

UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI VIRUSA HEPATITISA E V VZORCIH BLATA POGINJENIH PRAŠIČEV V LETIH OD 2011 DO 2015 V SLOVENIJI

Ivan Toplak*¹, Danijela Rihtarič¹, Smiljka Barlovič², Petra Raspor Lainšček³, Andrej Kirbiš³

¹Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, ²Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Murska Sobota, ³Inštitut za varno hrano, krmo in okolje Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V letih od 2011 do 2015 smo na prisotnost nukleinske kisline virusa hepatitisa E (HEV) z metodo RT-PCR v realnem času preiskali 566 individualnih vzorcev blata poginjenih prašičev. HEV smo v blatu prašičev dokazali v povprečju pri 8,83% vzorcev. Najnižji odstotek HEV pozitivnih vzorcev smo dokazali v letu 2013 (4,21%), najvišjega pa v letu 2014 (12,50%). V pozitivnih vzorcih smo z metodo RT-PCR v realnem času ugotavljali vrednosti Ct med 23 in 40, kar odraža ugotovitev od velikih do nizkih količin HEV v blatu pozitivnih prašičev. Čeprav HEV pri prašičih ne povzroča klinične slike, je prisotnost virusa v blatu poginjenih prašičev dokaz, da HEV kroži v slovenskih rejah prašičev. Zaradi možnosti prenosa HEV iz prašičev na človeka, ne smemo podcenjevati razširjenosti teh okužb.

Ključne besede: Virus hepatitisa E; dokazovanje; RT-PCR v realnem času; blato prašiča; prašič

Uvod

Virus hepatitisa E (HEV) ima enojnovijačno pozitivno polarno molekulo RNA. HEV je uvrščen v rod *Hepevirus*, družine *Hepeviridae*, znotraj rodu pa so HEV razvrščeni v štiri genotipe. Viruse genotipa 1 in 2 ugotavljajo predvsem v manj razvitih državah, kjer je HEV endemično prisoten, izbruhe in epidemije pri ljudeh pa največkrat povezujejo s fekalno onesnaženostjo pitne vode. Okuženi ljudje so naravni gostitelj teh dveh genotipov HEV, prenosi med ljudmi pa so posledica neizvajanja preventivnih ukrepov in slabih higienskih razmer. Okužbe z virusi genotipa 3 in 4 ugotavljajo pri človeku tako v razvitih, kot tudi v nerazvitih državah. Prisotnost HEV genotipa 3 in 4 so dokazali tudi pri številnih živalskih vrstah, domači in divji prašič pa sta naravna gostitelja (1). Okužba s HEV genotipa 3 in 4 pri ljudeh povzroča akutni hepatitis s smrtnostjo <1%, pri nosečnicah pa smrtnost dosega 28% (1). S filogenetskimi primerjavami sevov HEV, ugotovljenih pri prašičih in človeku, so nedvoumno dokazali prenos HEV med obema vrstama (2). V industrijsko razvitih državah so okužbe s HEV sporadično zaznane, se pa število zaznanih primerov okužb ljudi v ZDA in Evropi povečuje, posebej pri delavcih, ki so v neposrednem stiku s prašiči. V Sloveniji smo protitelesa in virus dokazali tako pri domačih kot divjih prašičih (3, 4). Z izvedeno študijo smo želeli ugotoviti prisotnost HEV v vzorcih blata poginjenih prašičev in spremljati morebitno pojavljanje okužb pri domačih prašičih v daljšem časovnem obdobju.

Material in metode

V petih letih, od 2011 do 2015, smo vzorčili blato prašičev, ki so poginili v starosti od 2 do 5 mesecev. Večina vzorčenih prašičev je iz območja severovzhodne Slovenije, kjer se nahaja največje število rej in je najvišja gostota prašičev v Sloveniji. Pri patološki sekciji smo od posameznega prašiča odvzeli približno 10 cm debelega črevesa in ga do testiranja v laboratoriju shranili v zamrzovalniku. Iz vsebine črevesa smo pripravili 10% suspenzijo in izolacijo RNA izvedli s komercialnim kompletom QIAamp® viral RNA Mini (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Nukleinsko kislino HEV smo dokazovali z metodo RT-PCR v realnem času. Pri tem smo uporabili reagente Superscript™ III Platinum® One-Step RT-PCR System with ROX (Invitrogen, ZDA) in specifične oligonukleotidne začetnike ter sondo za dokaz virusov HEV genotipov 1-4, kot je bilo predhodno opisano (5). Rezultat posameznega vzorca smo ovrednotili kot pozitiven, v kolikor smo dobili vrednost Ct nižjo od 40, oziroma negativen pri vzorcih, pri katerih nismo ugotovili specifičnega pomnoževanja.

Rezultati

Z metodo RT-PCR v realnem času za dokaz nukleinske kisline HEV smo od leta 2011 do leta 2015 preiskali skupno 566 vzorcev blata poginjenih prašičev. Prisotnost virusne nukleinske kisline HEV smo dokazali v najnižjem odstotku v letu 2013 (4,21%), najvišji odstotek pozitivnih vzorcev pa v letu 2014 (12,50%). V spremljanem obdobju petih let smo ugotovili v povprečju 8,83% pozitivnih vzorcev na HEV (Tabela 1). V pozitivnih vzorcih smo z metodo RT-PCR v realnem času ugotavljali zelo različne količine virusne nukleinske kisline, glede na dobljene vrednosti Ct med 23 in 40. Ti rezultati dokazujejo, da je bil HEV stalno prisoten v zadnjih 5 letih v slovenskih prašičjih rejah, uporabljena metoda in vzorci blata prašičev pa predstavljajo dober sistem za ovrednotenje pojavljanja HEV prašičih.

Tabela 1: Število pregledanih vzorcev blata poginjenih prašičev na prisotnost HEV z metodo RT-PCR v realnem času v posameznem letu od 2011 do 2015 in odstotki vzorcev v katerih smo dokazali prisotnost nukleinske kisline HEV

Leto	Število preiskanih vzorcev	Število negativnih vzorcev	Število pozitivnih vzorcev	Odstotek pozitivnih vzorcev na HEV
2011	57	50	7	12,28%
2012	162	143	19	11,72%
2013	190	182	8	4,21%
2014	40	35	5	12,50%
2015	117	106	11	9,40%
Skupaj	566	516	50	8,83%

Razprava

V izvedeni študiji smo ugotavljali prisotnost HEV v naključno odvzetih vzorcih blata poginjenih prašičev. Čeprav je bil HEV pri prašičih v Sloveniji prvič dokazan že leta 2008 in tudi kasneje, pa so te študije zajemale le posamezne reje ali manjše število vzorcev.

Dokazovanje HEV v zajetem petletnem obdobju je prva tovrstna študija pri nas, ki potrjuje stalno prisotnost okužb s HEV pri domačih prašičih. Glede na to, da izločanje HEV v blatu prašičev traja od 20 do 120 dni po okužbi, je ugotovitev 10% pozitivnih vzorcev v starostni skupini od 2 do 5 mesecev starih prašičev pričakovan rezultat, ki potrjuje ugotovljeno stanje v drugih državah. Ker sta domači in divji prašič rezervoar HEV, je potrebno to upoštevati tudi v Sloveniji, v okviru preventivnih ukrepov javnega zdravja. Čeprav pozitivnih vzorcev v študiji nismo genetsko tipizirali, je glede na splošno razširjenost HEV genotipa 3 v Evropi in predhodne tipizacije pri nas, stalna prisotnost HEV dokaz, da virus ves čas kroži v naših prašičjih rejah. HEV spada med zoonoze, okužbe s HEV pa so s strani epidemiologov ter humanih diagnostičnih laboratorijev še vedno prepogosto spregledane. Čeprav je pri človeku klinično zaznavnih akutnih primerov malo, pa so okužbe s HEV lahko posebej nevarne za nosečnice, zato je potrebna posebna previdnost, da se nosečnice ne izpostavljajo v rejah prašičev, oziroma so previdne pri uživanju termično neobdelanih izdelkov iz prašičjega mesa.

Reference

1. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140: 256-265.
2. Xia H, Wahlberg N, Belak S, meng XJ, Liu L. The emergence of genotypes 3 and 4 hepatitis E virus in swine and humans: a phylogenetic perspective. *Arch Virol* 2011; 156: 121-124.
3. Lainšček Raspor P, Toplak I, Kirbiš A. Detection of hepatitis E virus in faeces and liver of pigs collected at two Slovenian slaughterhouses. *Mac Vet Rev* 2013; 36: 97-100.
4. Žele D, Barry AF, Hakze-van der Honing RW, Vengušt G, van der Poel VHM. Prevalence of the anti-hepatitis E virus antibodies and first detection of hepatitis E virus in wild boar in Slovenia. *Vector-born Zoonot Dis* 2016; 71-74.
5. 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 Meth* 2006; 131: 65-71.

The detection of hepatitis E virus in feces samples of dead pigs in the period from 2011 to 2015 in Slovenia

Between years 2011 and 2015 a total 566 individual feces samples of dead pigs were examined for the detection of nucleic acid of hepatitis E virus (HEV) by real time RT-PCR method. In the five-year follow-up period the presence of HEV was demonstrated in an average of 8,83% of feces samples. The lowest percentage of HEV positive samples was detected in year 2013 (4,21%) and the highest in 2014 (12,50%). The cycle threshold values obtained by real time RT-PCR method for positive samples varied from 23 up to 40, reflecting the presence from high to low quantities of HEV in feces. Although HEV does not cause clinical picture of the disease in pigs, the presence of the virus in the feces of dead pigs confirmed that HEV is circulating in Slovenian pig farms. These infections can not be underestimated because of the potential transmission of HEV from pigs to humans.

Key words: Hepatitis E virus; detection; real-time RT-PCR; pig feces, pig