksenteraciji (Slika 8);
2. Zabojniki, kamor po veterinarskem pregledu odlagajo jetra prašičev (Slika 9);
3. Kavlj v hladilnici, na katerih so obešeni trupi prašičev po pregledu (Slika 10).



Slika 8: Kavelj, na katerem so obešeni notranji organi (pljuča, srce in jetra) prašičev po eksenteraciji.

Figure 8: Metal hook holding pigs' internal organs (lungs, heart and liver) after exenteration.



Slika 9: Kovinski zabojniki, v katere shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu.

Figure 9: Metal containers where porcine livers are stored after veterinary inspection.



Slika 10: Kavljji, na katere obešajo trupe prašičev v hladilnici.

Figure 10: Metal hooks holding pigs carcasses in the cooling room.

Kavlje za obešanje drobovine smo vzorčili vsake pol ure (z isto vatenko smo kavlje pobrisali štirikrat v dveh urah). Zabojnike, v katerih se shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu, smo vzorčili, ko je bil zabojnik poln: z isto vatenko smo obrisali tri zabojnike. Kavlje za obešanje trupov smo vzorčili po koncu klanja, z eno vatenko smo obrisali deset kavljev, ki smo jih izbrali naključno. Po koncu vzorčenja smo tako v enem dnevu pridobili tri skupne vzorce brisov, vsakega z ene kritične točke.

3.1.3 Vzorci mletega mesa in pečenic ter način odvzema vzorcev

Poleg individualnih vzorcev, ki smo jih odvzeli prašičem ob zakolu, smo dodatno odvzeli tudi 22 skupnih vzorcev mletega mesa, in sicer tako, da smo sledili serijam prašičev, ki smo jim vzeli tudi vzorce blata, jeter, žolča in krvi. Vzorci mletega mesa so bili odvzeti reprezentativno, iz vsake dnevne serije približno 50 g, ki so jih zbirali delavci v predelovalnem delu klavnice. Ker se mleto meso predeluje samo iz mesa pitancev, v teh vzorcih meso odojkov in plemenskih svinj ni bilo vključeno.

Odvzeli smo še 30 vzorcev pečenic, vendar je potrebno poudariti, da ti vzorci niso izhajali iz živali, katerim smo ob zakolu odvzeli vzorce blata, jeter, žolča in krvi. V tem primeru je šlo za druge živali, zato so vzorci pečenic popolnoma neodvisni od drugih vzorcev iz klavnice.

Vse vzorce mletega mesa in pečenic smo na Veterinarski fakulteti shranili v zamrzovalni skrinji na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nadaljnje obdelave.

V našo raziskavo smo poleg vzorcev krvi, odvzetih prašičem ob zakolu v klavnicah, vključili tudi 351 naključno izbranih serumskih vzorcev prašičev, ki so bili odvzeti na celotnem območju Slovenije v okviru letnega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014 (Tabela 2). Starostne skupine prašičev, katerim smo vzorce krvi odvzeli v klavnici in prašičev, katerim so vzorce krvi jemali v okviru letnega monitoringa kužnih bolezni, so se razlikovale. Prašiči ob zakolu v klavnici so bili stari tri mesece (odojki), šest mesecev (pitanci) in več kot dvanajst mesecev (plemenske svinje). Prašiči, katerim so vzorce krvi jemali v okviru letnega monitoringa, so bili stari od dva meseca do osem let. Vzorce serumov, ki smo jih izbrali za našo raziskavo, smo zato razporedili v tri starostne kategorije: živali starosti od dva do šest mesecev, živali starosti od šest do dvanajst mesecev in živali starosti dvanajst mesecev in starejše. Po tako določenih starostnih kategorijah smo v nadaljevanju raziskave tudi analizirali rezultate.

Tabela 2: Razporeditev rej po statističnih regijah Slovenije, število rej po krajih (mesto/vas) (izbrani serumski vzorci iz nabora vzorcev letnega monitoringa kužnih bolezní pri prašičih v letih 2013 in 2014).

Table 2: Distribution of farms by statistical regions of Slovenia, number of farms per town (serum samples picked out of samples collected as a part of annual monitoring of infectious pig diseases during year 2013 and 2014).

Regija	Mesto/vas	Število rej
Jugovzhodna regija	Šmarješke Toplice	1
	Novo mesto	1
	Črnomelj	1
	Straža	1
	Kočevje	1
	Žužemberk	1
	Semič	1
Osrednjeslovenska regija	Kamnik	2
	Grosuplje	1
	Ivančna Gorica	4
	Šmartno	3
	Litija	3
Podravska regija	Hajdina	2
	Ptuj	1
	Lenart	1
	Dornava	2
	Gorišnica	1

Pomurska regija	Murska Sobota	1
	Veržej	1
	Ljutomer	2
	Puconci	2
	Cankova	1
	Beltinci	1
	Tišina	2
Posavska regija	Krško	2
	Kostanjevica	1
	Sevnica	5
	Radeče	1
	Brežice	4
Savinjska regija	Braslovče	4
	Celje	1
	Laško	2
	Polzela	1
	Šmarje	4
	Vransko	1
	Podčetrtek	1
	Rogaška Slatina	1
	Slovenske Konjice	5
	Šentjur	3
	Zreče	1
	Žalec	1

Zasavska regija	Zagorje ob Savi	2
Gorenjska regija*	Kranj	1
	Preddvor	4
	Šenčur	2
	Škofja Loka	1
	Železniki	1
	Radovljica	1
	Žiri	1
Goriška regija*	Kanal	1
	Nova Gorica	1
	Vogrsko	1
	Tolmin	1
	Ajdovščina	1
Obalno-kraška* regija	Komen	2
	Piran	1
Primorsko- notranjska regija*	Ilirska Bistrica	1
Skupaj	56	97

*dodatne regije, ki jih ni v Tabeli 1

3.2 Metode

3.2.1 ELISA

Za testiranje vzorcev prašičjih serumov na prisotnost specifičnih IgG proti HEV smo uporabili dva komercialno dostopna encimskoimunski testa:

- ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet, Grabels, Francija) in
- HEV IgG ELISA porcine (Axiom, Bürstadt, Nemčija)

Prisotnost specifičnih IgG proti HEV smo dokazovali v serumskih vzorcih, odvzetih v letu 2014 pri prašičih ob zakolu v klavnici (359 vzorcev), in v serumskih vzorcih prašičev, odvzetih v okviru letnega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014 (351 vzorcev). Testa po navodilih proizvajalcev zagotavljata hitro, enostavno in specifično dokazovanje protiteles proti HEV v serumskih vzorcih prašičev.

3.2.1.1 Izvedba ELISA ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet)

Test ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet) je encimskoimunski test, pri katerem se vzorce nanaša v jamice v dvojniku. V sodih jamicah je na mikrotitersko ploščo vezan rekombinantni antigen kapside genotipa 3 HEV, lihe jamice so prazne. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca.

V vse jamice mikrotiterske plošče smo odpipetirali po 190 µl dilucijskega pufru 2. Nato smo v jamice A1, A2, B1, B2 dodali 10 µl negativne kontrole, v jamice C1, C2, D1, D2 pa 10 µl pozitivne kontrole. V preostale jamice smo odpipetirali po 10 µl preiskovanih vzorcev v dvojnikih, skladno z v naprej pripravljenim protokolom ELISA. Mikroploščo smo inkubirali 45 min ± 4 min na temperaturi 21 °C. Iz jamic smo odstranili vsebino in jih spirali z raztopino za spiranje (300 µl, spiranje smo trikrat ponovili). V vsako jamico smo nato dodali po 100 µl konjugata. Inkubirali smo 30 min ± 3 min na temperaturi 21 °C. Iz jamic smo odstranili vsebino, jamice sprali z raztopino za spiranje (300 µl, spiranje smo trikrat ponovili). Dodali smo 100 µl substrata v vsako jamico. Inkubirali smo 15 min ± 2 min na temperaturi 21 °C v temi. V vsako jamico smo dodali 100 µl stop raztopine. Rezultate OD (ang. *optical density*) smo odčitali z ELISA čitalcem mikrotiterskih plošč (Tecan Sunrise ST, serijska številka 704000044; Švica) pri valovni dolžini 450 nm.

Rezultate smo ovrednotili na podlagi enačb za izračun Net OD in S/P (sample/positive control), ki so priložene navodilom proizvajalca in v katere vstavimo odčitane OD vrednosti za posamezni vzorec ali kontrolo:

$$\text{Net OD} = \text{OD sode jamice} - \text{OD lihe jamice}$$

$$\text{S/P} = \left(\frac{\text{net OD vzorca}}{\text{net OD pozitivne kontrole}} \right) \times 100$$

Interpretacijo rezultatov za vzorce smo izvedli po naslednjem kriteriju:

- $\text{S/P} \leq 60\%$... rezultat preiskave je negativen na prisotnost protiteles proti HEV;
- $60\% < \text{S/P} < 70\%$... rezultat preiskave je neopredeljiv na prisotnost protiteles proti HEV;
- $\text{S/P} \geq 70\%$... rezultat preiskave je pozitiven na prisotnost protiteles proti HEV.

3.2.1.2 Izvedba testa HEV-IgG ELISA porcine (Axiom)

Test HEV IgG ELISA porcine (Axiom) je encimskoimunski test za dokazovanje specifičnih IgG proti HEV. Na mikrotiterski plošči je vezan rekombinantni antigen regije ORF 2 genotipa 1 HEV. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Tri jamice na mikrotiterski plošči smo uporabljali za negativno kontrolo, dve za pozitivno kontrolo, ena jamica nam je služila kot slepa kontrola (ang. *blank*). V vsako jamico, razen v jamico za slepo kontrolo, smo dodali 100 μl diluenta. Nato smo v ustrezne jamice v skladu s protokolom ELISA nanesti po 10 μl pozitivne kontrole, 10 μl negativne kontrole in po 10 μl vzorca in premešali. Inkubirali smo 30 min na temperaturi 37 °C. Mikroploščo smo sprali z raztopino za spiranje (500 μl , spiranje smo petkrat ponovili) in jo osušili. Dodali smo po 100 μl HRP-konjugata. Inkubirali smo 30 min na temperaturi 37 °C in po inkubaciji ponovili spiranje (500 μl , spiranje smo petkrat ponovili). V vse jamice smo dodali po 50 μl kromogena A in 50 μl kromogena B. Inkubirali smo v temi na temperaturi 37 °C 15 min. V vsako jamico smo dodali po 50 μl stop raztopine in rezultate odčitali z ELISA čitalcem mikrotiterskih plošč (Tecan Sunrise ST, serijska številka 704000044; Švica) pri valovni dolžini 450 nm.

Rezultate smo ovrednotili na podlagi enačb, ki so priložene navodilom proizvajalca, v katere smo vstavili dobljene OD vrednosti.

$$\text{»Cut-off«} = \text{OD negativne kontrole} + 0,16$$

Interpretacijo rezultatov smo izvedli po naslednjem kriteriju:

- $\frac{\text{OD vzorca}}{\text{cut-off}} < 1$... rezultat preiskave je negativen na prisotnost protiteles proti HEV;
- $\frac{\text{OD vzorca}}{\text{cut-off}} \geq 1$... rezultat preiskave je pozitiven na prisotnost protiteles proti HEV;
- $\frac{\text{OD vzorca}}{\text{cut-off}} = 0,9 - 1,1$... rezultat preiskave je neopredeljiv na prisotnost protiteles proti HEV.

3.2.2 Metoda imunoblot (IB)

Serumske vzorce, pri katerih se rezultati obeh encimskoimunskih testov niso ujemali, smo testirali s potrditvenim testom recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen diagnostik, Neuried, Nemčija), ki omogoča določanje specifičnih IgG ali IgM proti HEV. Ker je bil ta test razvit za določanje protiteles v humanem serumu ali plazmi, smo ga modificirali, da je ustrezal preiskavi dokazovanja protiteles proti HEV v prašičjih serumih.

Na nitrocelulozno membrano so fiksirani naslednji prečiščeni rekombinantni antigeni HEV:

- O2N (genotip 1, genotip 3),
- O2M (genotip 1),
- O2C (genotip 1, genotip 3),
- O3 (genotip 1, genotip 3).

Testne lističe inkubiramo v serumu, specifična protitelesa v vzorcu se (če so prisotna) vežejo na antigene, vezane na lističih.

3.2.2.1 Izvedba modificiranega testa recomLine HEV IgG/IgM

Testne lističe smo položili v kadičko za izvajanje testa imunoblot, v vsako jamico odpipetirali 2 ml dilucijskega pufra. Na vsak testni listič smo odpipetirali 20 μ l seruma. Inkubirali smo eno uro na sobni temperaturi na stresalniku. Vsebinsko smo odlili iz kadičke in v vsako jamico odpipetirali 2 ml pufra A za spiranje (priložen testu), pustili 5 min in odlili. Spiranje smo ponovili dvakrat. Pripravili smo 2 % blokirno raztopino mleka v prahu brez maščob v PBS tako, da smo odtehtali 2 g mleka v prahu in dodali 100 ml PBS (pH 7,2). Na magnetnem

mešalniku smo mešali, dokler se mleko ni popolnoma raztopilo. V modifikaciji testa smo namesto anti-humanega IgG/IgM konjugata, ki je reagent v testu, uporabili Protein A peroksidazni konjugat (protein A peroksidaza; kat. št. 110MH029; Sigma-Aldrich, ZDA) in pripadajoči substrat za obarvanje reakcije. Pripravili smo delovno raztopino konjugata v razmerju 1 : 250 v blokirni raztopini (3984 µl blokirne raztopine smo dodali 16 µl Protein A-peroksidaznega konjugata), ki smo jo nanegli po 2 ml na posamezni strip. Inkubirali smo 45 min v inkubatorju pri temperaturi 37 °C na stresalniku. Izvedli smo spiranje z blokirno raztopino in ga ponovili petkrat. Substrat smo pripravili tako, da smo tabletko (30 mg) 4-Cloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich, ZDA) raztopili v 10 ml metanola. Počakali smo, da se tabletko popolnoma raztopi. V čisto steklenico smo odpipetirali 10 ml PBS (pH 7,2–7,4) in med mešanjem v PBS počasi (po kapljicah) dodajali 2 ml raztopine substrata. Tik pred nanosom substrata na lističe smo dodali 4 µl 30 % H₂O₂ in dobro premešali. Na posamezni listič smo nanegli 2 ml substrata in na stresalniku inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Po določenem času so se pri pozitivnih vzorcih na testnih lističih pojavile temno obarvane proge. Reakcijo smo ustavili tako, da smo iz lističev odpipetirali substrat in jih sprali s 5 ml deionizirane vode.

Rezultate smo odčitali glede na obarvanost prog na lističu, vsaka proga je prinesla določeno število točk, na podlagi njihovega seštevek pa smo interpretirali rezultate preiskovanih serumov kot negativne, pozitivne ali neopredeljive.

Točkovanje:

- O2N
 - Genotip 1 ...1 točka
 - Genotip 3 ...1 točka
- O2M ...1 točka
- O2C
 - Genotip 1 ...4 točke
 - Genotip 3 ...4 točke
- O3
 - Genotip 1...2 točki
 - Genotip 3 ...2 točki

Interpretacijo rezultatov smo izvedli po naslednjem kriteriju:

- število točk ≤ 2 ... rezultat preiskave je negativen na protitelesa proti HEV;
- število točk 3 ... rezultat preiskave je neopredeljiv na protitelesa proti HEV;
- število točk ≥ 4 ... rezultat preiskave je pozitiven na protitelesa proti HEV.

3.2.3 Dokazovanje HEV z molekularnimi metodami

3.2.3.1 Priprava vzorcev

Vzorci blata, jeter, mletega mesa in pečenic smo pred izolacijo virusne RNA homogenizirali. Aseptično smo odvzeli 1 g vzorca ter mu dodali 9 ml RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK). Za pripravo 10% suspenzije smo vzorec in hranilni medij homogenizirali v peristaltičnem mešalniku (MiniMix 100 ml Lab Blender, Interscience, Francija), centrifugirali 15 min pri 2500 g in supernatant odpipetirali v sterilno vialo. Suspenzijo smo shranili v zmrzovalniku na -70 °C do začetka izolacije nukleinske kisline.

V laboratoriju smo posamezni vzorec brisa površin v transportnem mediju dobro zmešali na mešalniku Vortex, nato pa tekočino odpipetirali v sterilno vialo in vzorce shranili na -70 °C do začetka izolacije nukleinske kisline.

Vzorci žolča nismo predhodno obdelovali, ker so v tekočem stanju.

V laboratoriju smo po deset vzorcev blata, jeter in žolča združevali v skupni vzorec, ter jih v nadaljevanju vnovič testirali individualno v primeru pozitivnega rezultata skupnega vzorca.

3.2.3.2 Izolacija virusne RNA iz vzorcev blata, jeter, žolča, mletega mesa, pečenic in brisov

Za izolacijo virusne RNA smo uporabili komercialni komplet za izolacijo QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Izolacijo smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Za vsak analizirani vzorec smo v 1,5-mililitrski epruvetki odpipetirali 560 μ l pufru AVL s »carrier RNA«. Dodali smo 140 μ l preiskovanega vzorca (blata/jeter/žolča/mletega mesa/pečenic/brisa) in 15 sekund mešali na mešalniku Vortex. Vzorce smo inkubirali 10 min na sobni temperaturi (18–25 °C) in nato kratko centrifugirali, da smo odstranili tekočino s pokrovčka epruvetke. V epruvetko smo dodali 560 μ l etanola (96%) in 15 sekund mešali na mešalniku Vortex. Ponovili smo kratko centrifugiranje, da smo odstranili tekočino s

pokrovčka, in nato prenesli 630 µl raztopine na kolonice QIAamp® Mini (Qiagen, Hilden, Nemčija), vstavljene v dvomililitrske zbirne epruvetke, ter jih centrifugirali na 6000 g eno minuto (centrifuga MIKRO 120 Hettica; tip 1204 D-78532; Tuttlingen, Germany). Kolonice smo vstavili v nove dvomililitrske zbirne epruvetke in zavrgli zbirne epruvetke s filtratom. Previdno smo odprli pokrov kolonice in ponovili celoten prejšnji korak. Po centrifugiranju smo kolonice vstavili v nove dvomililitrske zbirne epruvetke, dodali 500 µl puфра AW1 in zavrgli prejšnje zbirne epruvetke s filtratom. Centrifugirali smo na 6000 g eno minuto. Po centrifugiranju smo kolonice vstavili v nove zbirne epruvetke in zavrgli prejšnje s filtratom. Previdno smo odprli kolonico, dodali 500 µl puфра AW2 in centrifugirali na 20000 g tri minute ter jih vstavili v čiste 1,5-mililitrske epruvetke, pri čemer smo zavrgli prejšnje zbirne epruvetke s filtratom. V kolonico smo dodali 60 µl puфра AVE in inkubirali eno minuto na sobni temperaturi, potem centrifugirali eno minuto na 6000 g in na koncu zbirno epruvetko s filtratom, v kateri se je nahajala izolirana RNA, shranili na -70 °C.

V vsak postopek izolacije RNA smo vključili tudi znano negativno in pozitivno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili suspenzijo blata prašiča, pozitivnega na HEV, ki smo mu s sekvenciranjem predhodno določili nukleotidno zaporedje. Za negativno kontrolo smo uporabili suspenzijo blata prašiča, negativnega na HEV. Na ta način smo vsakič preverjali uspešnost postopka in morebitno kontaminacijo tekom samega postopka izolacije.

3.2.3.3 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Klasično metodo RT-PCR smo uporabili za pomnoževanje dveh odsekov virusnega genoma HEV, ki smo jima nato določili nukleotidno zaporedje. Pomnoževali smo 418 nukleotidov dolg odsek na regiji ORF 1 in 348 nukleotidov dolg odsek na regiji ORF 2. Uporabili smo pare oligonukleotidnih začetnikov opisanih v priznanih znanstvenih objavah in komplet reagentov One-Step RT-PCR (Qiagen, Hilden, Nemčija). Pomnoževanje produktov PCR smo izvedli na termopomnoževalniku T1 (Biometra, ZDA).

3.2.3.3.1 Pomnoževanje odseka na regiji ORF 1

Odsek na regiji ORF 1 smo pomnoževali s parom začetih nukleotidov HEVConsORF 1-a1 in HEVConsORF 1-s1 (Schlauder in sod., 1999) (Tabela 3).

Pomnoževanje odseka ORF1 smo izvedli s kompletom reagentov One-Step RT-PCR (Qiagen, Nemčija) s končnim volumnom 25 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 14 μ l H₂O, prosta nukleaz,
- 5 μ l 5x PCR pufra,
- 1 μ l dNTP miksa (ki je vseboval 10 nM vsakega dNTP),
- 1 μ l oligonukleotidnega začetnika HEV ORF1-a1 s koncentracijo 20 μ M,
- 1 μ l oligonukleotidnega začetnika HEV ORF1-s1 s koncentracijo 20 μ M,
- 1 μ l RT-PCR Enzyme mix in
- 2 μ l RNA vzorca ali kontrole.

Program PCR je vseboval naslednje stopnje:

- reverzna transkripcija pri 50 °C 30 min,
- PCR aktivacija pri 94 °C 15 min,
- sledilo je 40 ciklov:
 - denaturacija 94 °C 30s,
 - prileganje oligonukleotidnih začetnikov 55 °C 30 s,
 - podaljševanje verige DNA 72 °C 1 min,
- zadnjemu ciklu je sledilo končno podaljševanje pri 72 °C 10 min,
- ohlajanje pri 4 °C.

3.2.3.3.2 Pomnoževanje odseka v regiji ORF 2

Odsek v regiji ORF 2 smo pomnoževali s parom oligonukleotidnih začetnikov HEV ORF 2 3156N-F in HEV ORF 2 3157N-R ter s parom notranjih oligonukleotidnih začetnikov HEV ORF 2 3158N-F in HEV ORF 2 3159N-R (Huang in sod., 2002) (Tabela 3).

Tabela 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov regij ORF 1 in ORF 2 in velikost pomnoženega produkta.

Table 3: Nucleotide sequence for amplification of ORF1 and ORF 2 and amplicon size.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5'–3'	Velikost produkta
HEV ORF1-a1	CCA TCR ARR CAG TAA GTG CGG TC	418 nt
HEV ORF1-s1	CTG GCA TYA CTA CTG CYA TTG AGC	418 nt
3156N	AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)GTTG	348 bp
3157N	CCCTTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC	348 bp
3158N	GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT	348 bp
3159N	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	348 bp

Za pomnoževanje specifičnih odsekov ORF 2 smo v PCR uporabili komplet reagentov One-Step RT-PCR (Qiagen, Nemčija), reakcijska mešanica s končnim volumnom 25 μ l pa je vsebovala:

- 14 μ l H₂O, prosta nukleaz,
- 5 μ l 5x PCR pufra,
- 1 μ l dNTP miksa (ki je vseboval 10 nM vsakega dNTP),
- 1 μ l vsakega oligonukleotidnega začetnika s koncentracijo 20 μ M,
- 1 μ l RT-PCR Enzyme mix,
- 2 μ l RNA vzorca ali kontrole.

Program PCR je vseboval naslednje stopnje:

- reverzna transkripcija pri 50 °C 30 min,
- PCR aktivacija pri 94 °C 15 min,
- sledilo je 40 ciklov:
 - denaturacija 94 °C 60 s,
 - prileganje oligonukleotidnih začetnikov 55 °C 60 s,
 - podaljševanje verige DNA 72 °C 60 s,
- zadnjemu ciklu je sledilo končno podaljševanje pri 72 °C 10 min in
- ohlajanje pri 4 °C.

Pri prvem PCR smo najprej uporabili oligonukleotidne začetnike HEV ORF 2 3156N-F in HEV ORF 2 3157N-R. Zaradi pojava nespecifičnih produktov PCR smo pri drugem PCR uporabili notranje začetne oligonukleotide, ki so namenjeni izboljšanju občutljivosti in specifičnosti PCR reakcije (HEV ORF 2 3158N-F in HEV ORF 2 3159N-R), in v mešanico dodali PCR produkt pomnoženega prvega PCR. Na ta način smo dobili specifičen produkt. Pri nadaljnjih protokolih za analizo preostalih vzorcev smo uporabljali samo notranje začetne oligonukleotide, pri čemer smo v reakcijsko mešanico dodajali RNA preiskovanih vzorcev.

3.2.3.4 Analiza produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Velikost pomnoženih produktov regij ORF 1 in ORF 2 smo določali z gelsko elektroforezo v 1,8% agaroznem gelu. Po obarvanju z etidijevim bromidom smo pod UV-svetlobo na podlagi primerjave specifične velikosti produkta, s standardom velikosti 100-bp, vzorce opredelili kot pozitivne ali negativne. Če smo poleg specifičnih produktov dobili še produkte drugih velikosti glede na število bp, smo produkte specifične velikosti izrezali iz gela in jih očistili.

3.2.3.4.1 Čiščenje produktov PCR

PCR produkte smo čistili s pomočjo kompleta QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Iz agaroznega gela smo s sterilnim skalpelom izrezali fragment gela z DNA produktom določene velikosti. Izrezan fragment gela smo stehali in v 1,5-mililitrsko epruvetko dodali pufer QG v trikratni masi izrezanega fragmenta gela (masa:volumen = 1:1) ter inkubirali na temperaturi 50 °C 10 min, oziroma dokler se gel ni raztopil. Raztopini smo dodali izopropanol v količini, ki je enaka masi gela. QIAquick spin kolono smo vstavili v 2-mililitrsko epruvetko, v spin kolono nanесли vzorec iz izrezanega fragmenta in centrifugirali 1 min. V spin kolono smo nato dodali 500 µl pufera QG in centrifugirali 1 min. Sprali smo z dodajanjem 750 µl pufera PE. Po 5 min smo spin kolono centrifugirali, jo prestavili v čisto 1,5-mililitrsko epruvetko in DNA eluirali s 30 µl pufera EB. Prečiščeno DNA vzorca smo ponovno nanесли na agarozni gel in tako preverili uspešnost čiščenja produkta.

3.2.3.5 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij

Določanje nukleotidnega zaporedja smo v obeh smereh izvedli v regijah ORF 1 in ORF 2 iz PCR produktov z istimi oligonukleotidnimi začetniki, ki smo jih uporabili za PCR. Z računalniškimi programi paketa LaserGene (DnaStar, ZDA) smo s programoma Seqman in Editseq uredili dobljena nukleotidna zaporedja. Urejena delna nukleotidna zaporedja smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji sevov HEV, ki so dostopni v podatkovni zbirki

GenBank, ki jo ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije iz ZDA. Uporabili smo program BLAST.

Za analizo nukleotidnih zaporedij smo prav tako uporabili programe paketa LaserGene (DnaStar, ZDA). V analizo nukleotidnih zaporedij naših slovenskih sevov smo vključili tudi referenčne seve HEV, ki smo jih pridobili iz genske banke. Urejena nukleotidna zaporedja sevov naših vzorcev in sevov, pridobljenih iz genske banke, smo analizirali s programi iz programskega paketa MEGA 6.06 (prosto dostopen na medmrežju na naslovu <https://www.megasoftware.net/>).

3.2.3.6 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času

Metodo RT-PCR v realnem času smo uporabili za pomnoževanje kratkega odseka genoma HEV, pozitivnim vzorcem pa smo v nadaljevanju določali nukleotidno zaporedje v ORF 1 in ORF 2. Uporabili smo že objavljen protokol metode RT-PCR v realnem času, ki omogoča dokazovanje nukleinske kisline HEV iz genotipov 1, 2, 3 in 4 (Jothikumar in sod., 2006) v regiji ORF 3 z začetnima oligonukleotidoma JVHEV-F in JVHEV-R in sondo JVHEV (Tabela 4). Za kontrolo inhibicije PCR reakcij smo uporabili oligonukleotidne začetnike β act intronic in β act reverse ter sondo β -aktina (Tabela 4). Oligonukleotidi in sonde za zaznavanje izražanja gena β -aktina so bili načrtovani na podlagi mRNA zaporedja gena β -aktina ovce, netopirja, krave, budre, konja, človeka, miši in podgane (Wakeley in sod., 2005).

Tabela 4: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in sond.

Table 4: Oligonucleotide and probe sequences.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'
JVHEV-F	GGTGGTTTCTGGGGTGAC
JVHEV-R	AGGGGTTGGTTGGATGAA
JVHEV-P	TGATTCTCAGCCCTTCGC
β act intronic	CGATGAAGATCAAG/ATCATTGC
β act reverse	AAGCATTTGCGGTGGAC
β-Actin	TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAG

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 μ l je vsebovala:

- 1,5 μ l H₂O, prosta nukleaz,
- 10 μ l 2x reakcijske mešanice z ROX (Superscript III Platinum One Step RT-PCR z ROX, Invitrogen, ZDA),
- 0,5 μ l 50 mM MgSO₄,
- 1 μ l začetnega oligonukleotida 1 (JVHEV-F), 20 pmol/ μ l,
- 1 μ l začetnega oligonukleotida 2 (JVHEV-R), 20 pmol/ μ l,
- 0,5 μ l sonde (JVHEVP), 5 pmol/ μ l,
- 0,5 μ l začetnega oligonukleotida (beta act intronic), 20 pmol/ μ l,
- 0,5 μ l začetnega oligonukleotida (beta act reverse), 20 pmol/ μ l,
- 0,5 μ l sonde (beta actin), 5 pmol/ μ l,
- 0,5 μ l RT-qPCR mix (Superscript III Platinum One Step RT-PCR z ROX, Invitrogen, ZDA),
- 5 μ l RNA vzorca ali kontrole.

Program za pomnoževanje je vseboval naslednje stopnje:

- reverzna transkripcija 30 min pri 50 °C,
- denaturacija 15 min pri 95 °C,
- 50 ciklov:
 - 10 s pri 95 °C,
 - 20 s pri 55 °C,
 - 15 s pri 72 °C.

Pri vsaki izvedbi metode smo uporabili RNA pozitivne in negativne kontrole, ki smo jo izolirali v predhodnem postopku izolacije RNA. Vzorce smo interpretirali kot pozitivne, če smo dobili vrednost Ct, nižjo od 40, in negativne, če smo dobili vrednost Ct, višjo od 40. Mejo smo postavili na podlagi predhodnih validacij, ki so jih opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.2.4 Statistične metode

Podatke o vzorcih in rezultate diagnostičnih testov smo zbirali in urejali v programu Microsoft Excel 365. S tem programom smo pripravili tudi osnovno opisno statistiko in grafe ter del izračunov primerjav diagnostičnih testov, za drugi del pa smo uporabili program R 4.1.2 (R Core Team, 2021).

Povezavo med rezultati encimskoimunskih testov Axiom in IDvet iz rednega monitoringa in iz vzorcev iz klavnice smo ugotavljali s Fisherjevim eksaktnim testom. Pri tem smo za statistično značilnost uporabili mejno vrednost p , nižjo od 0,05. Ujemanje rezultatov med tema dvema diagnostičnima testoma smo preverili tudi z izračunom koeficienta kappa po Cohenu.

$$\text{Koeficient kappa} = \frac{\text{ujemanje med testoma} - \text{naključno ujemanje}}{\text{število vzorcev} - \text{naključno ujemanje}}$$

Interpretacija vrednosti koeficienta kappa je naslednja: $\leq 0,20$ - slabo ujemanje; 0,21–0,40 - rahlo ujemanje; 0,41–0,50 - zmerno ujemanje; 0,51–0,60 - sprejemljivo ujemanje; 0,61–0,80 - dobro ujemanje; 0,81–1 - odlično ujemanje.

Na podlagi rezultatov encimskoimunskih testov in imunoblot metode smo za testa proizvajalcev Axiom in IDvet izračunali občutljivost in specifičnost ter pozitivno in negativno napovedno vrednost po naslednjih enačbah:

$$\text{Diagnostična občutljivost} = \frac{\text{pravilno pozitivni}}{\text{pravilno pozitivni} + \text{lažno negativni}}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost} = \frac{\text{pravilno negativni}}{\text{pravilno negativni} + \text{lažno pozitivni}}$$

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{\text{pravilno pozitivni}}{\text{pravilno pozitivni} + \text{lažno pozitivni}}$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{\text{pravilno negativni}}{\text{pravilno negativni} + \text{lažno negativni}}$$

4 REZULTATI

4.1 Dokaz prisotnosti protiteles proti HEV

Z dvema komercialnima encimskoimunskima testoma (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom) smo pregledali vzorce krvi domačih prašičev na prisotnost specifičnih IgG proti HEV. Testirali smo 710 serumskih vzorcev, od tega 351 vzorcev naključno izbranih iz vzorcev, ki so bili odvzeti na celotnem območju Slovenije v okviru letnega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014 in 359 vzorcev odvzetih ob zakolu prašičev v klavnicah.

4.1.1 Naključno izbrani serumski vzorci domačih prašičev s celotnega območja Slovenije (monitoring)

Z encimskoimunskim testom proizvajalca IDvet smo pregledali 351 naključno izbranih serumskih vzorcev s celotnega območja Slovenije in ugotovili 153 (43,60 %) pozitivnih, 192 (54,70 %) negativnih in 6 (1,71 %) neopredeljivih serumskih vzorcev na prisotnost specifičnih IgG proti HEV.

Z drugim imunskoencimskim testom (proizvajalca Axiom), smo pregledali 351 naključno izbranih serumskih vzorcev s celotnega območja Slovenije in ugotovili 97 (27,64 %) pozitivnih, 232 (66,10 %) negativnih in 22 (6,27 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost specifičnih IgG proti HEV (Tabela 5).

Tabela 5: Rezultati opravljenih seroloških preiskav s testom ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom pri 351 naključno izbranih vzorcih iz monitoringa kužnih bolezni prašičev.

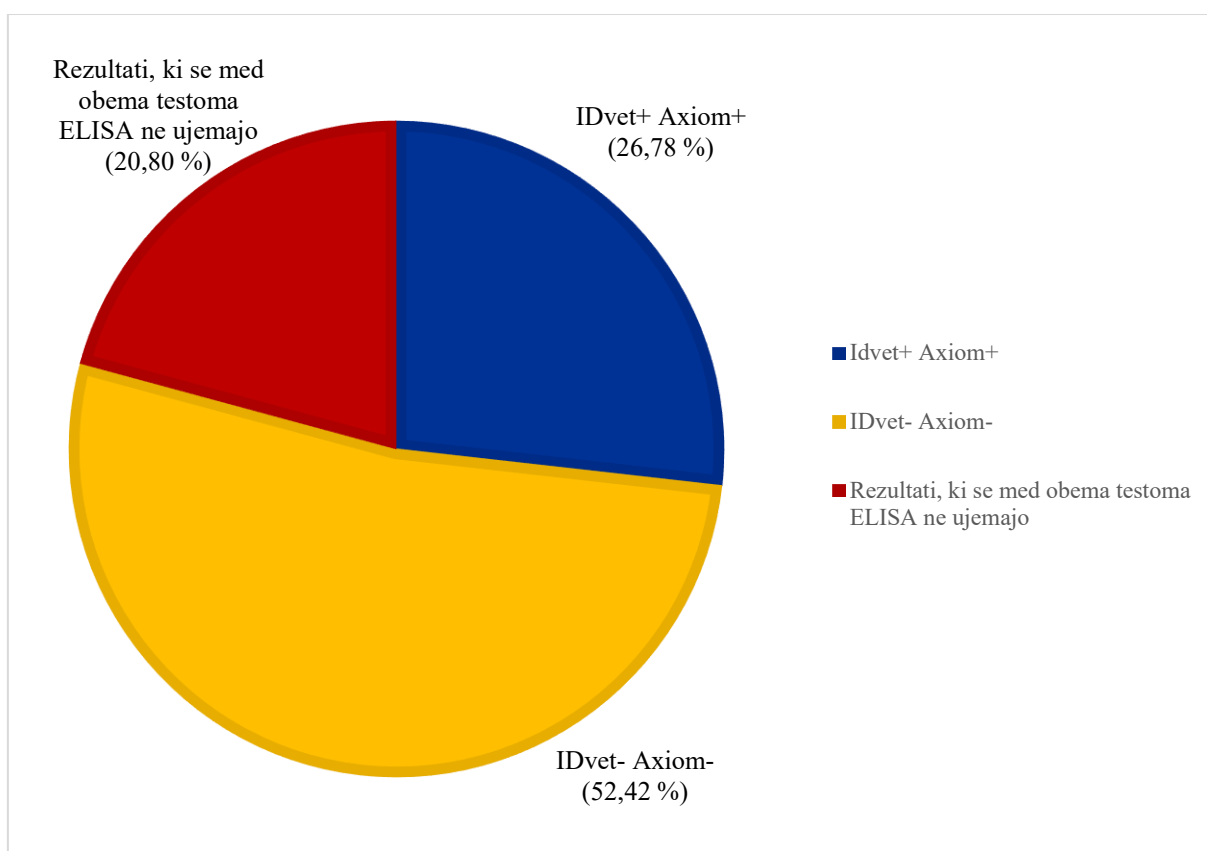
Table 5: Test results from both ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species IDvet in HEV-IgG ELISA porcine Axiom) for 351 randomly chosen samples from monitoring of infectious pig diseases.

ELISA	Pozitiven	Negativen	Neopredeljiv
IDvet	153 (43,60 %)	192 (54,70 %)	6 (1,71 %)
Axiom	97 (27,64 %)	232 (66,10 %)	22 (6,27 %)

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

Primerjava rezultatov obeh encimskoimunskih testov je pokazala 94 (26,78 %) serumskih vzorcev pozitivnih v obeh testih, 184 (52,42 %) vzorcev negativnih v obeh testih ter 73 (20,80 %) serumskih vzorcev pri katerih se rezultati testov ne ujemajo (Slika 11, Tabela 6). Od teh 73 vzorcev je imelo 42 (57,5 %) vzorcev pozitiven rezultat s testom proizvajalca IDvet in negativen rezultat s testom proizvajalca Axiom. Fisherjev eksaktni test je pokazal, da so rezultati obeh encimskoimunskih testov statistično značilno povezani ($p < 0,0001$). Vrednost koeficienta kappa 0,60 pove, da je ujemanje med testoma z diagnostičnega gledišča sprejemljivo.



Slika 11: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz monitoringa kužnih boleznih prašičev).

Figure 11: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from monitoring of infectious pig diseases).

Tabela 6: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (serumski vzorci iz monitoringa kužnih bolezni prašičev).

Table 6: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (sera samples from monitoring of infectious pig diseases).

IDvet	Axiom		
	Pozitiven	Negativen	Neopredeljiv
Pozitiven	94	42	17
Negativen	3	184	5
Neopredeljiv	0	6	0

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

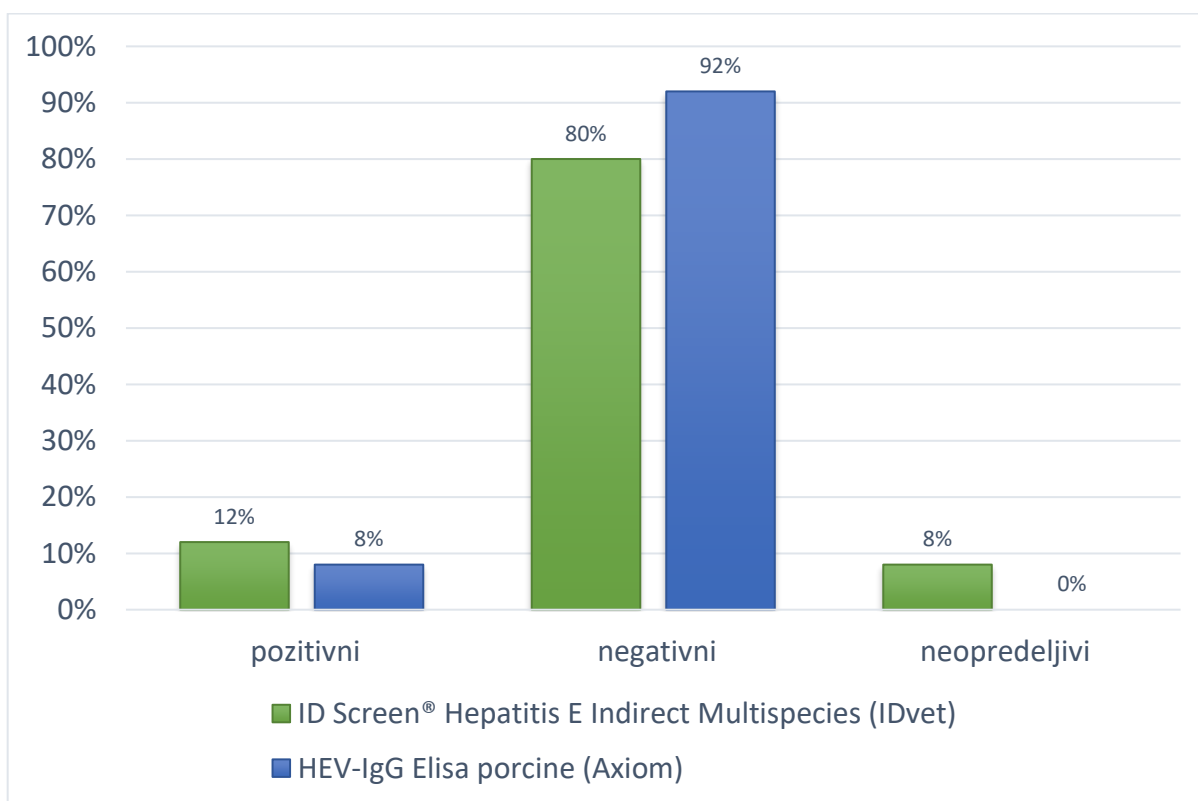
Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

4.1.1.1 Analiza rezultatov po starostnih skupinah prašičev (monitoring)

Od 351 obravnavanih vzorcev prašičev, pri 63 vzorcih nismo mogli pridobiti podatka o starosti živali, zato jih v ta del analize nismo vključili. Med ostalimi 288 vzorci, je bilo 25 živali mlajših od šest mesecev (Slika 12), 74 živali je bilo starih od šest do dvanajst mesecev (Slika 13) in 189 živali je bilo starih dvanajst mesecev ali več (Slika 14).

S testom proizvajalca IDvet smo med 25 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine do šest mesecev dokazali 3 (12,00 %) pozitivne, 20 (80,00 %) negativnih in 2 (8,00 %) neopredeljiva vzorca na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 12).

S testom proizvajalca Axiom smo med 25 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine do šest mesecev dokazali 2 (8,00 %) pozitivna in 23 (92,00 %) negativnih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 12).

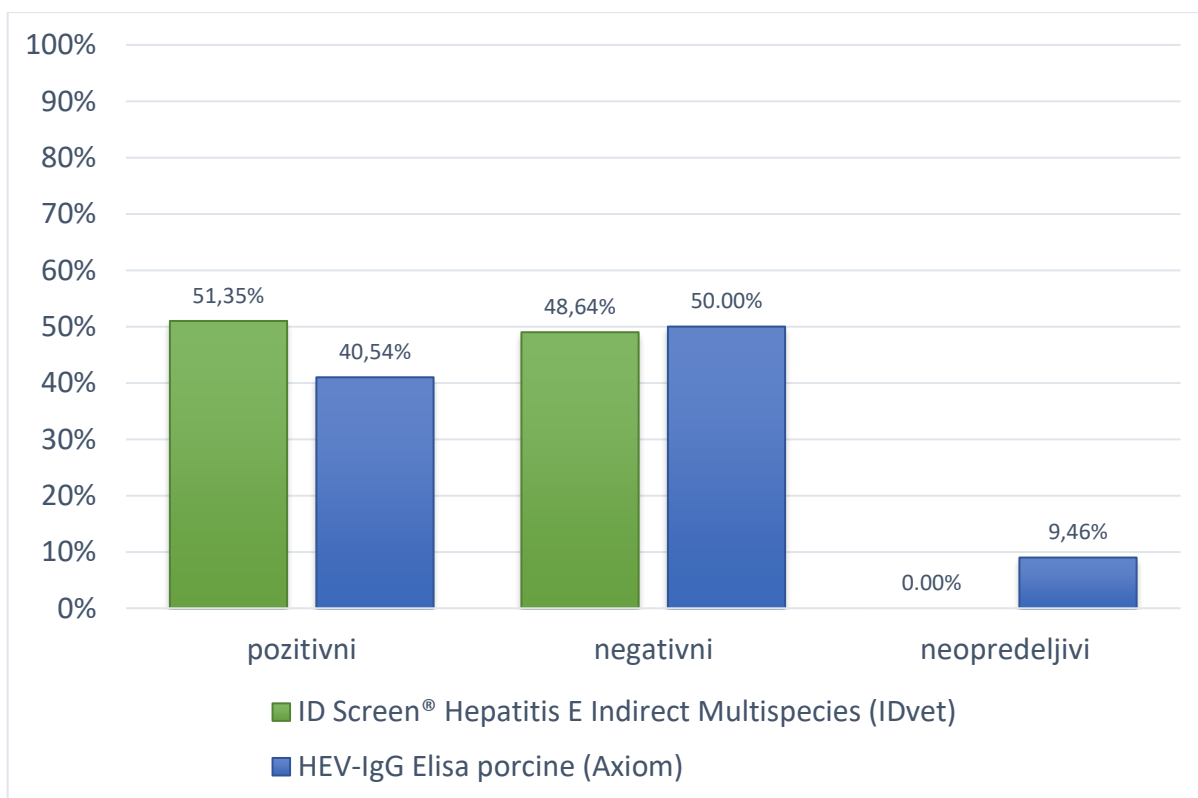


Slika 12: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih do šest mesecev, skupno pregledanih 25 živali.

Figure 12: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs up to 6 months old, altogether 25 animals tested.

S testom proizvajalca IDvet smo med 74 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine od šest do dvanajst mesecev dokazali 38 (51,35 %) pozitivnih in 36 (48,64 %) negativnih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 13).

S testom proizvajalca Axiom smo med 74 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine od šest do dvanajst mesecev dokazali 30 (40,54 %) pozitivnih, 37 (50,00 %) negativnih in 7 (9,46 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost protiteles proti HEV (Slika 13).

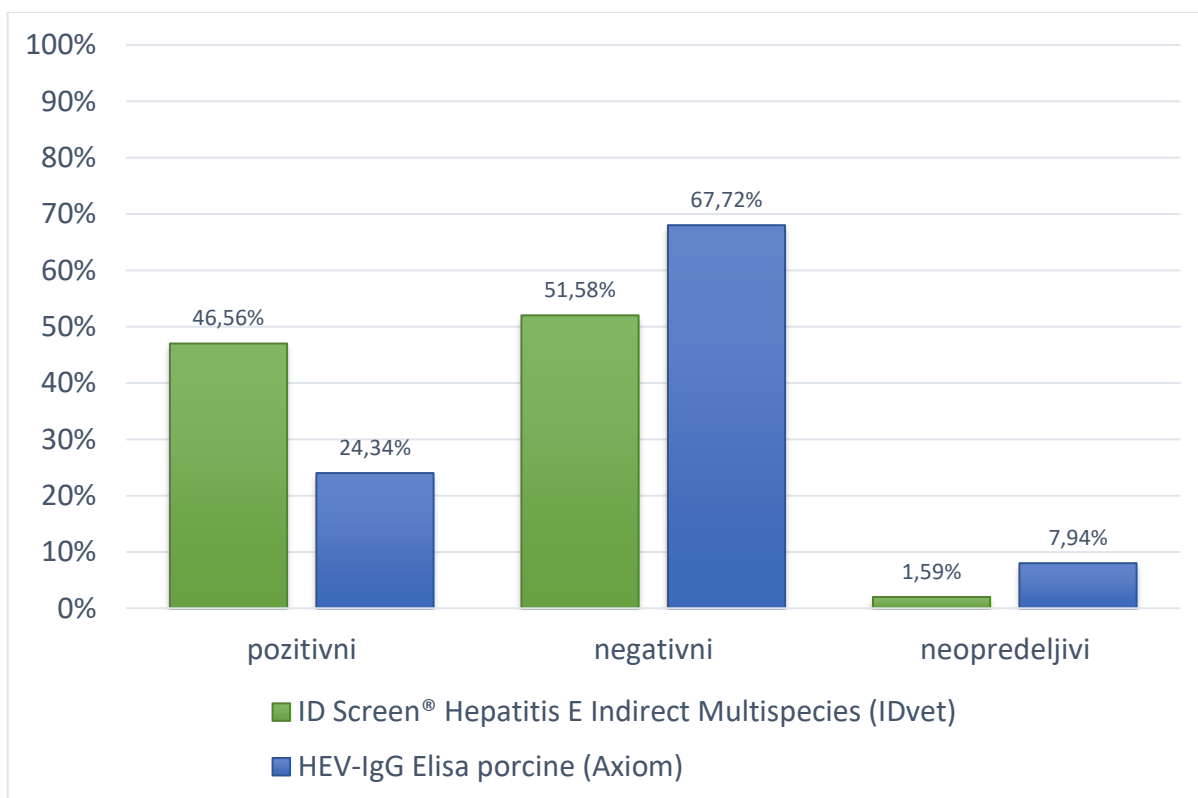


Slika 13: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih od šest do dvanajst mesecev, skupno pregledanih 74 živali.

Figure 13: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs from 6 to 12 months old, altogether 74 animals tested.

S testom proizvajalca IDvet smo med 189 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine nad dvanajst mesecev dokazali 88 (46,56 %) pozitivnih, 98 (51,85 %) negativnih in 3 (1,59 %) neopredeljive vzorce na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 14).

S testom proizvajalca Axiom smo med 189 pregledanimi serumskimi vzorci starostne skupine nad dvanajst mesecev dokazali 46 (24,34 %) pozitivnih, 128 (67,72 %) negativnih in 15 (7,94 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 14).



Slika 14: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih starih nad dvanajst mesecev, skupno pregledanih 189 živali.

Figure 14: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs older than 12 months, altogether 189 animals tested.

4.1.2 Serumski vzorci odvzeti pri prašičih ob zakolu v klavnici

Prisotnost specifičnih protiteles proti HEV smo z obema encimskoimunskima testoma določali tudi v odvzetih serumskih vzorcih prašičev ob zakolu v klavnicah. Pregledali smo 271 vzorcev, od tega 66 odojkov, 165 pitancev in 40 plemenskih svinj.

Z encimskoimunskim testom proizvajalca IDvet smo pregledali 271 vzorcev, odvzetih pri prašičih ob zakolu, in ugotovili 133 (49,08 %) pozitivnih, 119 (43,91 %) negativnih in 19 (7,01 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost protiteles proti HEV (Tabela 7).

Z encimskoimunskim testom proizvajalca Axiom smo pregledali 271 vzorcev, odvzetih pri prašičih ob zakolu, in ugotovili 144 (53,14 %) pozitivnih, 115 (42,44 %) negativnih in 12 (4,43 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost protiteles proti HEV (Tabela 7).

Tabela 7: Rezultati opravljenih seroloških preiskav s testoma ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom pri 271 vzorcih iz klavnice.

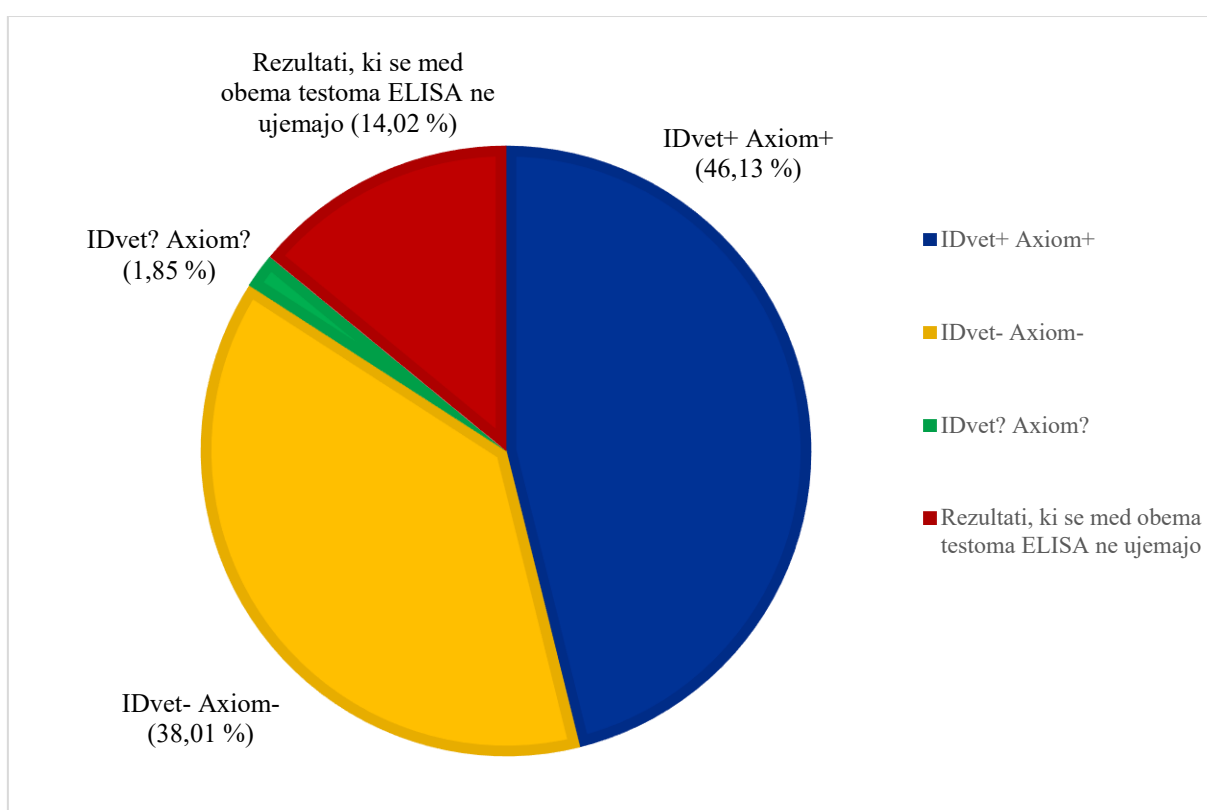
Table 7: Test results from both ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species IDvet in HEV-IgG ELISA porcine Axiom) for 271 samples collected at slaughter.

ELISA	Pozitiven	Negativen	Neopredeljiv
IDvet	133 (49,08 %)	119 (43,91 %)	19 (7,01 %)
Axiom	144 (53,14 %)	115 (42,44 %)	12 (4,43 %)

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

Primerjava rezultatov obeh encimskoimunskih testov je pokazala 125 (46,13 %) serumskih vzorcev pozitivnih v obeh testih, 103 (38,01 %) serumske vzorce negativne v obeh testih, 5 (1,85 %) serumskih vzorcev neopredeljivih v obeh testih in 38 (14,02 %) serumskih vzorcev pri katerih se rezultati obeh encimskoimunskih testov ne ujemajo (Slika 15, Tabela 8). Od teh 38 vzorcev je imelo 12 (31,58 %) vzorcev negativen rezultat s testom proizvajalca IDvet in pozitiven s testom proizvajalca Axiom. Fisherjev eksaktni test je pokazal, da so rezultati obeh testov statistično značilno povezani ($p < 0,0001$). Vrednost koeficienta kappa je 0,75, kar pove, da je ujemanje med testoma z diagnostičnega gledišča dobro.



Slika 15: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma) in neopredeljivih rezultatov (neopredeljivi z obema encimskoimunskima testoma) ter rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz klavnice).

Figure 15: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA), doubtful results (doubtful with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from the slaughterhouse).

Tabela 8: Prikaz pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma), neopredeljivih rezultatov (neopredeljivi z obema encimskoimunskima testoma) in rezultatov, ki se med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali (vzorci iz klavnice).

Table 8: Positive results (positive with both ELISA), negative results (negative with both ELISA), doubtful results (doubtful with both ELISA) and mismatching results with both ELISA (samples from the slaughterhouse).

IDvet	Axiom		
	Pozitiven	Negativen	Neopredeljiv
Pozitiven	125	5	3
Negativen	12	103	4
Neopredeljiv	7	7	5

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

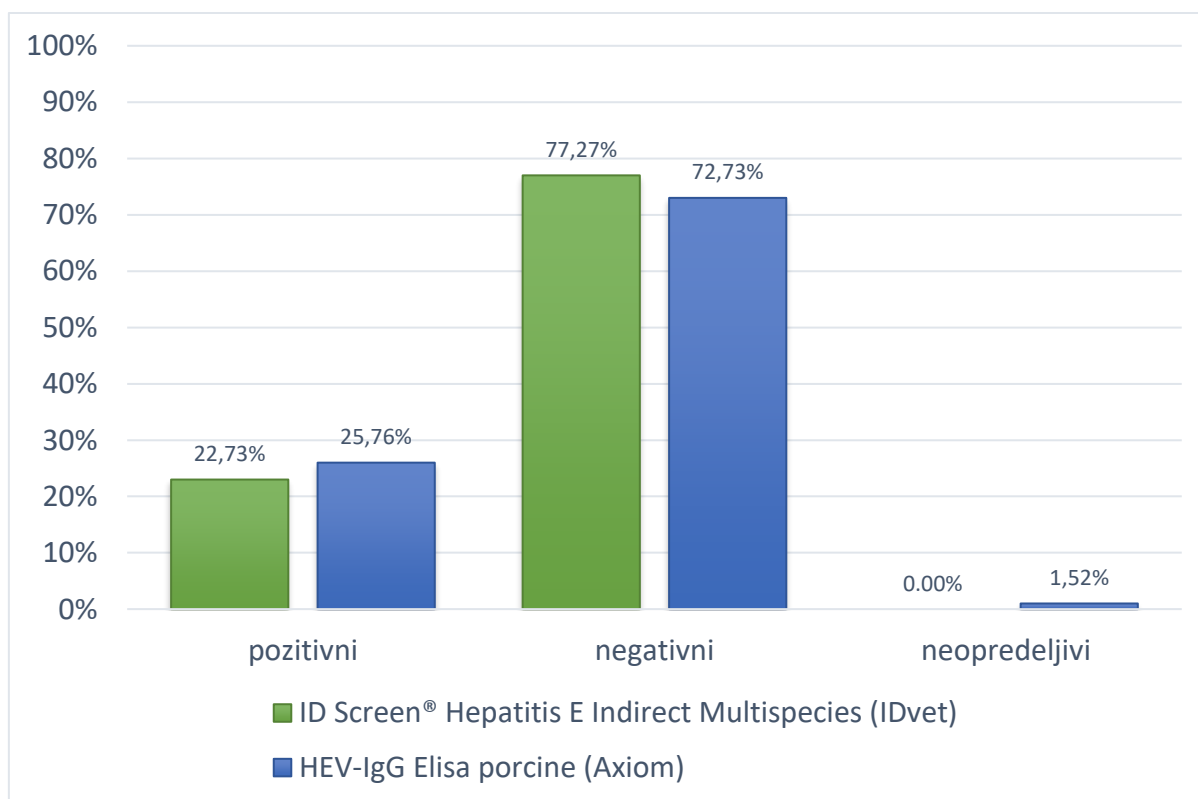
Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

4.1.2.1 Analiza rezultatov po starostnih skupinah prašičev (klavnica)

Pregledali smo 271 serumskih vzorcev, ki smo jih odvzeli prašičem ob zakolu, od tega je bilo 66 živali starih tri mesece, t. i. odojki (Slika 16), 165 živali je bilo starih šest mesecev, t. i. pitanci (Slika 17) in 40 živali je bilo starejših od dvanajst mesecev, t. i. plemenske svinje (Slika 18).

S testom proizvajalca IDvet smo med 66 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starih tri mesece, dokazali 15 (22,73 %) pozitivnih in 51 (77,27 %) negativnih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 16).

S testom proizvajalca Axiom smo med 66 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starih tri mesece, dokazali 17 (25,76 %) pozitivnih, 48 (72,73 %) negativnih in 1 (1,52 %) neopredeljiv vzorec na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 16).

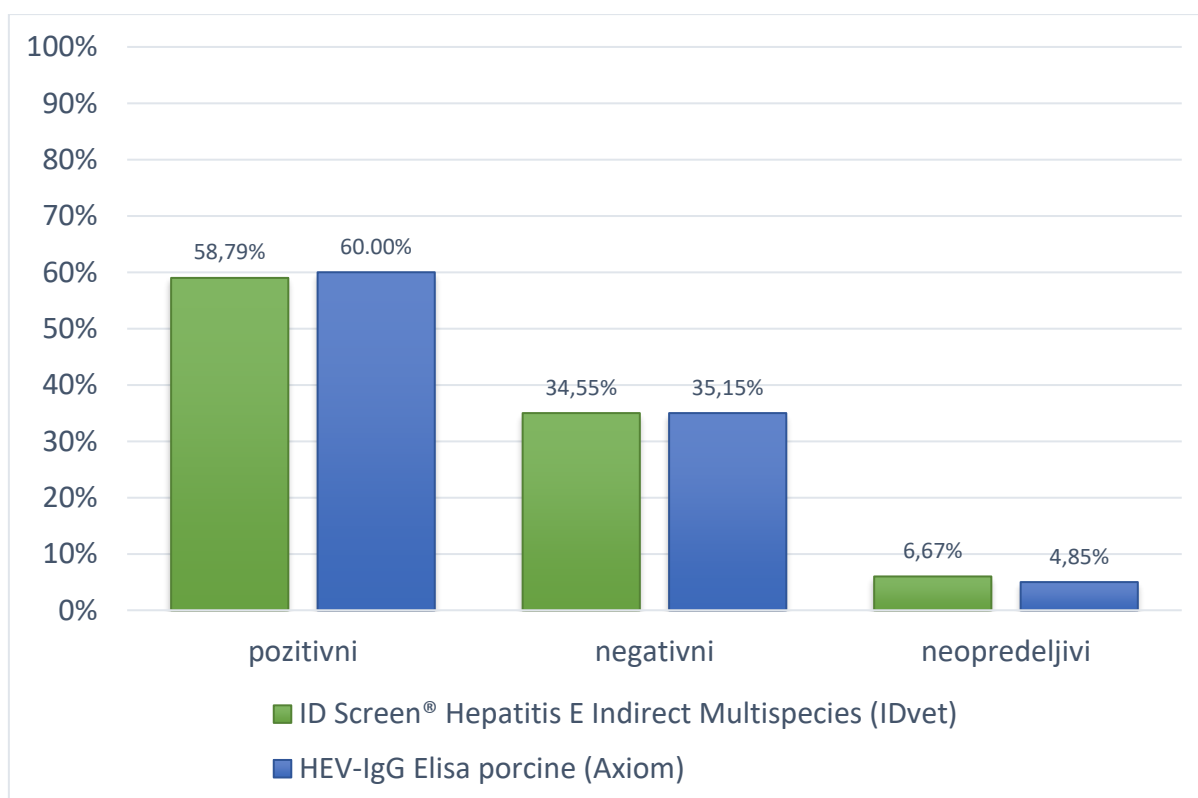


Slika 16: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starih tri mesece, skupno pregledanih 66 živali.

Figure 16: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in 3 months old pigs, altogether 66 animals tested.

S testom proizvajalca IDvet smo med 165 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starih šest mesecev, dokazali 97 (58,79 %) pozitivnih, 57 (34,55 %) negativnih in 11 (6,67 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 17).

S testom proizvajalca Axiom smo med 165 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starih šest mesecev, dokazali 99 (60,00 %) pozitivnih, 58 (35,15 %) negativnih in 8 (4,85 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV (Slika 17).

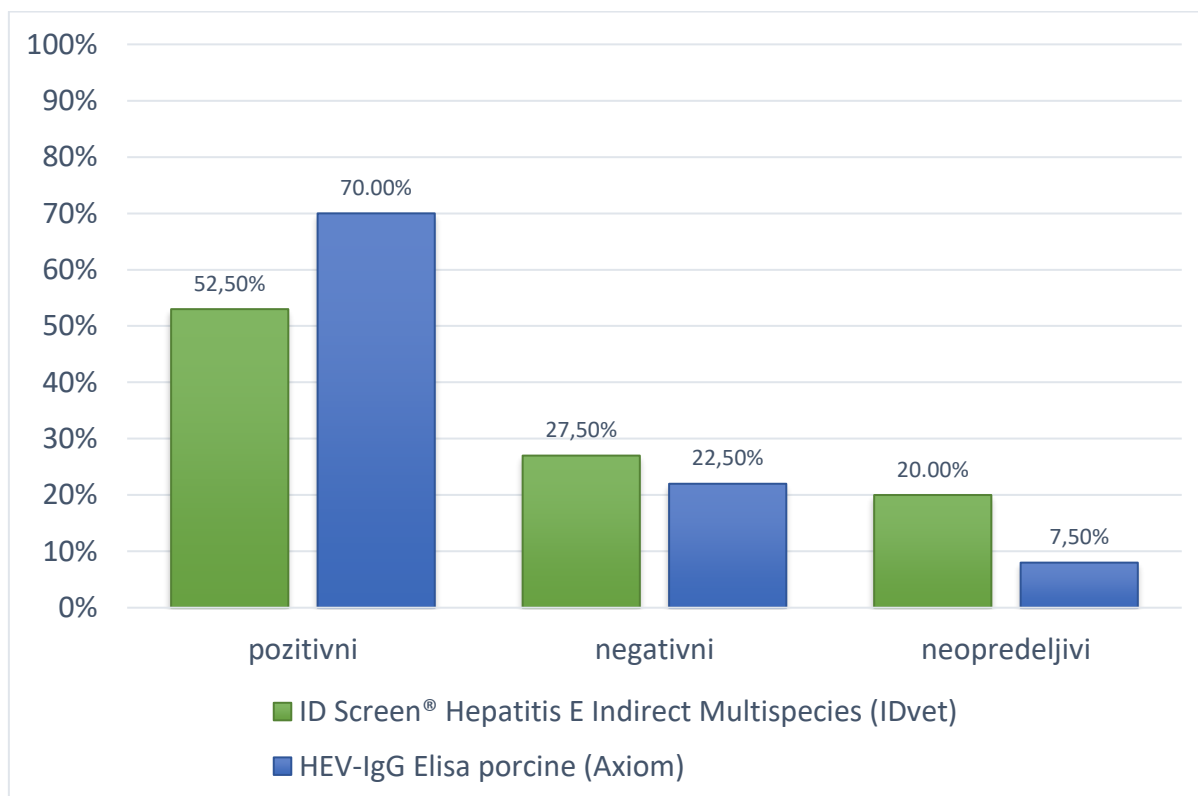


Slika 17: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starih šest mesecev, skupno pregledanih 165 živali.

Figure 17: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in 6 months old pigs, altogether 165 animals tested.

S testom proizvajalca IDvet smo med 40 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starejših od dvanajst mesecev, dokazali 21 (52,50 %) pozitivnih, 11 (27,50 %) negativnih in 8 (20,00 %) neopredeljivih vzorcev na prisotnost protiteles proti HEV (Slika 18).

S testom proizvajalca Axiom smo med 40 pregledanimi serumskimi vzorci prašičev, starejših od dvanajst mesecev, dokazali 28 (70,00 %) pozitivnih, 9 (22,50 %) negativnih in 3 (7,50 %) neopredeljive vzorce na prisotnost protiteles proti HEV (Slika 18).

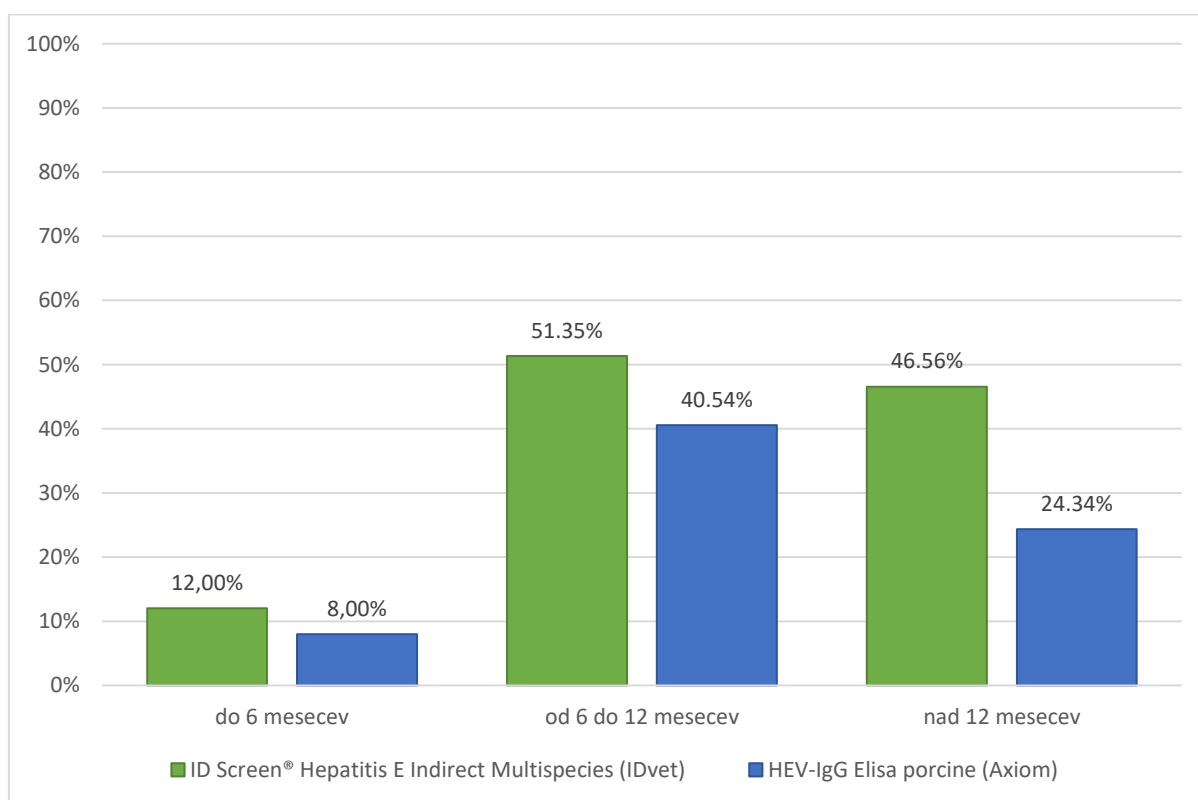


Slika 18: Rezultati opravljenih preiskav z encimskoimunskima testoma proizvajalcev IDvet in Axiom pri prašičih, starejših od dvanajst mesecev, skupno pregledanih 40 živali.

Figure 18: Test results of two ELISA (IDvet and Axiom) in pigs older than 12 months, altogether 40 animals tested.

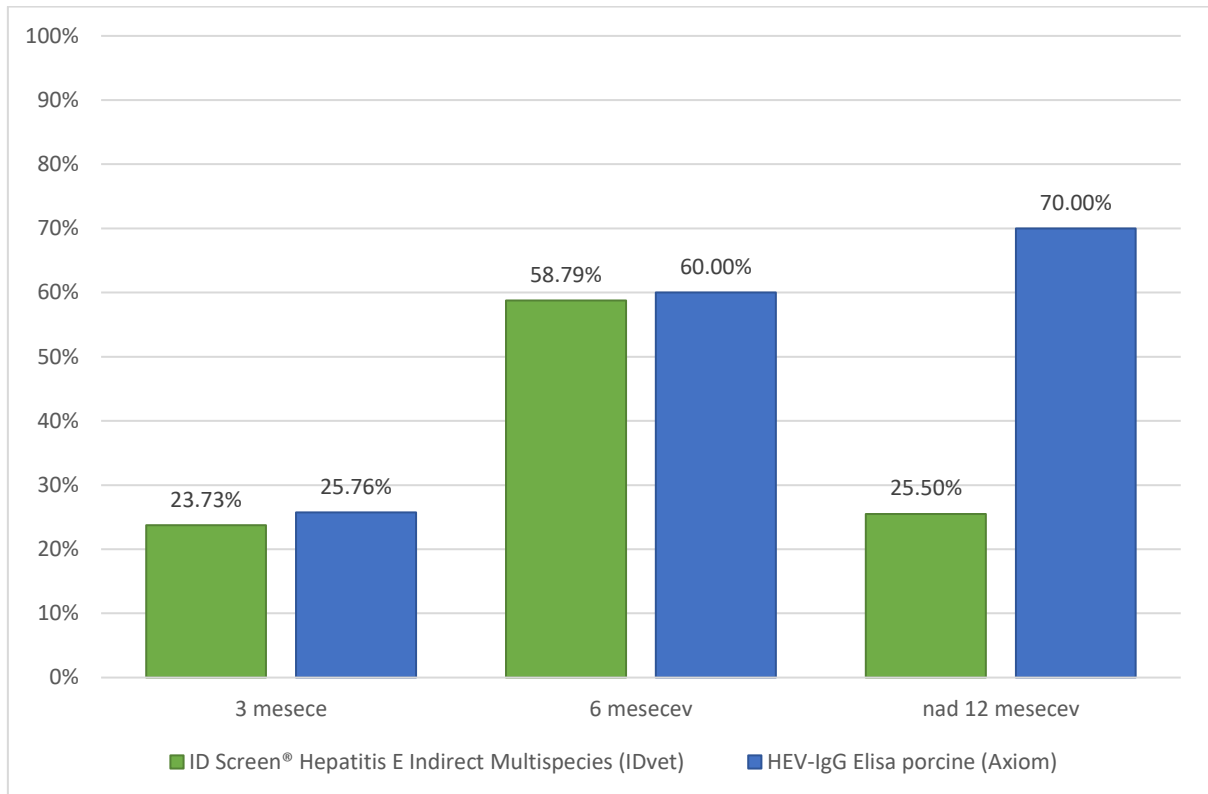
4.1.3 Analiza serološko pozitivnih rezultatov v različnih starostnih obdobjih prašičev

Za lažjo predstavo dinamike pojavljanja protiteles v različnih starostnih obdobjih smo zbrali pozitivne rezultate obeh encimskoimunskih testov in jih prikazali v dveh ločenih grafih glede na skupino vzorcev – pozitivne rezultate naključno izbranih serumskih vzorcev prašičev, ki so bili odvzeti na celotnem območju Slovenije v okviru letnega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014 (Slika 19), in pozitivne rezultate serumskih vzorcev, ki smo jih odvzeli prašičem ob zakolu v klavnici (Slika 20).



Slika 19: Primerjava deleža pozitivnih rezultatov naključno izbranih serumskih vzorcev prašičev (vzorci iz monitoringa) v različnih starostnih obdobjih.

Figure 19: Comparison of positive results percentage from randomly chosen swine serum samples at different ages.



Slika 20: Primerjava deleža pozitivnih rezultatov serumskih vzorcev prašičev (vzorci iz klavnice) v različnih starostnih obdobjih.

Figure 20: Comparison of positive results percentage from swine serum samples (samples taken at the slaughterhouse) at different ages.

4.1.4 Dokaz specifičnih protiteles proti HEV z metodo imunoblot

Zanesljivost modificirane metode imunoblot za dokazovanje specifičnih protiteles smo preverjali na 17 vzorcih (devetih negativnih in osmih pozitivnih), pri katerih so se rezultati obeh encimskoimunskih testov ujemale. Primerjava encimskoimunske in imunoblot metode je potrdila stodstotno ujemanje rezultatov (Tabela 9).

Tabela 9: Rezultati primerjave treh metod (encimskoimunski test proizvajalcev IDvet in Axiom ter metoda imunoblot) na 17 vzorcih.

Table 9: Results for 17 samples, comparison of three methods (ELISA IDvet, ELISA Axiom and immunoblot method).

Zaporedna številka	Oznaka vzorca**	ELISA (OD vrednost)				Imunoblot (število točk)	
		IDvet		Axiom			
1	2/22	0,038	negativno	0,089	negativno	1	negativno
2	2/24	0,018	negativno	0,093	negativno	0	negativno
3	2/26	-0,013	negativno	0,109	negativno	1	negativno
4	4/17	0,212	negativno	0,075	negativno	0	negativno
5	7/17	0,031	negativno	0,164	negativno	0	negativno
6	7/18	0,373	negativno	0,088	negativno	0	negativno
7	7/19	0,605	negativno	0,099	negativno	0	negativno
8	11/29	0,025	negativno	0,101	negativno	0	negativno
9	11/30	0,268	negativno	0,154	negativno	0	negativno
10	4/16	3,282	pozitivno	1,457	pozitivno	5	pozitivno
11	4/18	2,633	pozitivno	0,999	pozitivno	5	pozitivno
12	13/6	2,652	pozitivno	0,53	pozitivno	4	pozitivno
13	16/18	2,251	pozitivno	0,604	pozitivno	4	pozitivno
14	20/26	2,044	pozitivno	0,813	pozitivno	4	pozitivno

15	20/28	2,76	pozitivno	0,931	pozitivno	5	pozitivno
16	20/29	3,365	pozitivno	1,729	pozitivno	5	pozitivno
17	20/30	3,226	pozitivno	1,102	pozitivno	4	pozitivno

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

Imunoblot...recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen diagnostik)

**Oznaka vzorca je sestavljena iz prve številke, ki označuje zaporedni dan vzorčenja in druge številke, ki označuje zaporedje vzorčenih živali tistega dne.

V nadaljevanju smo testirali 43 vzorcev, od tega 38 vzorcev, pri katerih se rezultati med obema encimskoimunskima testoma niso ujemali, in 5 vzorcev, pri katerih sta oba encimskoimunska testa pokazala neopredeljiv rezultat. Z metodo imunoblot smo dokazali prisotnost protiteles proti HEV pri 3 od 5 vzorcev z neopredeljivim rezultatom in pri 32 od 38 vzorcev, pri katerih se rezultati z obema encimskoimunskima testoma niso ujemali. Rezultati vseh treh metod (ELISA IDvet, ELISA Axiom ter metoda imunoblot) preverjenih 43 vzorcev so podrobneje prikazani v Tabeli 10.

Tabela 10: Rezultati primerjave treh metod (encimskoimunski test proizvajalcev IDvet in Axiom ter metoda imunoblot) za 43 vzorcev.

Table 10: Results for 43 samples, comparison of three methods (ELISA IDvet, ELISA Axiom and immunoblot method).

Rezultat preiskave z metodo			Število vzorcev
ELISA IDvet	ELISA Axiom	Imunoblot	
negativen	pozitiven	pozitiven	10
neopredeljiv	pozitiven	pozitiven	7
neopredeljiv	negativen	pozitiven	5
pozitiven	negativen	pozitiven	4
negativen	neopredeljiv	pozitiven	3
pozitiven	neopredeljiv	pozitiven	3
neopredeljiv	neopredeljiv	pozitiven	3
negativen	pozitiven	negativen	2
neopredeljiv	neopredeljiv	negativen	2
neopredeljiv	negativen	negativen	2
pozitiven	negativen	negativen	1
negativen	neopredeljiv	negativen	1
			Skupaj 43

IDvet... ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species

Axiom... HEV-IgG ELISA porcine

Imunoblot (modificiran postopek)...recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen diagnostik)

Ko smo s potrditveno metodo imunoblot razjasnili rezultate serumskih vzorcev, odvzetih prašičem ob zakolu v klavnici, ki se z obema encimskoimunskima testoma niso ujemali, smo lahko z visoko zanesljivostjo opredelili rezultate kot pozitivne in negativne. S tem smo prišli

do končnega rezultata. V starostni kategoriji odojkov je bila tako potrjena prisotnost specifičnih protiteles proti HEV pri 26 % živali, v starostni kategoriji pitancev pri 65 % živali in v starostni kategoriji plemenskih svinj pri 90 % živali.

4.1.5 Določitev diagnostične občutljivosti in specifičnosti

Po izvedenem testiranju vzorcev z metodo imunoblot smo lahko serumske vzorce iz klavnic dokončno opredelili kot pozitivne ali negativne. Od 271 testiranih vzorcev je bilo 160 pozitivnih in 111 negativnih na prisotnost protiteles proti HEV. Pri encimskoimunskem testu proizvajalca IDvet smo ugotovili 13 lažno negativnih vzorcev in 5 lažno pozitivnih, pri encimskoimunskem testu proizvajalca Axiom pa 9 lažno negativnih in 5 lažno pozitivnih. Iz teh podatkov smo lahko izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost obeh encimskoimunskih testov ter pozitivno in negativno napovedno vrednost obeh testov.

Diagnostična občutljivost encimskoimunskega testa proizvajalca IDvet je 91,88 %, proizvajalca Axiom pa 94,38 %.

Diagnostična specifičnost obeh encimskoimunskih testov je 95,50 %.

Pozitivna napovedna vrednost encimskoimunskega testa proizvajalca IDvet je 96,71 %, proizvajalca Axiom pa 96,79 %.

Negativna napovedna vrednost encimskoimunskega testa proizvajalca IDvet je 89,08 %, proizvajalca Axiom pa 92,17 %.

4.2 Rezultati določanja prisotnosti nukleinske kisline HEV z metodo RT-PCR v realnem času

Skupno smo pregledali 2433 vzorcev 811 prašičev (811 vzorcev blata, 811 vzorcev jeter in 811 vzorcev žolča). Nukleinsko kislino HEV smo dokazali v 44 vzorcih blata, 40 vzorcih jeter in 43 vzorcih žolča. Prisotnost HEV smo vsaj v enem izmed vzorcev ugotovili pri 57 živalih (7,03 %). Pri 26 prašičih smo ugotovili prisotnost HEV v vseh treh vrstah vzorcev (žolč, jetra in blato), pri 14 prašičih v dveh vrstah vzorcev (blato in jetra ali jetra in žolč ali blato in žolč). Pri 17 prašičih je bila pozitivna samo ena vrsta vzorca (Tabela 11).

Tabela 11: Rezultati preiskav 57 HEV pozitivnih prašičev (rezultati metod RT-qPCR in ELISA/imunoblot).

Table 11: 57 HEV positive animals (RT-qPCR and ELISA/immunoblot results).

Oznaka vzorca	Datum vzorčenja	Oznaka reje	RT-qPCR (vrednost Ct)			ELISA/IB
			Blato	Jetra	Žolč	Serum
4/16	16.6.2014	I	24,39	24,66	22,70	pozitivno
4/17			negativno	29,66	negativno	negativno
4/18			22,92	24,87	22,80	pozitivno
4/19			26,18	33,54	23,81	negativno
4/20			negativno	34,14	negativno	pozitivno
4/26			22,67	27,04	19,72	*
4/27			36,19	negativno	negativno	*
4/28			36,45	30,08	negativno	*
4/30			32,58	negativno	25,71	*
11/11	7.7.2014		negativno	29,78	28,34	*
11/12			31,39	31,64	29,56	*
11/15			negativno	31,69	29,83	*
11/16			negativno	29,57	30,07	*
11/17			negativno	30,51	26,91	*
11/19			negativno	20,58	15,33	*
11/20			negativno	31,34	negativno	*
16/15	28.7.2014		27,37	23,11	21,94	negativno
16/20			34,81	30,50	31,99	negativno
16/22			36,35	31,55	31,64	*
16/23			28,51	25,25	24,81	*
16/25			35,71	negativno	negativno	*
11/23	7.7.2014	II	34,46	34,52	31,70	negativno
11/24			36,16	negativno	negativno	negativno
11/29			24,33	negativno	negativno	negativno
11/31	35,14		negativno	negativno	negativno	
13/14	16.7.2014		29,74	27,68	27,21	*
13/15			34,93	32,93	27,84	*
13/19			39,33	34,55	34,78	*

25/13	20.8.2014		38,00	33,27	37,10	*
25/17			24,90	22,89	21,15	*
27/59	1.9.2014	III	25,63	21,18	21,78	*
27/60			32,14	26,53	27,19	*
27/63			negativno	37,17	32,31	*
27/52	1.9.2014	IV	34,43	20,00	16,69	*
27/56			negativno	23,57	negativno	*
27/57			negativno	36,55	negativno	*
27/58			26,33	20,41	20,19	*
29/20	29.9.2014	IV	25,67	22,26	19,25	*
29/21			24,43	22,80	17,46	*
29/22			26,41	21,45	20,88	*
29/23			25,01	24,51	18,63	*
29/13	29.9.2014	V	28,95	26,11	25,72	*
26/41	25.8.2014	VI	29,37	30,94	28,85	*
8/10 **	27.6.2014	VII	negativno	26,40	25,91	*
20/45	11.8.2014	VIII	35,85	negativno	28,05	negativno
20/48			34,96	negativno	29,09	*
20/55			37,59	negativno	31,54	*
26/90	25.8.2014	IX	34,49	33,62	32,19	*
26/91			34,00	35,33	31,40	*
26/93			negativno	negativno	30,41	*
26/36	25.8.2014	X	negativno	negativno	34,28	*
26/37			39,40	negativno	35,06	*
26/38			negativno	negativno	33,04	*
27/46	1.9.2014	XI	32,40	negativno	negativno	*
27/47			32,68	negativno	negativno	*
27/48			31,74	negativno	negativno	*
27/49			33,31	negativno	negativno	*
Povprečje			31,36	28,36	26,78	

* Ni vzorca krvi.

** Starost živali šest mesecev (pri vseh drugih vzorcih v tabeli gre za prašiče, stare tri mesece)

Preiskali smo tudi 63 skupnih vzorcev brisov (21 brisov kavljev, na katere se obešajo notranji organi po eksenteraciji, 21 brisov zabojnikov, kamor se shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu, ter 21 brisov kavljev, na katere so obešeni trupi prašičev v hladilnici). Z metodo RT-PCR v realnem času smo prisotnost RNA HEV ugotovili v dveh vzorcih (3,17 %). V pozitivnem brisu zabojnika z jetri smo ugotovili vrednost Ct 29,31, v pozitivnem brisu kavlja, na katerega se obešajo notranji organi, smo ugotovili vrednost Ct 32,33. V preostalih vzorcih brisov (96,82 %) nismo ugotovili prisotnosti nukleinske kisline HEV.

V nobenem od odvzetih 22 vzorcev mletega mesa in 30 vzorcev pečenic nismo ugotovili prisotnosti nukleinskih kislin HEV.

4.2.1 Analiza pozitivnih vzorcev na HEV po starostnih skupinah prašičev

Pri odojkih, starih tri mesece, smo od 322 pregledanih živali ugotovili 13,04 % (42) pozitivnih vzorcev blata, 12,11 % (39) pozitivnih vzorcev jeter in 12,42 % (40) pozitivnih vzorcev žolča. Vsaj eno vrsto vzorca, pozitivnega na HEV, smo dokazali pri 17,39 % (56) od 322 odojkov, pri katerih smo odvzeli vzorce.

V starostni kategoriji šestmesečnih pitancev smo pregledali 400 živali in prisotnost virusne RNA HEV ugotovili pri 0,25 % (1) vzorcih jeter in 0,25 % (1) vzorcih žolča. Oba pozitivna vzorca smo odvzeli isti živali.

Pregledali smo 89 plemenskih svinj in v nobenem vzorcu blata, jeter ali žolča nismo ugotovili prisotnost RNA HEV.

4.2.2 Analiza prisotnosti HEV v rejah, iz katerih so izviral vzorčeni prašiči

V raziskavo smo vključili prašiče, pripeljane v zakol iz 81 različnih rej. Pri 19 rejah smo beležili uvoz prašičev iz tujine (Nemčije, Slovaške, Nizozemske in Avstrije). Pri 22 rejah (26 %) smo pri prašičih odvzeli vzorce več kot enkrat. Prisotnost HEV smo z metodo RT-PCR ugotovili pri 11 rejah (13 %), od tega v desetih rejah odojkov in eni reji pitancev. Med 26 rejami odojkov smo pri desetih rejah (38,5 %) ugotovili vzorce, pozitivne na prisotnost HEV, pri čemer je bilo ob prihodu v klavnico iz posamezne reje na HEV pozitivnih od 5 % do 80 % živali (Tabela 12). Pitance so v zakol pripeljali iz 55 rej, prisotnost HEV smo ugotovili v eni reji (1,9 %). Plemenske svinje so v zakol pripeljali iz osmih različnih rej, med katerimi v nobeni nismo dokazali RNA HEV.

Tabela 12: Podatki o HEV pozitivnih rejah odojkov (razpored po rejah od I do XI): datum vzorčenja odojkov ob prihodu v klavnico, število vzorčenih odojkov in število pozitivnih odojkov na prisotnost HEV.

Table 12: Information about HEV positive farms housing 3 month old pigs (farms from number I to XI): sampling date of 3 month old pigs at slaughter, number of sampled pigs and number of HEV positive pigs.

Reja	Datum vzorčenja	Število vzorčenih odojkov	Število na HEV pozitivnih odojkov (delež)
I	16.6.2014	15	7 (46,67%)
I	7.7.2014	11	7(63,64%)
I	28.7.2014	11	5 (45,45%)
II	7.7.2014	9	4 (44,44%)
II	16.7.2014	16	4 (25,00%)
II	20.8.2014	13	8 (61,54%)
III	1.9.2014	5	3 (60,00%)
III	29.9.2014	5	4 (80,00%)
IV	1.9.2014	8	4 (50,00%)
V	29.9.2014	19	1 (5,26%)
VI	25.8.2014	5	1 (20,00%)
VIII	11.8.2014	15	7 (46,67%)
IX	25.8.2014	5	3 (60,00%)
X	25.8.2014	5	3 (60,00%)
XI	1.9.2014	5	4 (80,00%)

4.3 Določanje nukleotidnega zaporedja pozitivnih vzorcev HEV v regijah ORF 1 in ORF 2

Od 125 vzorcev, pozitivnih na RNA HEV z metodo RT-PCR v realnem času, odvzetih v klavnici, smo izbrali 45 vzorcev z vrednostmi v razponu Ct od 15,33 do 31,40 in jim določili nukleotidno zaporedje v dolžini 366 nt za ORF 1, oziroma 300 nt za ORF 2 ter jih primerjali v genski podatkovni bazi (GenBank) z uporabo spletnega brskalnika BLAST. Nukleotidna zaporedja regije ORF 1 smo poslali v gensko banko in so dostopna s številkami vnosa MG051642- MG051691.

4.3.1 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij v regijah ORF 1 in ORF 2

Ugotovili smo veliko genetsko heterogenost slovenskih sevov HEV. Na podlagi poravnave dobljenih zaporedij z orodjema Lasergen (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) smo z uporabo MEGA 6.0 in Clustal W algoritma poravnave (Tamura s sod., 2013) izdelali filogenetsko drevo. Na podlagi modela Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) smo določili genetsko oddaljenost sevov. Filogenetska drevesa smo izdelali na podlagi metode povezovanja sosedov, ki je temeljila na tisočih samovzorčenjih (Saitou in Nei, 1987).

Filogenetski drevesi smo v regijah ORF 1 in ORF 2 izdelali z metodo *bootstrap*. Poleg naših sevov smo uporabili tudi referenčne seve (Smith in sod., 2020). Vsi slovenski sevi iz te študije spadajo v genotip 3. Ugotovili smo, da se naši sevi uvrščajo v štiri različne podtipе: 3a (42 sevov), 3b (en sev), 3e (en sev) in 3f (en sev).

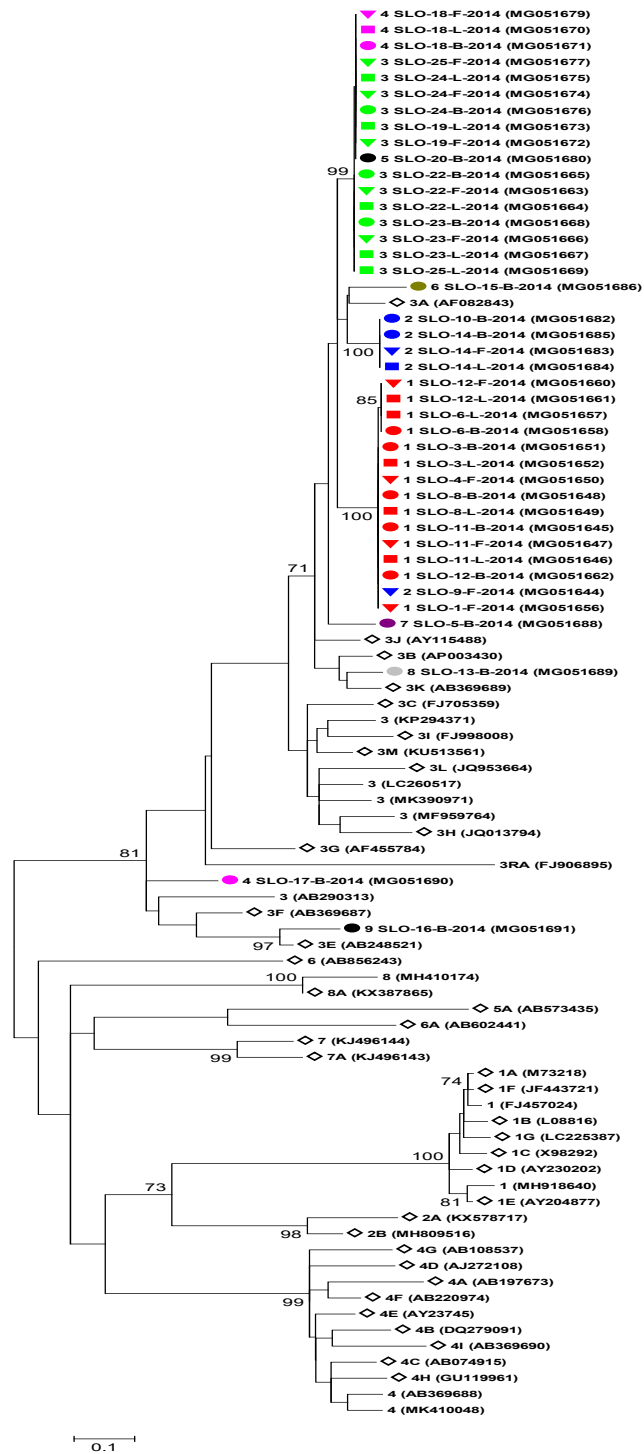
4.3.1.1 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij v regiji ORF1

V filogenetsko primerjavo smo vključili 45 pozitivnih vzorcev iz klavnice iz enajstih različnih rej in 47 referenčnih sevov genotipa 1 do 8 (Smith in sod., 2020) (Slika 21). Nukleotidna zaporedja 42 slovenskih sevov iz devetih rej, uvrščena v podtip 3a, imajo od 89,3 do 100% identičnost zaporedja nukleotidov v regiji ORF 1. Sev podtipa 3b (8SLO-13-B) ima 86,9- do 89,3-odstotno ujemanje nukleotidnega zaporedja z drugimi slovenskimi sevi. Sev podtipa 3f (4SLO-17-B) ima od 83,1- do 84,2-odstotno ujemanje nukleotidnega zaporedja z drugimi slovenskimi sevi. Sev podtipa 3e (9SLO-16-B) ima od 80,9- do 84,4-odstotno ujemanje nukleotidnega zaporedja z drugimi slovenskimi sevi.

Genetska primerjava slovenskih sevov HEV vzorcev iz klavnice, s sevi, objavljenimi v genski banki, je pokazala, da so slovenski sevi podtipa 3a najbolj sorodni (95- oziroma 94-odstotna identičnost zaporedja nukleotidov) madžarskemu sevu HUN-007 (EU718647) in japonskemu

sevu HE-JA-10 (AB089842). Sev podtipa 3b (8SLO-13-B) je najbolj soroden (92-odstotna identičnost zaporedja nukleotidov) japonskima sevoma JRC-HE3 (AB630971) in E008-STM04C (AB369689). Sev podtipa 3e (9SLO-16-B) je najbolj soroden (98- oziroma 96-odstotna identičnost nukleotidnega zaporedja) nemškemu sevu WS09-371 (JQ807514) in nizozemskemu sevu NL_patent-107 (KR362735). Sev podtipa 3f (4SLO-17-B) je najbolj soroden singapurskemu sevu Sing-HEV20 (KT447527), danskemu sevu Dk_patent_3 (MN602943) in francoskemu sevu HESQL147 (MW355369), s katerimi ima 92-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Primerjava nukleotidnih zaporedij, ugotovljenih v različnih tipih vzorca (blato, žolč, jetra) iste živali (vzorci 4SLO-18, 3SLO-24, 3SLO-19, 3SLO-22, 3SLO-23, 3SLO-25, 2SLO-14, 1SLO-12, 1SLO-6, 1SLO-3, 1SLO-8 in 1SLO-11), je pokazala stodontno homologijo med vzorci. Ugotovili smo, da se v sedmih različnih rejah pojavljajo isti sevi podtipa 3a. Ena od teh rej je bila iz jugovzhodne regije Slovenije, ena iz podravske regije, ostalih pet rej pa iz pomurske regije. Znotraj iste reje smo ugotovili prisotnost istega seva HEV tudi ob večkratnem zaporednem vzorčenju (3SLO-19/22/23/24/25, 2SLO-10/14, 1SLO-1/3/4/6/8/11/12). Le v reji številka IV smo ob večkratnem vzorčenju poleg podtipa 3a našli tudi sev HEV, ki se uvršča v podtip 3f (vzorca 4SLO-18 IN 4SLO-17).



Slika 21: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 1 (366 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇.

Figure 21: Phylogenetic tree, ORF 1 (366 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇.

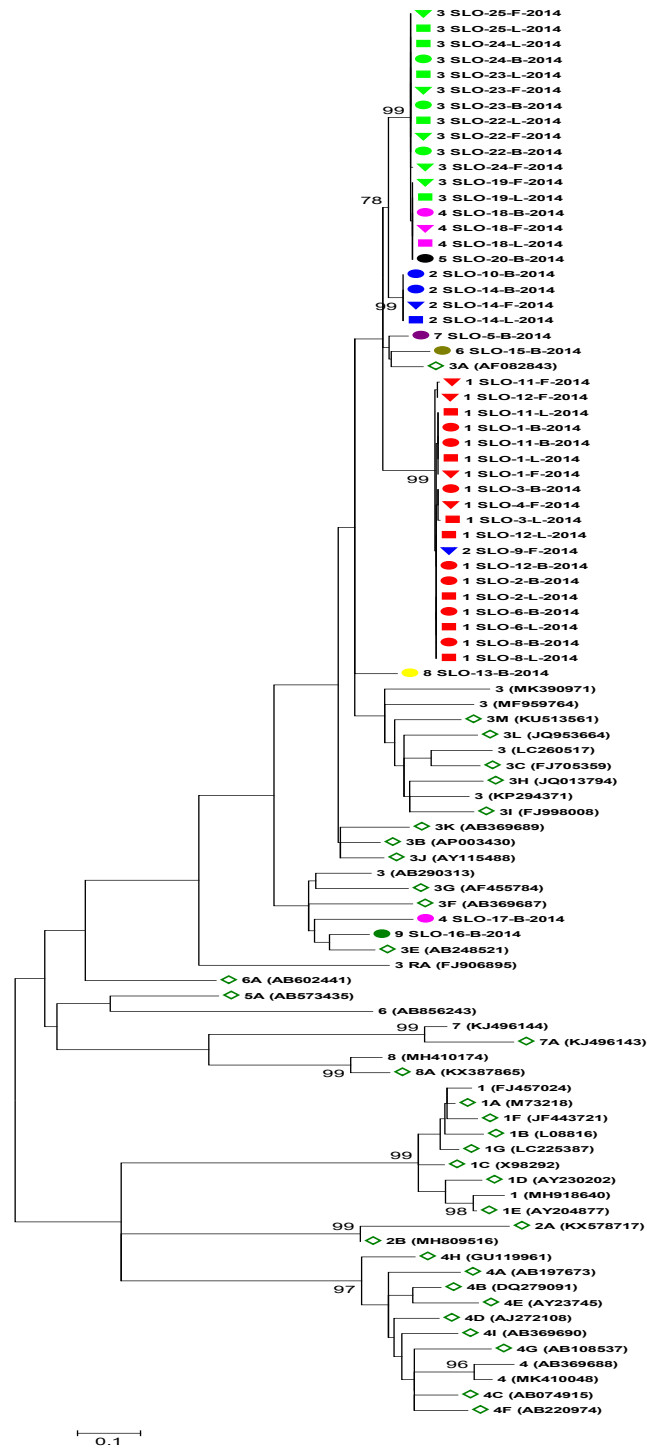
4.3.1.2 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij v regiji ORF2

V filogenetsko primerjavo nukleotidnih zaporedij regije ORF 2 smo vključili 45 pozitivnih vzorcev iz klavnice in 47 referenčnih sevov genotipa 1 do 8 (Slika 22) oziroma 45 pozitivnih vzorcev iz klavnice, 41 referenčnih sevov genotipa 1 do 8, sev z oznako JF431020 iz Slovenije (Steyer in sod., 2011) ter pet sevov (MG582613, MG582624, MG582617, MG582610, MG582608) iz Italije (de Sabato in sod., 2018) (Slika 23). Na filogenetskem drevesu (Slika 22) smo ugotovili enako razporeditev slovenskih vzorcev kot na filogenetskem drevesu ORF 1 (Slika 21).

Slovenski sevi HEV vzorcev iz klavnice, ki se uvrščajo v podtip 3a, imajo od 88,3- do 100-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov. Sev podtipa 3b (8SLO-13-B) ima od 86,3- do 89-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z drugimi sevi. Sev podtipa 3f (4SLO-17-B) ima od 81,7- do 87-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z drugimi sevi. Sev podtipa 3e (9SLO-16-B) ima od 81,3- do 87-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja z drugimi sevi.

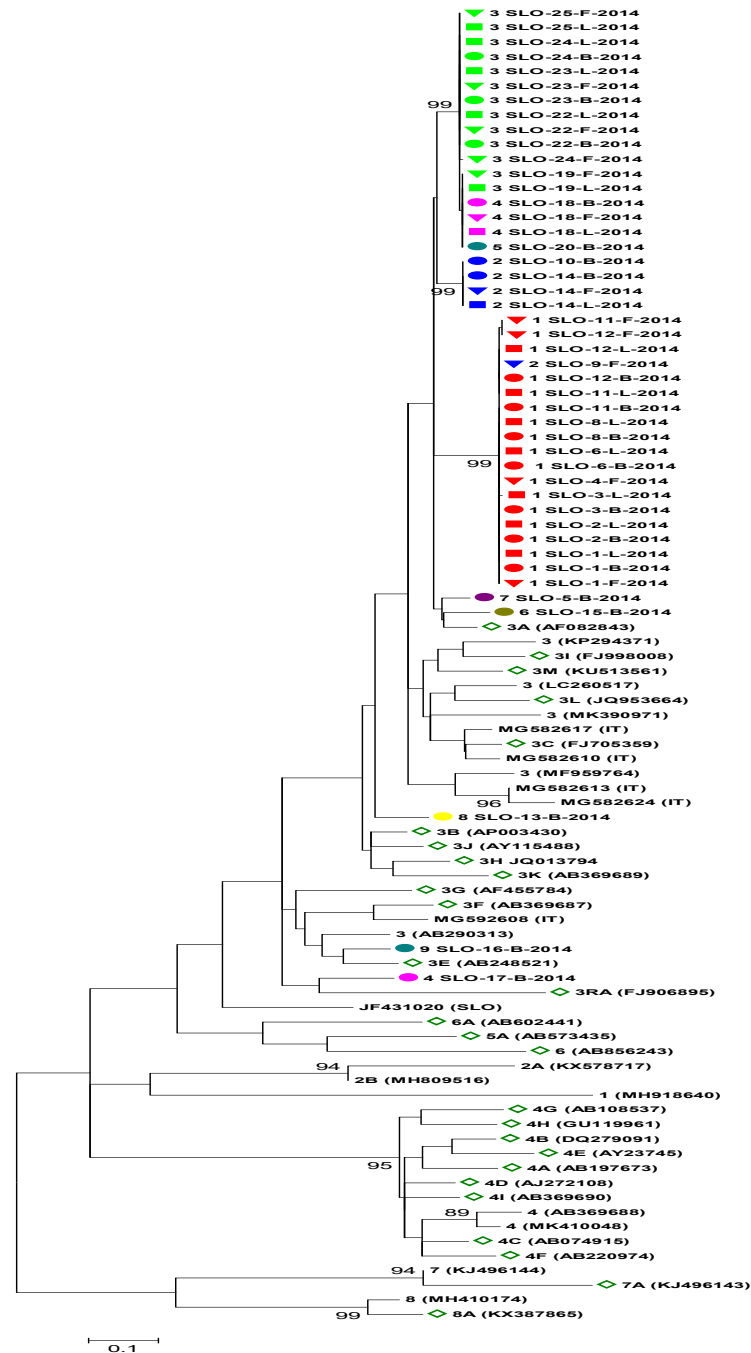
Primerjava slovenskih sevov HEV vzorcev iz klavnice z nekaterimi italijanskimi in slovenskimi sevi v genski banki, prikazanimi na filogenetskem drevesu (Slika 23), je pokazala naslednje: sev z oznako JF431020 iz Slovenije (Steyer in sod., 2011) ima z našim sevom 4SLO-17-L 83-odstotno identičnost zaporedja nukleotidov, s sevom z oznako MG582609 iz Italije (de Sabato in sod., 2018) pa kar 99-odstotno; italijanski sev z oznako MG582613 (de Sabato in sod., 2018) ima z našim sevom 8SLO-13-B 88-odstotno identičnost nukleotidnega zaporedja.

Primerjava slovenskih sevov HEV vzorcev iz klavnice s sevi, objavljenimi v genski banki je pokazala, da je sev podtipa 3a (4SLO-18-F) najbolj soroden (95- oziroma 94-odstotna identičnost zaporedja nukleotidov) slovaškemu sevu MO17 (MT408280) in madžarskemu sevu SE01 (MT408283). Sev podtipa 3b (8SLO-13-B) je najbolj soroden (91-odstotna identičnost nukleotidnega zaporedja) japonskima sevoma SWJAK-1 (AB194500) in HEV-132-09-1 (HQ591364). Sev podtipa 3e (9SLO-16-B) je najbolj soroden (95- oziroma 94-odstotna identičnost nukleotidnega zaporedja) italijanskemu sevu SwHEVEm11IT00 (KJ174068) in hrvaškemu sevu 22F (KF366517). Sev podtipa 3f (4SLO-17-B) je najbolj soroden (92-odstotna identičnost nukleotidnega zaporedja) francoskemu sevu 703 (KR027222) in švedskemu sevu sw_3_6-Uppsala (KT581444).



Slika 22: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 2 (300 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇.

Figure 22: Phylogenetic tree, ORF 2 (300 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇.



Slika 23: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 2 (300 nt); z isto barvo so označeni vzorci prašičev iz istih rej; vzorce blata označuje ▼, vzorce jeter ■, vzorce žolča ●; referenčni vzorci posameznih genotipov in podtipov HEV (Smith in sod., 2020) so označeni z ◇; slovenski in italijanski vzorci označeni s (SLO) in (IT) (Steyer in sod., 2011; de Sabato in sod., 2018).

Figure 23: Phylogenetic tree, ORF 2 (300 nt); pig samples originating from the same farm are labelled with the same colour; feces samples are labelled with ▼, liver samples with ■, bile samples with ●; reference sequences of individual HEV genotypes and subtypes (Smith et al., 2020) are labelled with ◇; Slovenian and Italian samples are labelled with (SLO) and (IT) (Steyer in sod., 2011; de Sabato in sod., 2018).

5 RAZPRAVA

Širjenje okužb HEV iz nerazvitih delov sveta v industrializirane države in prvi neposredni dokazi, da gre za zoonozo, so med raziskovalci vzbudili zanimanje predvsem zaradi možnosti prenosa HEV na ljudi. Od leta 2000 naprej se je začelo pojavljati vse več raziskav o potencialnih novih rezervoarjih virusa, o načinih prenosa, vse več je bilo tudi dokazov o kroženju okužb med populacijo prašičev v različnih državah po svetu.

Ker gre za zoonozo, ki pri prašičih ne povzroča kliničnih znakov, nastopi težava, saj okužbe ni mogoče ugotoviti pri rednem *ante* in *post mortem* pregledu, ki ga izvajajo veterinarji v klavnicah. Okužena žival, ki je prišla v zakol, lahko neposredno ali s posredno kontaminacijo virus zanese na klavno linijo, v predelovalni obrat ter seveda na koncu tudi na police v trgovini.

V Sloveniji smo na prisotnost HEV že opravili nekaj raziskav z manjšim številom vzorcev. Na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani smo pregledovali vzorce domačih in divjih prašičev. Pri domačih prašičih smo od 61 pregledanih vzorcev pri 26 % dokazali RNA HEV (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2008), pri 566 naključno izbranih vzorcih poginulih prašičev med letoma 2011 in 2015 pa smo ugotovili 8,8 % pozitivnih vzorcev na RNA HEV (Toplak in sod., 2016). Primerjava pozitivnih vzorcev 20 različnih rej je pokazala veliko genetsko raznolikost slovenskih sevov HEV v regiji ORF 1 (devet različnih linij) (Toplak in sod., 2012). Pri pregledu 288 serumskih vzorcev divjih prašičev pa smo z encimskoimunskim testom dokazali prisotnost protiteles proti HEV v 30 % vzorcev, prisotnost virusne RNA HEV pa le pri enem vzorcu divjega prašiča (Žele in sod., 2016). Na Biotehniški fakulteti so v okviru diplomske naloge analizirali 85 vzorcev blata prašičev, pozitivnim vzorcem na RNA HEV določili nukleotidno zaporedje in ugotovili, da se vsi sevi uvrščajo v genotip 3 HEV ter da tvorijo posebno skupino znotraj genotipa 3, ki se ne more primerjati z drugimi sevi v genski banki. Ugotavljali so tudi prisotnost virusne RNA HEV v površinskih vodah (Steyer in sod., 2011).

Naša raziskava je prva tako obsežna sistematična raziskava v Sloveniji. Rezultati opravljene raziskave prispevajo k boljšemu razumevanju stanja okužb prašičev s HEV ob vstopu na klavno linijo ter podajajo natančnejšo sliko o prekuženosti prašičev na farmah v opazovanem obdobju. Glede na razmeroma veliko število vzorcev in razpršenost izvora prašičev iz številnih farm po državi lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da rezultati podajajo natančen

podatek o razširjenosti okužb s HEV pri domačih prašičih v Sloveniji za opazovani časovni interval.

Za ugotavljanje specifičnih protiteles proti HEV se najpogosteje uporablja encimskoimunski test. Ugotovili smo, da se rezultati 351 naključno izbranih vzorcev s celotnega območja Slovenije, pregledanih z izbranimi komercialnima testoma ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV-IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom, ne ujemajo v 20,80 % (73 vzorcev), rezultati 359 vzorcev, odvzetih pri prašičih ob zakolu v klavnica, pa v 14,02 % (38 vzorcev).

S podobnimi dilemami so se srečevali raziskovalci v Nemčiji. V raziskavi so na 321 serumskih vzorcih primerjali delovanje *in-house* encimskoimunskega testa in komercialnega encimskoimunskega testa proizvajalca Axiom. Rezultati slednjega so pokazali 64,8 % pozitivnih vzorcev, *in-house* encimskoimunski test pa 43,9 %. Rezultati le 56,07 % (180 vzorcev) pregledanih vzorcev so se ujeli. Nato so naključno izbrali 23 vzorcev in jih pregledali še z metodo imunoblot RecomBlot (Mikrogen). V primerjavi je imelo samo sedem vzorcev pozitiven rezultat pri vseh treh metodah (Baechlein in sod., 2010). V drugi raziskavi so primerjali pet različnih encimskoimunskih testov, od tega tri komercialno dostopne (proizvajalcev PrioCheck, Axiom in IDvet) in dve *in-house* metodi. Za primerjavo so uporabili 420 serumskih vzorcev prašičev. Kljub temu, da so z encimskoimunskim testom proizvajalca Axiom dokazali največjih 65 % pozitivnih vzorcev na prisotnost specifičnih IgG proti HEV, se je med rezultati najbolj razlikoval od drugih encimskoimunskih testov, ki so bili med seboj bistveno bolj primerljivi (Krumbholz in sod., 2013). Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi, saj primerjava pozitivnih, negativnih in neopredeljivih rezultatov obeh testov kaže, da se rezultati ne ujemajo v 14,02 % pri analizi serumskih vzorcev, odvzetih prašičem ob zakolu v klavnici, oziroma v 20,80 % pri analizi naključno izbranih serumskih vzorcev s celotnega območja Slovenije, vzorčenih v sklopu rednega monitoringa. Vendar pa je statistična obdelava podatkov s Fisherjevim eksaktnim testom pokazala, da so rezultati encimskoimunskih testov proizvajalcev IDvet in Axiom močno statistično značilno povezani ($p < 0,0001$). Pri tem je vrednost koeficienta kappa pri vzorcih monitoringa 0,60, kar pove, da je ujemanje med testoma sprejemljivo, medtem ko je pri vzorcih iz klavnice ujemanje dobro, vrednost koeficienta kappa je 0,75.

Ker smo v naši raziskavi uporabili le dva encimskoimunski testa, je bilo iz rezultatov nemogoče sklepati, katera metoda je primernejša za rutinsko diagnostiko v laboratoriju. Podatkov o njuni občutljivosti in specifičnosti nam ni uspelo dobiti od proizvajalcev, prav tako jih nismo zasledili v dostopni literaturi. Ker smo v okviru raziskave kot potrditveni test uvedli modificirano metodo imunoblot (recomLine HEV IgG/IgM proizvajalca Mikrogen diagnostik), smo z njo testirali serumske vzorce iz klavnice in jih opredelili kot pozitivne ali negativne ter na podlagi teh rezultatov izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost obeh encimskoimunskih testov kot tudi pozitivno in negativno napovedno vrednost. Diagnostična specifičnost obeh testov je bila 95,50 %, diagnostična občutljivost 94,38 % je bila večja pri testu proizvajalca Axiom v primerjavi z encimskoimunskim testom proizvajalca IDvet, kjer je znašala 91,88 %. Prav tako sta bili pozitivna in negativna napovedna vrednost večji pri encimskoimunskem testu proizvajalca Axiom, 96,79 % in 92,17 %, medtem ko sta bili ti vrednosti pri encimskoimunskem testu proizvajalca IDvet 96,71 % in 89,08 %. Glede na izračune specifičnosti in občutljivosti obeh encimskoimunskih testov ocenjujemo, da je test proizvajalca Axiom primernejši za testiranje prašičjih serumov na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV. Metoda imunoblot recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen diagnostik) je v primeru, da jo ustrezno modificiramo in preverimo, zaradi preproste izvedbe in zanesljivosti, lahko uporabljena kot potrditvena metoda.

V prašičji populaciji, v kateri je HEV prisoten, prihaja v večini primerov do okužbe v starosti prašičev od dveh do treh mesecev, ko maternalna imunost izzveni. Po enem do dveh tednih od okužbe se v serumu okužene živali pojavijo specifična protitelesa. Dosedanje raziskave kažejo, da s starostjo živali prevalenca seropozitivnih živali narašča, zato smo rezultate, ki smo jih dobili z encimskoimunskimi testi, razdelili po starostnih skupinah. Tako smo naše rezultate najlažje primerjali s podatki iz literature.

Serumske vzorce smo pridobili iz dveh različnih virov, ob zakolu v klavnici ter iz monitoringa kužnih bolezni prašičev. Ker se številčna zastopanost živali v posameznih starostnih skupinah in strukturiranost starostnih skupin pri vzorcih, pridobljenih v klavnici, in vzorcih, pridobljenih iz monitoringa, precej razlikuje ter je nabor rej pri vzorcih iz monitoringa kužnih bolezni bistveno večji kot pri vzorcih iz klavnice, smo se odločili, da bomo rezultate obravnavali ločeno. Rezultate serumskih vzorcev iz klavnice, pridobljene z encimskoimunskima testoma, smo ob pomoči dobljenih rezultatov z metodo imunoblot lahko ovrednotili kot pozitivne in negativne. V starostni skupini odojkov smo tako dobili 26 %

pozitivnih vzorcev, v starostni skupini pitancev 65 % pozitivnih vzorcev in v starostni skupini plemenskih svinj kar 90 % pozitivnih vzorcev. Nekoliko drugačni so rezultati pri serumskih vzorcih monitoringa; izstopajo rezultati plemenskih svinj. Z encimskoimunskim testom proizvajalca IDvet smo namreč dokazali 47 % pozitivnih vzorcev, s testom proizvajalca Axiom pa le 24 %. Upoštevati je treba, da vzorcev, pri katerih se rezultati obeh encimskoimunskih testov niso ujemali (teh je 51 od skupno 189), nismo preverjali z metodo imunoblot, zato rezultatov nismo mogli ovrednotiti, kot smo to storili pri rezultatih, pridobljenih na vzorcih iz klavnice. Predvidevamo, da bi se ta dva deleža bolj približala drug drugemu, če bi neujemajoče se rezultate preverili z metodo imunoblot. Tudi raziskave iz drugih evropskih držav, opravljene na prašičjih serumih, pri katerih se določa prisotnost specifičnih protiteles proti HEV, kažejo raznolike rezultate. V Nemčiji so analizirali 1072 serumskih vzorcev iz 142 prašičjih farm in pri odojkih dobili 16,8 %, pri pitancih 31,3 % in pri plemenskih svinjah 50 % pozitivnih vzorcev (Baechlein in sod., 2010). V Bolgariji so v prvi raziskavi pregledali 433 vzorcev prašičjih serumov; pri odojkih niso uspeli dokazati specifičnih protiteles proti HEV, pri pitancih so dobili kar 73,6 % pozitivnih vzorcev (Takova in sod., 2020). V drugi preiskavi so med 360 vzorci potrdili 25 % pozitivnih odojkov, 75,8 % pozitivnih pitancev in 80 % pozitivnih plemenskih svinj (Tsachev in sod., 2019). V Srbiji so analizirali 150 serumskih vzorcev z območja Beograda, odvzetih na treh večjih farmah. Pozitivnih na prisotnost specifičnih protiteles proti HEV je bilo 53,3 % odojkov, 83,3 % pitancev in 76,6 % plemenskih svinj (Kureljušić in sod., 2020). V Italiji so pregledali 1442 vzorcev seruma iz 39 farm, pri dvo- do trimesečnih prašičkih potrdili 30,8 % pozitivnih živali, pri štiri- do šestmesečnih 41,5 % pozitivnih živali, pri prašičih, starejših od šest mesecev, 30,8 % pozitivnih živali in pri plemenskih svinjah 70,6 % pozitivnih živali, (Martinelli in sod., 2011), od 335 seroloških vzorcev, odvzetih pri šestmesečnih prašičih ob zakolu, pa 76,8 % pozitivnih vzorcev (Chelli in sod., 2021). V Španiji so pregledali 439 serumskih vzorcev iz 41 farm in potrdili 35,7 % pozitivnih odojkov ter 60,8 % pozitivnih plemenskih svinj (Seminati in sod., 2008), v drugi raziskavi pa so med 1141 vzorci seruma ugotovili 30,2 % pozitivnih vzorcev živali starejših od šest mesecev, in 15,5 % pozitivnih vzorcev živali, mlajših od šest mesecev (Jiménez de Oya in sod., 2011). V Franciji so vzorce odvzeli prašičem ob zakolu v klavnici in med 6565 serumskimi vzorci prašičev iz 186 različnih farm ugotovili prisotnost specifičnih protiteles proti HEV pri 31 % vzorcih (Rose in sod., 2011).

Na Danskem so pregledali 213 serumskih vzorcev plemenskih svinj in ugotovili 73,2 % pozitivnih živali (Breum in sod., 2010).

Ob podrobnejši analizi teh podatkov vidimo, da rezultati, ki smo jih pridobili po testiranju vzorcev iz starostne skupine odojkov in pitancev, ne izstopajo bistveno iz povprečja zgoraj omenjenih raziskav. Nepričakovani so le rezultati pri plemenskih svinjah, saj smo pri pregledovanju vzorcev iz monitoringa, pri katerem smo imeli številčno veliko skupino (189 živali), z encimskoimunskim testom proizvajalca Axiom dobili rezultat 24 % pozitivnih vzorcev oziroma 47 % s testom proizvajalca IDvet, pri vzorcih iz klavnice, kjer je bila številčnost skupine bistveno manjša (le 40 živali), pa kar 90 % pozitivnih vzorcev. Na ta rezultat gotovo vpliva število različnih rej, od koder izvirajo živali, pri katerih smo odvzeli vzorce. V klavnici namreč nismo imeli priložnosti vzorčiti živali iz veliko različnih rej, obravnavanih 40 vzorcev izhaja od živali iz petih različnih rej, od tega iz dveh rej samo po ena žival, iz ene reje štiri živali, iz drugih dveh rej pa preostalih 44 živali. Iz tega lahko sklenemo, da smo podrobneje pogledali situacijo na dveh večjih farmah in ugotovili visoko prekuženost plemenskih svinj. Drugačna je razporeditev seroloških vzorcev iz monitoringa, pri katerem je skoraj vsaka žival izhajala iz svoje reje (vključene so bile manjše reje), več seroloških vzorcev živali smo analizirali le iz treh večjih farm. Na podlagi razpršenosti izvora seroloških vzorcev iz monitoringa lahko trdimo, da gre v tem primeru za bistveno večjo reprezentativnost rej po Sloveniji. Rezultati so pridobljeni iz razmeroma velike skupine (189 prašičev, starejših od 12 mesecev) in se ne ujemajo s pričakovano pojavnostjo specifičnih protiteles pri tej kategoriji prašičev. Večina starejših prašičev naj bi namreč tekom življenja prišla v stik s HEV in pri tem razvila specifična protitelesa, zato je rezultat, ki smo ga dobili v tej starostni skupini pri vzorcih iz monitoringa, nepričakovan. Nenavaden padec protiteles vidimo tudi pri prikazu pozitivnih rezultatov na slikah 19 in 20. Ob tem se poraja vprašanje, ali morda specifična protitelesa proti HEV pri prašičih le niso prisotna v krvi dosmrtno. Največ protiteles proti HEV smo dokazali v skupini pitancev, ki so okužbo najverjetneje preboleli pred približno tremi meseci, zato je pričakovano, da so protitelesa še vedno prisotna. Pri plemenskih svinjah, pri katerih je bila starost zelo različna (od enega leta do štirih let), pa je od okužbe najverjetneje minilo že več kot deset mesecev, v določenih primerih tudi tri leta, zato je mogoče, da specifičnih protiteles proti HEV zaradi nizkega nivoja, s testi ne zaznamo. Seveda bi morali, če bi želeli to trditev neizpodbitno potrditi, plemenskim svinjam v daljšem časovnem obdobju ponavljajoče vzorčiti kri in nato v serumu določiti nivo specifičnih

protiteles. Le s takim pristopom bi lahko dokazali dinamiko upadanja specifičnih protiteles. Pri razlagi je vseeno treba poudariti, da določeni delež plemenskih živali zaradi specifične plemenske reje nikoli ne pride v stik z virusom in posledično ne razvije specifičnih protiteles. Dejstvo je, da so plemenske svinje obravnavane kot samostojna kategorija že od samega začetka vzreje. Gre za živali, ki se redijo za razplod in so bistveno bolj biovarnostno privilegirane, zaradi česar so podvržene znatno manjšemu tveganju za okužbo s HEV.

Vsekakor se ob tem postavlja vprašanje zanesljivih primerjav glede seroprevalence HEV med posameznimi državami, saj so v primerljivih raziskavah v različnih državah uporabljeni zelo različni encimskoimunski testi, pa tudi način vzorčenja in načrtovanje vzorčnih skupin sta se razlikovala. Naštete spremenljivke imajo značilen vpliv na rezultate, kar smo jasno prikazali tudi v našem primeru. Za zanesljivejši prikaz prekuženosti s HEV v različnih starostnih skupinah prašičev v slovenskih rejah bi tako morali s potrditveno metodo imunoblot preveriti še vse serumske vzorce, pri katerih se rezultati obeh encimskoimunskih testov niso ujemale, in ne samo tistih vzorcev, ki smo jih odvzeli v klavnici ob zakolu.

Po pričakovanjih smo največji delež pozitivnih vzorcev na prisotnost RNA HEV ugotovili pri odojkih, starih tri mesece. Gre sicer za manjši delež prašičev, ki jih pripeljejo na zakol v klavnico, pa vendar se po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije vsako leto v slovenskih klavnicah zakolje okrog dvajset tisoč odojkov (<https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/-/1505802S.px/table/tableViewLayout2/>).

Koliko odojkov se zakolje na domu, ne vemo, vendar lahko sklepamo, da ne gre za majhno število, predvsem v južnem delu Slovenije, kjer je navada peči odojke na ražnju. Pri zakolu na domu včasih razmere niso najprimernejše in tudi dobre prakse se morda ne upoštevajo povsem dosledno, zato obstaja možnost navzkrižne kontaminacije pri obdelavi trupa. Če nato odojka na ražnju ne prepečemo dovolj, je to lahko za zdravje potrošnika tvegano.

Med 322 pregledanimi živalmi smo našli 13 % (42) pozitivnih vzorcev blata, 12,1 % (39) pozitivnih vzorcev jeter in 13,0 % (40) pozitivnih vzorcev žolča. Pri 17 % (56) od 322 testiranih živali v najmlajši starostni skupini smo ugotovili, da je vsaj ena vrsta vzorca (ali blato ali jetra ali žolč) pozitivna na HEV. Delež pozitivnih vzorcev se med različnimi vrstami vzorcev ni bistveno razlikoval. Največjo količino RNK HEV smo sicer našli v vzorcih žolča, vendar menimo, da je blato predvsem zaradi preprostega načina odvzema vzorca najprimernejši vzorec za odkrivanje okuženih prašičev, pozitivnih na HEV.

V starostni kategoriji šestmesečnih prašičev smo sicer pričakovali manjši delež pozitivnih vzorcev kot pri odojkah, a so nas tako nizke vrednosti kljub vsemu presenetile. Prisotnost virusne RNA HEV smo ugotovili le pri 0,25 % (1) vzorcih jeter in 0,25 % (1) vzorcih žolča od 400 pregledanih živali. Sklepamo, da bi lahko bil vzrok za tako nizek delež pozitivnih živali v tem, da se živali v primeru, da se HEV nahaja v reji endemično, okužijo že v prvih treh mesecih življenja in so v času prihoda v klavnico bolezen že prebolele ter niso več v aktivni fazi izločanja virusa. V Sloveniji večina prašičerej spada med manjše reje, imamo le še dve veliki farmi (Štukelj in sod., 2019). V manjših rejah se po navadi živali med seboj mešajo, delavci prehajajo med kategorijami, morda se biovarnost ne upošteva tako strogo in se zato virus hitreje širi; živali se okužijo kmalu po upadu maternalne imunosti. V državah z intenzivnim sistemom in bistveno večjimi rejami z velikim številom prašičev imajo strožji sistem biovarnosti, tehnološko bolj dovršen sistem reje in zato do okužbe verjetno pride kasneje, ko so prašiči že starejši, in tako obstaja večja verjetnost, da žival pride v zakol v času viremije.

V klavnici smo vzorce odvzeli tudi pri 89 plemenskih svinjah, vsi vzorci blata, jeter in žolča so bili negativni na prisotnost HEV, kar smo tudi pričakovali glede na potek okužb v prašičji populaciji. Do okužbe v večini primerov pride v prvih mesecih življenja, starejše živali imajo specifična protitelesa, zaradi česar so zaščitena pred vnovično okužbo. Živali, ki še niso prišle v stik z virusom, pa imajo kasneje bistveno manj možnosti za okužbo, saj se te živali ne mešajo z mlajšimi starostnimi kategorijami prašičev.

Da bi ugotovili, kakšne so epidemiološke razmere v slovenskih klavnicah v primerjavi z drugimi klavnicami po svetu, smo na podlagi rezultatov prisotnosti RNA HEV pri vzorcih, odvzetih prašičem ob zakolu, naše podatke primerjali s tistimi iz drugih držav. Pri primerjavi rezultatov moramo upoštevati, da je metaanaliza med različnimi raziskavami praktično nemogoča tako zaradi različnih pristopov vzorčenja (različne razporeditve starostnih skupin, vzorčenje skupnih ali individualnih vzorcev, različno število zbranih vzorcev) kot tudi različnih metod ugotavljanja virusa.

V literaturi največ podatkov najdemo za prašiče, stare šest mesecev, oziroma primerne za zakol, kar morda lahko v določenih primerih pomeni, da gre za starejše živali. V mnogih raziskavah namreč starost prašičev ni točno določena, kar je seveda velika pomanjkljivost pri interpretaciji in primerjavi rezultatov. V tej starostni skupini se delež pozitivnih vzorcev blata

giblje od 3 % do 71,9 %, vendar pa sta raziskavi, iz katerih izhajata rezultata, pregledali manjše število vzorcev in te številke težko upoštevamo kot reprezentativne. Na Češkem so potrdili 3 % RNA HEV pozitivnih vzorcev blata pri 40 pregledanih vzorcih (Di Bartolo in sod., 2010), 71,9 % pozitivnih vzorcev blata od 30 pregledanih vzorcev pa so našli na Danskem (Breum in sod., 2010). Bolj reprezentativne so vsekakor raziskave, v katerih so vzorčili večje število prašičev. Na Madžarskem so vzorčili blato pri 248 prašičih v starosti od tri do štiri mesece in pri prašičih, starejših od štirih mesecev, ter pri slednjih potrdili 10 % pozitivnih vzorcev na RNA HEV (Forgách in sod., 2010). Na Slovaškem so odvzeli 388 rektalnih brisov prašičev različnih starostnih skupin in v vzorcih pri pitancih ugotovili 14,1 % pozitivnih vzorcev (Jackova in sod., 2021). Na Portugalskem so odvzeli 200 vzorcev blata v različnih starostnih skupinah in ugotovili 32 % RNA HEV pozitivnih med pitanci in 4 % pozitivnih med plemenskimi svinjami (Berto in sod., 2012).

Pri jetrih se je razpon pozitivnih vzorcev na RNA HEV gibal od 1,25 % do 15,6 % (García in sod., 2017; Di Bartolo in sod., 2010; Berto in sod., 2012; Müller in sod., 2017). V vseh raziskavah, v katerih so analizirali več kot sto vzorcev, so bili deleži RNA HEV pozitivnih vzorcev jeter precej majhni, 1,25 % v Švici (Müller in sod., 2017), 2,8 % (Feurer in sod., 2018) in 4 % (Rose in sod., 2011) v Franciji. V dveh raziskavah iz Brazilije, kjer so analizirali večje število vzorcev žolča, je bil razpon rezultatov od 2 % do 10 % pozitivnih vzorcev na prisotnost RNA HEV (Dos Santos in sod., 2011; Gardinalli in sod., 2012). V Španiji so med 45 vzorci jeter dokazali 15,6 % RNA HEV pozitivnih vzorcev (García in sod., 2017).

Podatkov o prisotnosti RNA HEV v drugih starostnih skupinah je malo. Na Slovaškem so odvzeli 388 rektalnih brisov prašičev različnih starostnih skupin in pri odojkah ugotovili 14,9 % vzorcev, pozitivnih na RNA HEV. Pri plemenskih svinjah niso dokazali pozitivnih vzorcev (Jackova in sod., 2021). Na Portugalskem so odvzeli 200 vzorcev blata v različnih starostnih skupinah in ugotovili 20 % pozitivnih vzorcev med odojki in 4 % pozitivnih med plemenskimi svinjami (Berto in sod., 2012).

Ocenjujemo, da je bistvena prednost naše raziskave v tem, da smo odvzeli vzorce pri velikem številu prašičev, starostne skupine so bile točno določene, tako da ni dvoma o starosti prašičev pri posamezni skupini, kot tudi, da smo vsakemu prašiču odvzeli po tri različne vzorce, blato, jetra in žolč. S tako sistematičnim pristopom k vzorčenju smo dobili dober vpogled v

dejansko epidemiološko situacijo in s tem stanje okužb prašičev s HEV ob zakolu v slovenskih klavnicah v letu 2014.

V našo raziskavo smo za raziskovanje navzkrižne kontaminacije vključili tudi brise površin na treh mestih. Brise kavljjev, na katere se obešajo notranji organi po eksenteraciji, brise zabojnikov, kamor se shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu, ter brise kavljjev, na katere so obešeni trupi prašičev v hladilnici. Prisotnost RNA HEV smo potrdili pri brisu zabojnika z jetri prašičev in brisu kavlja, na katerega se obešajo notranji organi po eksenteraciji. Oba dneva, ko smo dokazali pozitivna brisa površin, smo prašičem odvzeli tudi vzorce jeter, žolča in blata, ki so bili prav tako pozitivni na prisotnost RNA HEV. Ugotovljeni pozitivni brisi z veliko verjetnostjo dopuščajo možnost kontaminacije in prenosa HEV na klavni liniji ter dokazujejo, da se virus vnaša v klavnico z okuženimi živalmi, ki prek procesa klanja kontaminirajo površine. Tako kontaminirane površine predstavljajo potencialno nevarnost okužbe za delavce ter povečujejo tveganje za prenos HEV na izdelke iz svinjine oziroma svinjskih jeter. V zabojniku, kjer se shranjujejo jetra po veterinarskem pregledu, lahko en sam močno okužen organ kontaminira jetra drugih živali v zabojniku, ta se namreč dotikajo, iztekata se kri in žolč. Glede na način uporabe kavljjev, le ti predstavljajo manjšo možnost navzkrižne kontaminacije. Ta vrsta kavljjev stalno kroži po klavni liniji in v času dnevnega zakola večkrat obide linijo. Nanje se obešajo še anatomsko povezana pljuča, srce in jetra z žolčnikom tako, da se obesijo v predelu sapnika, ki ni namenjen za prodajo in morebitna kontaminacija ne predstavlja večjega tveganja za prenos HEV na človeka. Večjo skrb vzbuja dejstvo, da je bila v naši raziskavi dokazana kontaminacija kavljjev, kar nakazuje, da gre v takem primeru za veliko količino HEV in se ta z veliko verjetnostjo prenaša tudi na rokavice delavcev med rokovanjem z organi, ti pa ga lahko prenesejo na druge dele trupov prašičev.

V dostopni literaturi smo naleteli na dve raziskavi, pri katerih so poleg drugih vzorcev analizirali tudi brise različnih površin. V Angliji so v klavnici, predelavi in v mesnici odvzeli brise rok delavcev, brise orodij (kavljev, nožev, mesoreznic), tal in delovnih površin. V brisih, odvzetih v klavnici, so potrdili RNA HEV pri enem od štirih brisov rok (25 %). V predelavi so od desetih brisov, odvzetih na različnih površinah in orodjih, RNA HEV potrdili na konici kavlja za obešanje trupov. V mesnici pa so RNA HEV potrdili v dveh od osmih brisov (25 %), odvzetih na nožih in mesoreznici (Berto in sod., 2012a). Pri preiskavi, v katero so bile vključene Češka, Španija in Italija, so prav tako poleg drugih vzorcev pregledovali brise

površin in rok v klavnici, v predelavi in na koncu verige, pri prodaji. Povsod so potrdili tako pozitivne brise rok kot tudi brise površin, največji delež v klavnici (60 %), manjši v predelavi (20 % oziroma 30 %) in najmanj RNA HEV pozitivnih vzorcev pri prodaji (10 %) (Di Bartolo in sod., 2010).

Med dostopno strokovno literaturo najdemo veliko raziskav tudi o ugotavljanju HEV v izdelkih, ki vsebujejo meso ali jetra prašičev. V švicarski raziskavi so med klobasami, ki vsebujejo jetra in se sušijo na zraku (*mortadella di fegato*), našli 11,8 % pozitivnih od 102 vzorcev (Gannini in sod., 2018), med 90 vzorci jetrnih klobas in suhih salam pa 18,9 % oziroma 5,7 % pozitivnih na RNA HEV (Moor in sod., 2018). Na Nizozemskem so analizirali vzorce 316 različnih mesnih izdelkov (cervelaat, salami, metworst, snijworst, chorizo in sušene salame) in našli 14,6 % pozitivnih (Boxman in sod., 2020). Prav tako so v drugi Nizozemski raziskavi med 99 vzorci jetrnih klobas potrdili 70,7 % pozitivnih, od 106 vzorcev jetrnih paštet pa 68,9 % pozitivnih (Boxman in sod., 2019). V Nemčiji so pregledali 131 mesnih izdelkov in ugotovili 13 % pozitivnih vzorcev jetrnih klobas in 15 % pozitivnih vzorcev jetrnih paštet (Pallerla in sod., 2021), v drugi raziskavi pa 20 % pozitivnih vzorcev suhih salam in 22 % pozitivnih vzorcev jetrnih klobas (Szabo in sod., 2015). V Španiji so med zakolom odvzeli tudi vzorce različnih mišic, RNA HEV pa so potrdili le v vzorcu diafragme (García in sod., 2017). V Italiji in na Češkem pozitivnih vzorcev mesa in salam niso potrdili, medtem ko je bilo v Španiji pozitivnih 6 % vzorcev (Di Bartolo in sod., 2010). V Angliji so v raziskavi našli 10 % pozitivnih vzorcev salam (Berto in sod., 2012a).

Pri načrtovanju naše raziskave smo se odločili, da bomo vzorčili tudi mleto meso in pečenice. V zasnovi raziskave nismo mogli vedeti, da bomo med vzorci pitancev (katerih meso se uporablja za nadaljnjo predelavo) našli le eno pozitivno žival, saj smo se ozirali na podobne študije in rezultate iz drugih držav, ki so nakazovale višjo prevalenco pozitivnih vzorcev na RNA HEV v tej starostni skupini. Opravljene analize, s katerimi smo dokazali majhen delež okužb pri pitancih, posledično pojasnijo odsotnost RNA HEV v vzorcih mletega mesa in pečenic.

Na pobudo Inštituta za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete se je v letu 2018 izvajal tudi redni nacionalni monitoring na prisotnost HEV v svinjskem mesu in izdelkih iz svinjskega mesa. V sklopu monitoringa smo pregledali 150 vzorcev; sveže meso, mleto meso, mesni pripravki, suhe salame, tlačanka in zaseka, vendar pozitivnega vzorca na RNA HEV

nismo našli. Ena od mogočih razlag, poleg prej ugotovljene nizke prevalence med pitanci, ki predstavljajo večino zaklanih živali, je tudi primernost metode odkrivanja RNA HEV. Literatura namreč navaja, da je izolacija virusne RNA v pripravkih, v katerih se poleg mesa ali jeter uporabljajo tudi druge sestavine, predvsem maščoba, precej težavna. Večje koščke maščobe je zato pred izolacijo nukleinske kisline vedno treba ročno odstraniti iz vzorca. Pri postopku izolacije se je za najbolj kritičen korak izkazala ravno homogenizacija vzorca. Pri tem je najboljše rezultate mogoče doseči z mehansko homogenizacijo (na primer FastPrep homogenizator). Pomembno je k boljši izolaciji prispevala tudi uporaba trizola in kloroforma (Hennechart-Collette in sod., 2019; Althof in sod., 2019). V naši raziskavi smo pri izolaciji uporabljali homogenizacijo s sterilnimi nožki (IKA Ultra Turrax), vzorcu smo dodajali transportni medij RPMI. Testirali smo tudi uporabo trizola in kloroforma, vendar pri rezultatih izolacije nukleinske kisline nismo zaznali bistvenih sprememb.

Prašiče, katerih vzorce smo odvzeli v klavnici, so v zakol pripeljali iz 81 različnih rej. Pri 19 rejah smo zabeležili uvoz iz Nemčije, Slovaške, Nizozemske in Avstrije. V raziskavo smo vključili odojke iz 26 rej, RNA HEV pozitivne prašiče smo potrdili pri 38,46 % rej. Le v eni od pozitivnih rej smo potrdili dva različna podtipa virusa, pri drugih smo našli en sev HEV. V rejah, iz katerih so bili živalim v klavnici večkrat v časovno zaporednih intervalih odvzeti vzorci, smo v vseh primerih ugotovili isti sev virusa, kar potrjuje, da HEV v rejah ostaja več mesecev. Ob tem je sicer treba upoštevati, da ni šlo za daljše obdobje vzorčenja, temveč največ za obdobje treh mesecev.

Od 125 na HEV pozitivnih vzorcev blata, jeter in žolča smo izbrali 45 vzorcev z najnižjo vrednostjo Ct ter jih sekvencirali v regijah ORF 1 in ORF 2. Ob postavitvi hipotez smo sklepali, da bo raznolikost sevov velika in da bomo med pozitivnimi vzorci potrdili tudi genotip 4 (ki se je v zadnjih letih začel pojavljati v Evropi), saj se z uvozom prašičev iz drugih evropskih držav v naše reje že več let vnašajo novi sevi HEV. V Sloveniji se v klavnicah letno zakolje blizu 300.000 prašičev, od tega se jih vsako leto iz drugih držav uvozi od 70.000 do 80.000, kar predstavlja kar četrtno zakola v klavnicah. Zunanji priliv živih prašičev je torej velik in zato je tudi možnost vnosa novih sevov velika. Z uvozom živih prašičev v državo, se novi sevi ob vhlevitvi tujih živali lahko vnesejo v rejo. Če so uvožene živali namenjene takojšnjemu zakolu, lahko novi sevi prek klavne linije ter predelave svinjskega mesa in organov s kontaminiranimi izdelki iz svinjine okužijo potrošnika.

S pomočjo filogenetskih primerjav, v katere smo vključili 45 na HEV pozitivnih vzorcev iz slovenskih klavnic in 47 sevov iz genske banke, smo vse slovenske vzorce, pozitivne na HEV, razporedili v genotip 3, znotraj pa v štiri podtipe. Največjo skupino tvori podtip 3a (42 sevov iz klavnice), preostali trije sevi spadajo v podtipe 3b, 3e in 3f.

Genotipizacija vzorcev, pozitivnih na HEV (tako živalskih kot humanih) v drugih evropskih državah je pokazala, da se je stanje v zadnjih letih malce spremenilo; podtip 3g je spodrnil podtip 3c. Od leta 2015 so najbolj razširjeni podtipi, ki krožijo med prašiči in ljudmi, podtipi 3c, 3f in 3e (Adlhoch in sod., 2016).

V Nemčiji so leta 2020 med vzorci jeter in mesnih izdelkov, pozitivnih na HEV, ugotovili, da prevladuje podtip 3c. Pri enem vzorcu so našli podtip 3f, katerega nukleotidno zaporedje je bilo najbližje belgijskim vzorcem, zavedenim v genetski banki (Pallerla in sod., 2021). Nekaj let pred tem so v mesnih izdelkih prav tako našli podtipa 3c, 3f in tudi podtip 3i (Szabo in sod., 2015).

Na Nizozemskem so leta 2009 iz blata prašičev izolirali RNA HEV in poleg podtipov 3a, 3c in 3f, za katere so že iz prejšnjih raziskav vedeli, da se pojavljajo v državi, našli tudi podtip 3e (Rutjes in sod., 2014). V novejši raziskavi iz leta 2020, v kateri so pregledovali mesne izdelke iz svinjskega mesa, so ugotovili le podtip 3c (Boxman in sod., 2020).

Članek iz leta 2018 opisuje raziskavo iz francoskih klavnic, v kateri so med vzorci jeter ugotovili podtipe 3c, 3e, 3f in prvič v Franciji tudi podtip 3j (Feurer in sod., 2018).

V Španiji v vzorcih blata in jeter iz klavnice navajajo pojav podtipa 3f (García in sod., 2017).

Zbrane informacije o okužbi s HEV med ljudmi v Bolgariji so razkrile pojav podtipov 3e, 3f, 3c in 3i (Baymakova in sod., 2019).

Med raziskovanjem literature o stanju v sosednjih državah smo našli relevantne informacije le o Italiji, Hrvaški, tudi o Madžarski, vendar pa so podatki nekoliko starejši (iz leta 2010). Sekvence iz italijanske raziskave (de Sabato in sod., 2018) smo vključili v naše filogenetsko drevo (Slika 23), hrvaške in madžarske sekvence pa so bile žal prekratke in jih zato nismo mogli primerjati z našimi.

V Italiji so med divjimi prašiči potrdili podtipa 3c in 3f (de Sabato in sod., 2018), med domačimi prašiči ob zakolu v klavnicah pa podtip 3c (Chelli in sod., 2021).

Obširnejša raziskava na Hrvaškem, v kateri so zajeli serumske vzorce ljudi, ter feces in kri domačih prašičev kot tudi kri divjih prašičev, je razkrila štiri podtipe. Najpogosteje sta se pojavljala podtipa 3a (pri ljudeh, domačih in divjih prašičih) in 3c (pri ljudeh in domačih prašičih). Redkeje sta se pojavljala podtipa 3e (pri ljudeh, domačih in divjih prašičih) in 3f (samo pri ljudeh), zato so sklepali, da gre za na novo vnesene okužbe v državo (Jemersić in sod., 2019).

Na Madžarskem so med vzorci blata in jeter domačih in divjih prašičev ugotovili podtip 3a, kamor se je uvrščala večina vzorcev, drugi pa v podtipa 3e in 3h (Forgách in sod., 2010).

O razmerah v Avstriji je znano zelo malo. Edini podatki v dostopni literaturi zajemajo manjše število vzorcev humanega seruma (kri za transfuzijo), v katerih so določili podtip 3f (Fischer in sod., 2015).

Glede na razmere v drugih evropskih državah nas v osnovi naši rezultati niso presenetili. Podtipa 3e in 3f se pojavljata po vsej Evropi. Naš vzorec, ki smo ga uvrstili v podtip 3e, se je v regiji ORF 1 najbolj ujema s serumskim vzorcem divjega prašiča iz Nemčije s številko vnosa JQ807514, v regiji ORF 2 pa z vzorcem blata domačega prašiča iz Italije s številko vnosa KJ174068. Pri obeh primerih smo ugotovili visoko ujemanje nukleotidnih zaporedij (95 % in več). Vzorec, ki smo ga uvrstili v podtip 3f, se je v regiji ORF 1 najbolj ujema s humanimi vzorci iz Singapurja, Danske in Francije, v regiji ORF 2 pa s prašičjim vzorcem iz Švedske in Poljske ter humanim vzorcem iz Francije. Pri teh vzorcih je šlo za nekoliko manjše ujemanje nukleotidnih zaporedij (92 %). V naši raziskavi smo v podtipa 3e in 3f uvrstili po en vzorec, kar kaže na to, da najverjetneje podtipa 3e in 3f po državi še nista močno razširjena, morda gre za novejši vnos teh sevov z okuženimi prašiči ob uvozu. Podtip 3a (v katerega je spadala večina naših vzorcev) sicer ni tako razširjen po Evropi, je pa med najpogosteje ugotovljenimi podtipi v naših sosednjih državah, na Hrvaškem in Madžarskem. Reprezentativni vzorec iz skupine podtipa 3a (4 SLO-18-F) se je v regiji ORF 1 najbolj ujema z vzorcem jeter divjega prašiča iz Madžarske (EU718647), v regiji ORF 2 pa z vzorcem rektalnega brisa prašiča iz Slovaške (MT408280). V obeh primerih je bilo ujemanje nukleotidnih zaporedij 95 %. Presenetil pa nas je rezultat vzorca 8 SLO-13-B, ki smo ga na podlagi filogenetskega drevesa in primerjave z referenčnimi vzorci uvrstili v podtip 3b. Ta je bil prvič (in edinkrat) opisan pri divjih prašičih v Evropi (vzorci krvi divjih prašičev z južne obale Baltika) leta 2015 (Vina-Rodriguez in sod., 2015), znan je tudi en humani izolat

okuženega pacienta iz Francije (Legrand-Abrevanel in sod., 2009). Drugače gre za podtip, ki je značilen za Japonsko (Nakano in sod., 2012), pojavlja pa se tudi v Braziliji (Lopes Dos Santos in sod., 2010). Primerjava našega vzorca z nukleotidnimi zaporedji v genski banki je v regiji ORF 1 pokazala 92-odstotno ujemanje z vzorcem krvi krvodajalca iz Japonske (AB630971), v regiji ORF 2 pa z vzorcem prašičjega seruma iz Japonske (AB194500). V obeh primerih je šlo za manjše ujemanje nukleotidnih zaporedij, 91 %. V enakem odstotku so se nukleotidna zaporedja našega vzorca ujemala z vzorcem žolča prašiča iz Hrvaške (HQ591364), kar bi morda lahko pojasnilo izvor in pojav tega podtipa pri nas, čeprav se načeloma pojavlja na Japonskem.

Z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so nam posredovali pet humanih izolatov, pozitivnih na prisotnost RNA HEV. Vsi vzorci so bili šibko pozitivni na RNA HEV z metodo RT-PCR v realnem času. Humanim vzorcem smo poskušali določiti nukleotidno zaporedje, vendar nam zaradi majhne količine virusne RNA HEV pri nobenem humanem vzorcu to ni uspelo. Zato nam tudi ni uspelo narediti primerjave nukleotidnih zaporedij humanih vzorcev z našimi prašičjimi vzorci, s čimer bi pridobili dodaten vpogled v razmere v Sloveniji, predvsem v smislu potrditve domnev, da se HEV lahko prenaša med prašiči in človekom prek prehranske verige. Posledično težko razpravljamo o tem, ali se v Sloveniji enaki sevi pojavljajo pri prašičih in ljudeh in ali je vzrok za pojav okužb s HEV pri ljudeh zoonotski prenos. Možnost za okužbo človeka prek hrane obstaja, to smo namreč dokazali s potrditvijo pozitivnih vzorcev ob zakolu prašičev, vendar bi dokaz podobnih sevov pri prašičih in ljudeh to domnevo dodatno potrdil.

Leta 2019 je bila na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino izvedena študija o prisotnosti okužbe s HEV med slovenskimi krvodajalci (Primc, 2020). Dokazovali so tako virusno RNA kot tudi prisotnost protiteles IgG. Med 8817 krvodajalci so pri petih potrdili prisotnost virusne RNA v krvi. Pri treh so dokazali podtip 3a, pri enem podtip 3f, kar sovпада tudi z našimi rezultati genotipizacije prašičjih vzorcev. Iz teh podatkov lahko z določeno verjetnostjo sklepamo, da med ljudmi in prašiči krožijo nekateri enaki sevi HEV (Štukelj in sod., 2019).

6 SKLEPI

Na podlagi zastavljenih hipotez so naši zaključki naslednji:

1. Z dvema komercialno dostopnima encimsko imunskima testoma (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom) smo na prisotnost protiteles proti HEV pregledali 710 serumskih vzorcev prašičev. Iz serije vzorcev, ki so bili odvzeti na območju Slovenije v sklopu rednega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014, smo naključno izbrali 351 vzorcev, 359 vzorcev pa smo odvzeli ob zakolu prašičev v klavnicah. Med 351 naključno izbranimi vzorci iz monitoringa smo potrdili 94 (26,78 %) pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), 184 (52,42 %) negativnih rezultatov (negativni z obema encimskoimunskima testoma), pri 73 (20,80 %) vzorcih se rezultati niso ujemali. Med 271 vzorci iz klavnice smo potrdili 125 (46,13 %) pozitivnih rezultatov (pozitivni z obema encimskoimunskima testoma), 103 (38,01 %) negativne rezultate (negativni z obema encimskoimunskima testoma), pri 38 (14,02 %) vzorcih se rezultati niso ujemali. Statistična primerjava rezultatov obeh encimskoimunskih testov vsake posamezne skupine je pokazala, da so rezultati testov močno statistično značilno povezani. Zastavljeno hipotezo, da dva komercialna testa ELISA za dokazovanje protiteles proti HEV v serumu prašičev dajeta primerljive rezultate, smo potrdili.
2. Z metodo RT-PCR v realnem času smo na prisotnost HEV pregledali 811 prašičev. Pri vsakem prašiču na klavni liniji smo odvzeli tri vrste vzorcev: blato, jetra in žolč ter 63 vzorcev brisov površin (brisi kavljev, na katere se obešajo notranji organi po eksenteraciji, brisi zabojnikov, v katere se shranjujejo jetra prašičev po veterinarskem pregledu ter brisi kavljev, na katere so obešeni trupi prašičev v hladilnici), 22 vzorcev mletega mesa in 30 vzorcev pečenic. RNA HEV smo ugotovili v 44 vzorcih blata, 40 vzorcih jeter, 43 vzorcih žolča in pri dveh brisih površin (pozitiven bris zabojnika z jetri in pozitiven bris kavlja na liniji). V nobenem od odvzetih 22 vzorcev mletega mesa in 30 vzorcev pečenic nismo ugotovili prisotnosti RNA HEV. Največ na HEV pozitivnih živali smo odkrili med odojki, in sicer 17,39 % (56) od 322 testiranih odojkov. V tej

starostni skupini smo namreč ugotovili 42 (13,04 %) pozitivnih vzorcev blata, 39 (12,11 %) pozitivnih vzorcev jeter in 40 (12,42 %) pozitivnih vzorcev žolča. V starostni skupini pitancev smo našli samo eno (0,25 %) pozitivno žival, pri kateri smo ugotovili pozitiven vzorec jeter in pozitiven vzorec žolča. S temi rezultati smo potrdili hipotezo, da je nukleinska kislina HEV prisotna v različnih vzorcih na klavni liniji ob zakolu prašičev.

3. Med 125 ugotovljenimi pozitivnimi vzorci na HEV z metodo RT-PCR v realnem času smo izbrali 45 vzorcev in jim določili 366 nt (ORF 1) oziroma 300 nt (ORF 2) dolga nukleotidna zaporedja. S pomočjo filogenetskih primerjav smo ugotovili, da vsi naši sevi spadajo v genotip 3 in se razvrščajo v štiri podtipe: 3a, 3b, 3e in 3f. Genotipa 4 nismo ugotovili. Z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo prejeli pet humanih vzorcev serumov, pozitivnih na prisotnost HEV, pri katerih nam zaradi premajhne količine virusne RNA HEV ni uspelo določiti nukleotidnega zaporedja, zato nam primerjave prašičjih in humanih sevov v tej raziskavi ni uspelo izvesti. V pomoč pri razlagi naših rezultatov in ugotavljanju sorodnosti sevov HEV, ki se pojavljajo pri prašičih in ljudeh v Sloveniji, so nam bili podatki o dokazanih podtipih 3a in 3f (študija o prisotnosti okužbe s HEV med slovenskimi krvodajalci na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino). S temi rezultati smo hipotezo, da virusi HEV v Sloveniji spadajo v genotipa 3 in 4 ter da se isti sevi pojavljajo pri prašičih in človeku, delno potrdili.

7 POVZETEK

V prvem delu izvedene raziskave smo v serumskih vzorcih ugotavljali prisotnost protiteles proti HEV. Poleg 351 serumskih vzorcev prašičev, odvzetih ob zakolu leta 2014, smo pregledali še 359 serumskih vzorcev, naključno izbranih iz vzorcev rednega monitoringa kužnih bolezni pri prašičih v letih 2013 in 2014. Prašiči za zakol so največkrat izhajali iz rej podravske in prekmurske regije, medtem ko so bili vzorci iz monitoringa bolj enakomerno porazdeljeni po vsej Sloveniji. Serumske vzorce smo testirali z dvema encimskoimunskima testoma (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species proizvajalca IDvet in HEV IgG ELISA porcine proizvajalca Axiom), vzorce, odvzete ob zakolu v klavnici, smo dodatno preverili še z modificirano metodo imunoblot. Med vzorci prašičev ob prihodu v zakol smo v starostni skupini odojkov potrdili 26 % pozitivnih vzorcev, v starostni skupini pitancev 65 % in v starostni skupini plemenskih svinj kar 90 % pozitivnih vzorcev. Med vzorci iz monitoringa smo pri mlajših od šest mesecev potrdili 12 % (IDvet) oziroma 8 % (Axiom) pozitivnih vzorcev, pri starosti od šest do dvanajst mesecev 51,35 % (IDvet) oziroma 40,54 % (Axiom) pri starejših od dvanajst mesecev pa 46,56 % (IDvet) oziroma 24,34 % (Axiom). Razliko v rezultatih med skupinama vzorcev (klavnica in monitoring) smo pripisali različnemu številu živali v posameznih starostnih skupinah in različnemu številu rej od koder so izvirali vzorci (pri vzorcih iz monitoringa je šlo za večje število rej kot pri vzorcih iz klavnice).

V drugem delu smo vzorce blata, jeter, žolča, mletega mesa, pečenic in brisov površin, ki smo jih odvzeli v štirih slovenskih klavnicah leta 2014, z metodo RT-PCR v realnem času preiskali na prisotnost RNA HEV. Testirali smo vzorce 322 odojkov, 400 pitancev in 89 plemenskih svinj. Od 322 pregledanih odojkov smo HEV dokazali pri 56 (17,39 %) prašičih, natančneje v 42 (13,94 %) vzorcih blata, 39 (12,11 %) vzorcih jeter in 40 (12,42 %) vzorcih žolča. V skupini pitancev smo našli samo eno pozitivno žival, pri kateri smo ugotovili pozitiven vzorec jeter in vzorec žolča. Med plemenskimi svinjami nismo našli pozitivne živali na HEV. Med 63 brisi površin smo našli dva (3,18 %) pozitivna brisa, en bris kavljev, na katere se obešajo notranji organi prašičev po veterinarskem pregledu in en bris zabojnika, v katerem se zbirajo jetra prašičev po veterinarskem pregledu. Med vzorci mletega mesa in pečenic nismo našli pozitivnega vzorca, treba pa je poudariti, da se pri njihovi pripravi uporablja le meso pitancev, ne pa tudi odojkov, ki se je izkazala za najbolj tvegano starostno skupino, v kateri smo ugotovili prisotnost HEV. Najdba različnih vrst pozitivnih vzorcev je

potrdila naš sum, da klinično zdravi prašiči vnašajo HEV v klavnico in so lahko potencialno nevarni za potrošnika in delavce v obratu.

V tretjem delu raziskave smo med 125 pozitivnimi vzorci prašičev iz klavnice izbrali 45 tistih z največjo količino virusne RNA (z najnižjo vrednostjo Ct), jim določili nukleotidno zaporedje in jih primerjali z nukleotidnimi zaporedji referenčnih sevov vsakega posameznega genotipa v genski banki. Na podlagi filogenetske primerjave v ORF 1 (366 nt) in ORF 2 (300 nt) smo slovenske seve uvrstili v štiri podtipe: 3a (42 vzorcev), 3b (en vzorec), 3e (en vzorec) in 3f (en vzorec). Z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so nam posredovali pet humanih vzorcev seruma, pozitivnih na HEV, vendar nam zaradi premajhne količine nukleinske kisline HEV v njih ni uspelo določiti nukleotidnega zaporedja. Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino izvedena študija o prisotnosti okužbe s HEV med slovenskimi krvodajalci je pokazala prisotnost podtipov 3a in 3f, kar sovpada z ugotovitvami naše študije. V sosednjih državah prevladujejo podtipi 3a, 3e, 3f, ponekod tudi 3c. Pri analiziranju rezultatov nas je najbolj presenetil podtip 3b, ki je značilen za Japonsko, nekajkrat pa so ga že potrdili tudi v posameznih evropskih državah, med drugim v sosednji Hrvaški.

Prednost izvedene raziskave je v sistematični izvedbi vzorčenja v klavnici, ki je vključevalo veliko število in različne vrste vzorcev. Z rezultati smo razjasnili do sedaj nepoznane razmere glede okužb s HEV pri prašičih ob vstopu v klavnice v Sloveniji in podali natančnejše podatke o prekuženosti v slovenskih rejah v določenem obdobju.

8 SUMMARY

In the first part of our research we used two ELISA tests to assess the presence of HEV antibodies in porcine blood samples. We analyzed 351 serum samples collected from pigs at slaughter and 359 serum samples randomly selected from samples of annual monitoring for infectious pig diseases in 2013 and 2014. Pigs at slaughter came mostly from podravska and pomurska regions, while samples from monitoring were more evenly distributed throughout the country. Serum samples were tested with two ELISA tests (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet) in HEV IgG ELISA porcine (Axiom)). Serum samples from pigs at slaughter showed 26% positive samples in the age group of 3 month old pigs, 65% positive samples in the age group of 6 months old pigs and 90% positive samples in pigs 1 year and older. Samples from monitoring showed 10% positive samples in pigs up to 6 months old, 45% positive samples in pigs from 6 to 12 months old and 47% (IDvet) or 24% (Axiom) in pigs older than 1 year. We assumed that the difference between both groups of samples was a consequence of the different number of animals in each age group and the uneven distribution of pig farms.

In the second part of our research feces, liver, bile samples, surface swabs, samples of minced meat and sausages that were collected in four Slovenian slaughterhouses in 2014 were analyzed with real time RT-PCR for the presence of HEV RNA. We analyzed 322 pigs that were 3 months old, 400 pigs that were 6 months old and 89 pigs older than 1 year. Out of 322 3 month old pigs, HEV RNA was present in 56 pigs, that is in 42 feces samples, 39 liver samples and 40 bile samples. In the group of 6 month old pigs we found only 1 pig positive for the presence of HEV RNA (one liver and one bile sample) and none in the group older than 1 year. Out of 63 surface swab samples, 2 were found positive for the presence of HEV RNA (a hook where internal organs are hung after evisceration and a metal container where livers are stored after post mortem inspection). There were no positive samples found in minced meat and sausages, but it should be emphasized that only meat from 6 month old pigs is used in the production of these. 3 month old pigs, that seem to be, on the basis of our results, the age group with the highest risk of harboring an HEV infection, were not used in the production of swine meat products. However, the fact that different positive samples were found during slaughter, confirmed our suspicion that HEV positive pigs do in fact enter into the slaughterhouse and thus present a potential risk for slaughterhouse personnel and consumers.

In the third part of our research 45 positive samples obtained from slaughterhouses were selected and two regions of the viral genome, ORF 1 and ORF 2, were amplified. A phylogenetic comparison of the selected samples with nucleotide sequences obtained from GeneBank allowed classification of the obtained samples into four subtypes of genotype 3: 3a (42 samples), 3b (1 sample), 3e (1 sample) and 3f (1 sample). We obtained 5 HEV positive human samples from the Institute for microbiology and immunology of Medical faculty of University of Ljubljana, however, the amount of viral RNA was insufficient for efficient sequencing and we were therefore not able to compare sequences to those found in analyzed porcine samples. Interestingly, research conducted on serum samples of Slovenian blood donors showed the presence of subtypes 3a and 3f in selected blood samples, which is in concordance with our results. In our neighboring countries the prevalent subtypes are 3a, 3e, 3f, in some parts even 3c. We were surprised to find the subtype 3b, which is typical for Japan, although it has been found a few times in Europe, even in neighboring Croatia.

We believe that systematical and broad sampling of porcine samples has helped to clarify the status of HEV infection of pigs entering slaughterhouses, which has not been systemically addressed to date, and also the serological situation regarding HEV in pig farms in Slovenia in general.

9 ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Andreju Kirbišu za vso pomoč, da je verjel vame tudi takrat, ko sama nisem, kot tudi somentorju izr. prof. dr. Ivanu Toplaku za vso strokovno pomoč, usmerjanje in čas, ki si ga je vzel zame, kadarkoli sem ga potrebovala.

Članom komisije izr. prof. dr. Kseniji Šinigoj Gačnik, prof. dr. Tadeju Malovrhu in prof. dr. Mariu Poljaku se zahvaljujem za podroben pregled doktorske naloge ter vso konstruktivno kritiko zaradi katere je naloga postala boljša.

Zahvaljujem se vsem mojim sodelavcem, ki so me poslušali, ko mi je bilo že vsega dovolj, me spodbujali in prevzeli moje delo v laboratoriju, da sem lahko v miru sedela za računalnikom.

Manja, tebi posebna zahvala za pomoč pri vzorčenju, zbiranju slikovnega materiala in klavniške debate, ki jih le redki razumejo.

Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem cimri Tanji Knific.

Na tem mestu bi omenila še mojo drugo cimro Urško Henigman, hvala da si me poslušala in poslušala in bodrila.

Za vso nepogrešljivo pomoč pri zbiranju vzorcev v klavnicah se iz srca zahvaljujem kolegu Zoranu Žlabravcu, ki se je kljub temu, da je vedel, da bo moral dneve začeti zelo zgodaj, odločil pomagati.

Za pomoč pri zbiranju vzorcev se zahvaljujem tudi vsem uradnim veterinarjem ter preostalim delavcem v klavnicah.

Hvala puncam iz virologije, Danijeli, Nataliji in Poloni, za vso pomoč v podtlaku, kadar se mi je kaj zataknilo in nisem vedela kako naprej.

Hvala Biljani Grubšič in dr. Mateji Stvarnik za vse odgovore na moja neskončna vprašanja, za opominjanje na roke in pomoč pri lovljenju le teh. Mateja, letos na Loparju nazdravimo name!

Za hiter pregled literature in vse napotke se zahvaljujem mag. Giti Grecs-Smole, za lektoriranje Saši Kozarov.

Za to, da sem danes kjer sem, se zahvaljujem mojima staršema, ki sta me vedno spodbujala, da se potrudim in naredim največ kar lahko. Kljub temu, da je trajalo nekoliko dlje kot je bilo sprva načrtovano, mi je uspelo. Ati, hvala za vso tvojo pomoč. Mami, želim si, da bi bila tukaj z nami.

Hvala tudi vsem ostalim članom moje družine, mojim navijačem, Sari, Tjašu, Mariji, mami.

Za vso ljubezen, podporo, animiranje otrok, medtem ko sem pisala oziroma včasih samo poskušala pisati, za vse izrečene in neizrečene besede ob pravih trenutkih, se zahvaljujem mojemu čudovitemu možu. Mojima hčerkama, Emi in Tinkari, hvala za vso brezpogojno ljubezen, ki mi vedno polepša še tako sive dni. Življenje se včasih obrne v nepričakovano smer. Brez vas treh tega doktorata gotovo ne bi zaključila.

10 LITERATURA

1. Adlhoch C, Avellon A, Baylis SA et al. Hepatitis E virus: assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J Clin Virol* 2016; 82: 9–16.
2. Althof N, Trojnar E, Böhm T, et al. Interlaboratory validation of a method for hepatitis E virus RNA detection in meat and meat products. *Food Environ Virol* 2019; 11(1): 1–8. doi: 10.1007/s12560-018-9360-6
3. Andraud M, Dumarest M, Cariolet R, et al. Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet Res* 2013; 44(1): e102. doi: 10.1186/1297-9716-44-102
4. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72: 4–15.
5. Baechlein C, Schielke A, Johne R, Ulrich RG, Baumgaertner W, Grummer B. Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* 2010; 144(1/2): 187–91.
6. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003; 226: 3–6. doi: 10.1385/1-59259-384-4:3.
7. Baymakova M, Popov GT, Pepovich R, Tsachev I. Hepatitis E virus infection in Bulgaria: a brief analysis of the situation in the country. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7(3): 458–60.
8. Berto A, Backer JA, Mesquita JR, et al. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* 2012; 5: e190. doi: 10.1186/1756-0500-5-190
9. Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2012a; 18(8): 1358–60.
10. Bouwknegt M, Teunis PF, Frankena K, de Jong MC, de Roda Husman AM. Estimation of the likelihood of fecal-oral HEV transmission among pigs. *Risk Anal* 2011; 31(6): 940–50.
11. Boxman ILA, Jansen CCC, Hägele G, Zwartkruis-Nahuis A, Tijmsa ASL, Vennema H. Monitoring of pork liver and meat products on the Dutch market for the presence of HEV RNA. *Int J Food Microbiol* 2019; 296: 58–64.
12. Boxman ILA, Jansen CCC, Zwartkruis-Nahuis AJT, Hägele G, Sosef NP, Dirks RAM. Detection and quantification of hepatitis E virus RNA in ready to eat raw pork sausages

- in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2020; 333: e108791. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108791
13. Breum SØ, Hjulsager CK, de Deus N, Segalés J, Larsen LE. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population. *Vet Microbiol* 2010; 146(1/2): 144–9.
 14. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 2008; 33(4): 451–64.
 15. Chelli E, Suffredini E, De Santis P, et al. Hepatitis E virus occurrence in pigs slaughtered in Italy. *Animals (Basel)* 2021; 11(2): e277. doi: 10.3390/ani11020277.
 16. Clemente-Casares P, Ramos-Romero C, Ramirez-Gonzalez E, Mas A. Hepatitis E virus in industrialized countries: the silent threat. *Biomed Res Int* 2016; 2016: e9838041. doi: 10.1155/2016/9838041
 17. Colson P, Romanet P, Moal V, et al. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1361–4.
 18. Cook N, van der Poel WH. Survival and elimination of hepatitis E virus: a review. *Food Environ Virol* 2015; 7(3): 189–94.
 19. Cossaboom CM, Córdoba L, Sanford BJ, et al. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol* 2012; 93(Pt 8): 1687–95.
 20. Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(12): 2085–7.
 21. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(11): 698–709.
 22. de Deus N, Casas M, Peralta B, et al. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 2008; 132(1/2): 19–28. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.036.
 23. De Sabato L, Ostanello F, De Grossi L, et al. Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(6): 1749–56.
 24. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, et al. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1282–9.
 25. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses* 2016; 8(10): 270. doi: 10.3390/v8100270

26. Donnelly MC, Scobie L, Crossan CL, Dalton H, Hayes PC, Simpson KJ. Review article: hepatitis E—a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 46(2): 126–41.
27. dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* 2011; 149(1/2): 236–41.
28. Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J Med Virol* 2008; 80(8): 1379–86.
29. Ferri G, Vergara A. Hepatitis E virus in the food of animal origin: a review. *Foodborne Pathog Dis* 2021; 18(6): 368–77.
30. Feurer C, Le Roux A, Rossel R, et al. High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 2018; 264: 25–30.
31. Fischer C, Hofmann M, Danzer M, Hofer K, Kaar J, Gabriel C. Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria. *PLoS One* 2015; 10(3): e0119576. doi: 10.1371/journal.pone.0119576
32. Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, et al. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet Microbiol* 2010; 143(2/4): 106–16.
33. Gao S, Li D, Zha E, Zhou T, Wang S, Yue X. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(2): 2026–36.
34. Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, et al. Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(1): 110–4.
35. García N, Hernández M, Gutierrez-Boada M, et al. Occurrence of hepatitis E virus in pigs and pork cuts and organs at the time of slaughter, Spain, 2017. *Front Microbiol* 2020; 10: e2990. doi: 10.3389/fmicb.2019.02990
36. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(7): 935–9.
37. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 2013; 133(3): 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.

38. Geng Y, Wang Y. Epidemiology of hepatitis E. *Adv Exp Med Biol* 2016a; 948: 39–59. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_3
39. Geng Y, Wang Y. Transmission of hepatitis E virus. *Adv Exp Med Biol* 2016; 948: 89–112. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_6
40. Giannini P, Jermini M, Leggeri L, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Detection of hepatitis E virus RNA in raw cured sausages and raw cured sausages containing pig liver at retail stores in Switzerland. *J Food Prot* 2018; 81(1): 43–5.
41. Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 2011; 6(8): e22673. doi: 10.1371/journal.pone.0022673.
42. Hennechart-Collette C, Fraisse A, Guillier L, Perelle S, Martin-Latil S. Evaluation of methods for elution of HEV particles in naturally contaminated sausage, figatellu and pig liver. *Food Microbiol* 2019; 84: e103235. doi: 10.1016/j.fm.2019.05.019
43. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1326–32.
44. Jackova A, Dudasova K, Salamunova S, Mandelik R, Novotny J, Vilcek S. Identification and genetic diversity of hepatitis E virus in domestic swine from Slovakia. *BMC Vet Res* 2021; 17(1): e232. doi: 10.1186/s12917-021-02936-4
45. Jamnikar Ciglencečki U, Mankoč Ramuš S, Barlič Maganja D. Detection of hepatitis E virus in Slovenian pig herds. *Int J Infect Dis* 2008; 12(1): 138–9.
46. Jemeršić L, Prpić J, Brnić D, Keros T, Pandak N, Đaković Rode O. Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): e269. doi: 10.1186/s12879-019-3906-6
47. Jiménez de Oya N, de Blas I, Blázquez AB et al. Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. *BMC Res Notes* 2011; 4: e412. doi: 10.1186/1756-0500-4-412
48. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2006; 131(1): 65–71.

49. Kamar N, Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus: chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39(1): 20–7.
50. Kamar N, Izopet J, Pavio N, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: e17086. doi: 10.1038/nrdp.2017.86
51. Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5047–52.
52. Kenney SP. The current host range of hepatitis E viruses. *Viruses* 2019; 11(5): e452. doi: 10.3390/v11050452.
53. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Hepatitis E: discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol* 2016; 22(31): 7030–45.
54. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16(2): 111–20.
55. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8: e108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.
56. Krog JS, Larsen LE, Breum SØ. Tracing hepatitis E virus in pigs from birth to slaughter. *Front Vet Sci* 2019; 6: e50. doi: 10.3389/fvets.2019.00050.
57. Krumbholz A, Joel S, Neubert A, et al. Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2013; 167(3/4): 394–402.
58. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis* 2013; 17(4): e228–33. doi: 10.1016/j.ijid.2012.11.026
59. Kureljušić B, Savić B, Jezdimirović N, et al. Seroprevalence of hepatitis E in pigs and wild boars in the region of the city Belgrade. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14(6): 669–73.
60. Kwo PY, Schlauder GG, Carpenter HA, et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 1997; 72(12): 1133–6.
61. Leblanc D, Poitras E, Gagné MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol* 2010; 139(3): 206–9.

62. Legrand-Abravanel F, Mansuy J, Dubois M, et al. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(1): 110–4.
63. Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12): 1958–60.
64. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol* 2010; 47(3): 276–9.
65. Martinelli N, Luppi A, Cordioli P, Lombardi G, Lavazza A. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs in Northern Italy. *Infect Ecol Epidemiol* 2011; 1: e7331. doi: 10.3402/iee.v1i0.7331
66. Meester M, Tobias TJ, Bouwknegt M, Kusters NE, Stegeman JA, van der Poel WHM. Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms: a review. *Porcine Health Manag* 2021; 7(1): e16. <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00189-z>
67. Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Res* 2019; 163: 34–49.
68. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 1998; 143(7): 1405–15.
69. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(18): 9860–5.
70. Mesquita JR, Oliveira D, Rivadulla E, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol* 2016; 58: 13–5.
71. Moor D, Liniger M, Baumgartner A, Felleisen R. Screening of ready-to-eat meat products for hepatitis E virus in Switzerland. *Food Environ Virol* 2018; 10(3): 263–71.
72. Müller A, Collineau L, Stephan R, Müller A, Stärk KDC. Assessment of the risk of foodborne transmission and burden of hepatitis E in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2017; 242: 107–15.
73. Primc, A. Pojavnost in razširjenost okužbe z virusom hepatitisa E med krvodajalci v Republiki Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2020. Magistrska naloga

74. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4(4): 406–25.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
75. Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, et al. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver Int* 2012; 32(4): 675–88.
76. Nan Y, Wu C, Zhao Q, Zhou EM. Zoonotic hepatitis E virus: an ignored risk for public health. *Front Microbiol* 2017; 8: e2396. doi: 10.3389/fmicb.2017.02396
77. Pallerla SR, Schembecker S, Meyer CG, et al. Hepatitis E virus genome detection in commercial pork livers and pork meat products in Germany. *J Viral Hepat* 2021; 28(1): 196–204.
78. Park WJ, Park BJ, Ahn HS, et al. Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *J Vet Sci* 2016; 17(1): e1–11. doi: 10.4142/jvs.2016.17.1.1.
79. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 2010; 41(6): e46. doi: 10.1051/vetres/2010018.
80. Psychogiou MA, Tassopoulos NC, Papatheodoridis GV, et al. Hepatitis E virus infection in a cohort of patients with acute non-A, non-B hepatitis. *J Hepatol* 1995; 23(6): 668–73.
81. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna: R Foundation for statistical computing, 2021. <https://www.R-project.org/> (24. 11. 2021)
82. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Med Coll J* 2013; 4(1): 30–6.
83. Renou C, Roque-Afonso AM, Pavio N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(11): 1945–7.
84. Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, Rodríguez-Frías F, Quer J, Buti M. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49(2): 165–8.
85. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, et al. High prevalence of hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011; 34(5): 419–27.
86. Rutjes SA, Bouwknegt M, van der Giessen JW, de Roda Husman AM, Reusken CB. Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in the Netherlands. *J Food Prot* 2014; 77(4): 640–2.

87. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350–4. doi: 10.1126/science.2999980.
88. Salines M, Dumarest M, Andraud M, et al. Natural viral co-infections in pig herds affect hepatitis E virus (HEV) infection dynamics and increase the risk of contaminated livers at slaughter. *Transbound Emerg Dis* 2019; 66(5): 1930–45.
89. Salines M, Barnaud E, Andraud M, et al. Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res* 2015; 46(55): e1-10. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0207-y>
90. Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999; 57(3): 243–51.
91. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, et al. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol* 2012; 56(2): 500–2.
92. Schlosser J, Eiden M, Vina-Rodriguez A, et al. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet Res* 2014; 45(1): e121. doi: 10.1186/s13567-014-0121-8.
93. Scobie L, Dalton HR. Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Viral Hepat* 2013; 20(1): 1–11. doi: 10.1111/jvh.12024.
94. Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martin M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 2008; 175(1): 130–2.
95. SI-STAT Podatkovna baza. Zakol odojkov v klavnici (število), Slovenija, Letno: Odojki, 2014 (online). Ljubljana: Statistični urad Republike Slovenije <https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/-/1505802S.px/table/tableViewLayout2/> (2. sept. 2021)
96. Smith DB, Izopet J, Nicot F, et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species *Orthohepevirus A*). *J Gen Virol* 2020; 101(7): 692–8.
97. Song YJ, Jeong HJ, Kim YJ, et al. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol* 2010; 82(4): 583–91.

98. Steyer A, Naglič T, Močilnik T, Poljšak-Prijatelj M, Poljak M. Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect Genet Evol* 2011; 11(7): 1732–7.
99. Szabo K, Trojnar E, Anheyer-Behmenburg H, et al. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int J Food Microbiol* 2015; 215: 149–56.
100. Štukelj M, Toplak I, Raspor Lainšček P, et al. Hepatitis E v Sloveniji. In: One health = Eno zdravje: zbornik prispevkov. Ljubljana : UL Veterinarska fakulteta, 2019: 23–30.
101. Takova K, Koynarski T, Minkov I, Ivanova Z, Toneva V, Zahmanova G. Increasing hepatitis E virus seroprevalence in domestic pigs and wild boar in Bulgaria. *Animals (Basel)* 2020; 10(9): e1521. doi: 10.3390/ani10091521
102. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725–9.
103. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362(9381): 371–3.
104. Teixeira-Costa C, Andraud M, Rose N, Salines M. Controlling hepatitis E virus in the pig production sector: assessment of the technical and behavioural feasibility of on-farm risk mitigation strategies. *Prev Vet Med* 2020; 175: e104866. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104866.
105. Tessé S, Lioure B, Fornecker L, et al. Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in Europe: first autochthonous hepatitis E infection in France. *J Clin Virol* 2012; 54(2): 197–200.
106. Toplak I, Rihtarič D, Barlovič S, Raspor Lainšček P, Kirbiš A. Ugotavljanje prisotnosti virusa hepatitisa E v vzorcih blata poginjenih prašičev v letih od 2011 do 2015 v Sloveniji. *Slo Vet Res* 2016; 53(17): 186–9.
107. Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglenečki U, Hostnik P, Grom J. High diversity of hepatitis E virus detected in pig fecal samples in Slovenia. In: 9th International Congress of Veterinary Virology. ESVV 2012 ; One world, one health, one virology. Madrid : European Society for Veterinary Virology, 2012: 163–4.
108. Treagus S, Wright C, Baker-Austin C, Longdon B, Lowther J. The foodborne transmission of hepatitis E virus to humans. *Food Environ Virol* 2021; 13(2): 127–45.

109. Tsachev I, Baymakova M, Ciccozzi M, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pigs from southern Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2019; 19(10): 767–72.
110. Vina-Rodriguez A, Schlosser J, Becher D, Kaden V, Groschup MH, Eiden M. Hepatitis E virus genotype 3 diversity: phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. *Viruses* 2015; 7(5): 2704–26.
111. Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6): 2786–92.
112. Wang Y, Zhao C, Qi Y, Geng Y. Hepatitis E virus. *Adv Exp Med Biol* 2016; 948: 1–16. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_1
113. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 2008; 198(12): 1732–41.
114. Widén F. Hepatitis E as a zoonosis. *Adv Exp Med Biol* 2016; 948: 61–71. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_4.
115. Xin S, Xiao L. Clinical manifestations of hepatitis E. *Adv Exp Med Biol* 2016; 948: 175–89. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_10.
116. Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(10): 4507–33.
117. Zaaijer HL, Kok M, Lelie PN, Timmerman RJ, Chau K, van der Pal HJ. Hepatitis E in the Netherlands: imported and endemic. *Lancet* 1993; 341(8848): 826. doi: 10.1016/0140-6736(93)90599-c.
118. Zanetti AR, Schlauder GG, Romanò L, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 1999; 57(4): 356–60.
119. Zhou Y, Zhao C, Tian Y, Xu N, Wang Y. Characteristics and functions of HEV proteins. *Adv Exp Med Biol* 2016; 948: 17–38. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_2.
120. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques* 2020; 69(4): 317–25.
121. Žele D, Barry AF, Hakze-van der Honing RW, Vengušt G, van der Poel WH. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies and first detection of hepatitis E virus in wild boar in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16(1): 71–4.

11 PRILOGE