



BIOR

PĀRTIKAS DROŠĪBAS, DZĪVNIĒKU VESELĪBAS
UN VIDES ZINĀTNISKAIS INSTITŪTS

IESPĒJAMIE E HEPATĪTA IZPLATĪBAS RISKI LATVIJĀ

ZINĀTNISKĀ PĒTĪJUMA ATSKAITE

Izpildītājs:

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības
un vides zinātniskais institūts "BIOR"

RĪGA
2019

APSTIPRINU
Zemkopības ministrijas
Veterinārā un pārtikas departamenta direktore
Zanda Matuzale

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

Zemkopības ministrijas pasūtītais zinātniskais pētījums

Līgums Nr. 19-00-SOINV05-000012

IESPĒJAMIE E HEPATĪTA IZPLATĪBAS RISKI LATVIJĀ

ZINĀTNISKĀ PĒTĪJUMA ATSKAITE

Projekta vadītāja:

Mg.med.vet., LLU doktorante Žanete Šteingolde

Rīga

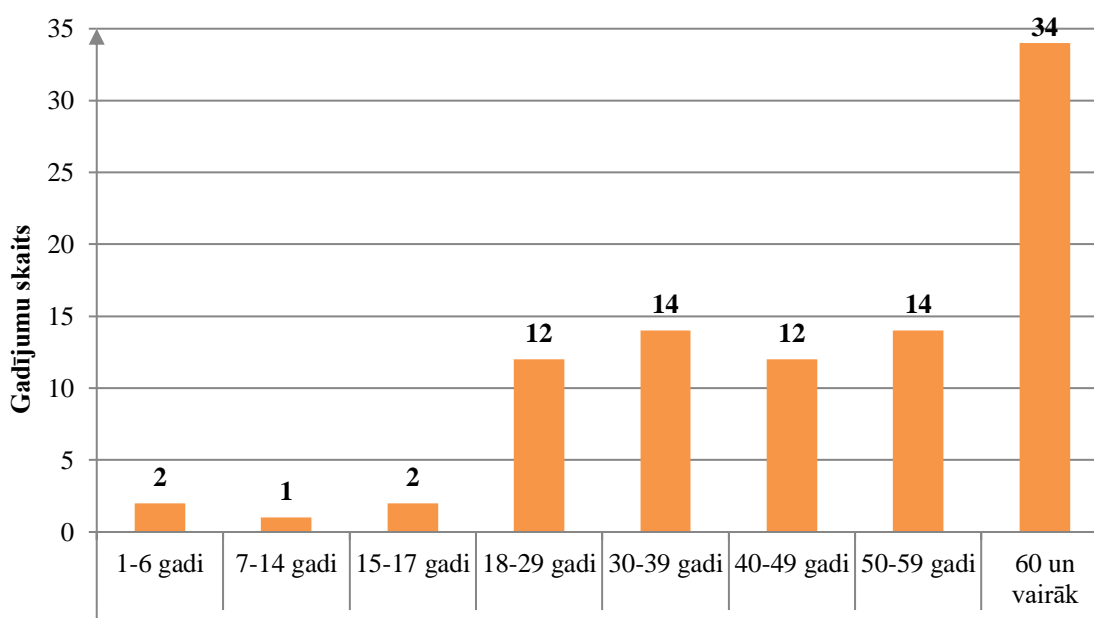
2019

Saturs

Projekta aktualitāte	4
1. Projekta darba uzdevumu izpilde	11
1.1. Paraugu atlase seroloģiskajām un molekulāri bioloģiskajām analīzēm	11
1.2. Paraugu izmeklēšanas metodes	14
1.2.1. Seroloģiskās izmeklēšanas metodes	14
1.2.2. Molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas metodes	14
1.3. Ieteikumi HEV uzraudzībai, kontrolei un apkarošanai cūkkopības un cūkgaļas produktu nozares uzņēmumos	15
2. Rezultāti un diskusija	17
2.1. Seroloģisko izmeklējumu rezultāti un diskusija	17
2.1.1. HEV antivielu sastopamība mājas cūku populācijā	17
2.1.2. HEV antivielu sastopamība meža cūku populācijā	19
2.2. Molekulāri bioloģisko izmeklējumu rezultāti un diskusija	20
2.2.1. HEV sastopamība un genotipu daudzveidība mājas cūku populācijā	20
2.2.2. HEV sastopamība un genotipu daudzveidība meža cūku populācijā	22
2.2.3. HEV sastopamība cūkgaļā un cūku aknas saturošos pārtikas produktos	23
3. Secinājumi	24
Literatūras saraksts	25

Projekta aktualitāte

Hepatīts E ir viena no izplatītākajām ar pārtiku saistītajām zoonozēm pasaulē, kā arī biežākais akūta hepatīta izraisītājs [1]. Saslimšanu ar hepatītu E izraisa hepatīta E vīruss (HEV). Inficēšanās ar šo vīrusu iespējama gan jaunattīstības valstīs, gan industrializētās valstīs [2], un tā galvenokārt noris fekāli-orālā ceļā [3]. Pasaules Veselības organizācija ziņo, ka ik gadu aptuveni 20 miljoni cilvēku pārslimo hepatītu E, savukārt tikai aptuveni 16,5% (3,3 miljoni) gadījumu tiek reģistrēti kā simptomātiski [4]. Lai gan mirstība nav liela (1 – 4%) [5], cilvēkiem ar jau esošiem aknu bojājumiem, kā arī grūtniecēm letāls iznākums iespējams biežāk, attiecīgi 70% un 25% gadījumu [6]. Attīstoties hroniskai HEV infekcijai, augsts mirstības līmenis iespējams arī imūnsupresētiem cilvēkiem [7]. Latvijā no 2006. gada, kad tika reģistrēts pirmais hepatīta E gadījums [8], līdz 2017. gada beigām kopumā seroloģiski apstiprināts 91 saslimšanas gadījums [9] (1. attēls).



1. attēls. Apstiprināto hepatīta E gadījumu skaits Latvijā 2006. – 2017. gadā kumulatīvi dažādās vecuma grupās (n = 91).

Ilgu laiku HEV tika uzskatīts par uzmanības vērtu infekciju tikai jaunattīstības valstīs, kurās galvenais iedzīvotāju inficēšanās ceļš ir kontaminēts dzeramais ūdens [10]. Šajās valstīs saslimšana ar HEV ir endēmiska, to galvenokārt izraisa vīrusa 1. un 2. genotips (HEV-1 un HEV-2). Teritorijas, kurās HEV-1 sastopams visbiežāk, ir Āzija, Āfrika un Vidējie Austrumi. Savukārt HEV-2 par dominējošo genotipu tiek uzskatīts Meksikā un Rietumāfrikā [7]. Šajās valstīs seroprevalence svārstās no 30% līdz 80%, visbiežāk klīnisku saslimšanu diagnosticējot 15 – 40 gadu veciem cilvēkiem [2].

Savukārt industrializētās valstīs lielākoties tiek reģistrēti sporādiski saslimšanas gadījumi, kurus izraisījuši vīrusa 3. un 4. genotips (HEV-3 un HEV-4). Eiropā, Japānā, Ziemeļ- un Dienvidamerikā HEV3 ir biežākais saslimšanu izraisošais genotips, bet Ķīnā, Taivānā un Dienvidaustrumāzijā tas ir HEV-4 [7]. Pretēji HEV-1 un HEV-2, šie genotipi ir zoonotiski hepatīta

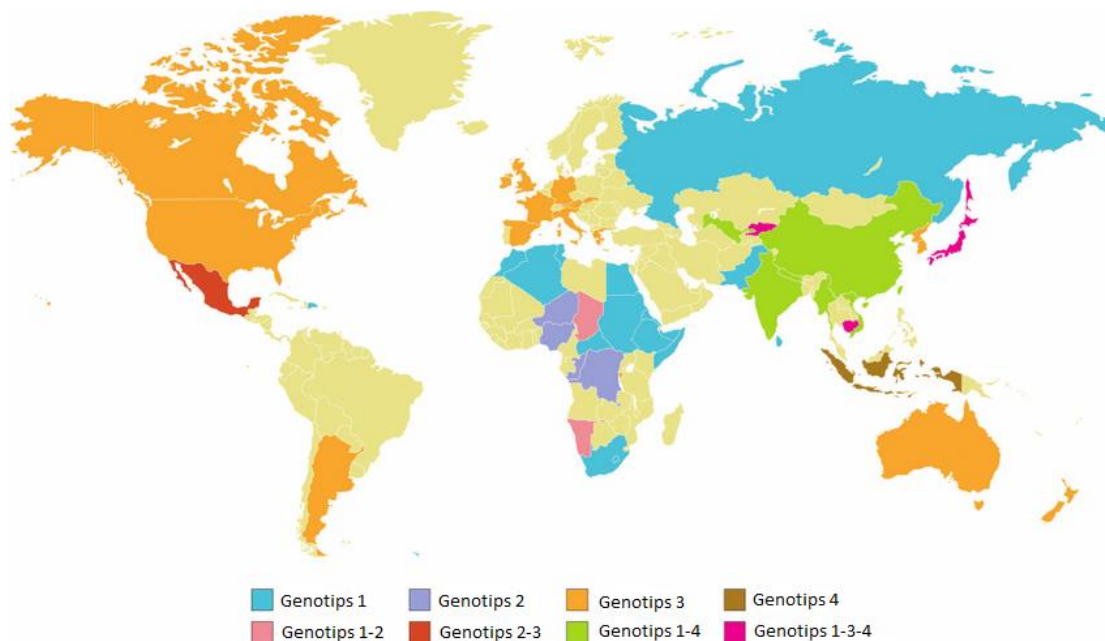
E ierosinātāji, tie spēj inficēt gan cilvēkus, gan dzīvniekus, galvenokārt, mājas cūkas, kā arī tādus meža dzīvniekus kā meža cūkas, briežus, zaķus [10].

Mājas cūku un meža dzīvnieku gaļa un gaļas produkti atzīti par primāro inficēšanās ceļu cilvēkiem [11], [12]. Gadījumi, kad cūkām novēro virēmiju kaušanas vecumā, var radīt potenciālu risku cilvēkiem inficēties ar HEV, ja cūkgaļa un citi kaušanas produkti netiek pietiekami termiski apstrādāti pirms lietošanas uzturā [3]. Pie šādiem produktiem pieder dažādi gaļas izstrādājumi, kas satur dzīvnieku aknas, piemēram, pastētes, dažādas desas un cīsiņi. Dzīvnieku gaļā (t.i., muskuļaudos) HEV konstatēts salīdzinoši zemā līmenī [13].

Kā citi riska faktori, kas palielina iespēju saslimt ar hepatītu E industrializētās valstīs, tiek minēti ceļojumi uz endēmiskiem reģioniem, saskarsme ar inficētiem dzīvniekiem, asinspārļiešana, grūtniecība, novecošana, jau eksistējoši aknu bojājumi, kā arī vēžveidīgo un citu filtrētājdzīvnieku lietošana uzturā [14].

Industrializētās valstīs HEV incidence un seroprevalence atšķiras gan starp valstīm, gan vienas valsts ietvaros (reģionos) [12], kopumā svārstoties starp 0,6% - 52,5% [6]. Diagnostikas dati industrializētās valstīs liecina, ka 5 – 15% no pacientiem ar akūtu hepatītu diagnosticēts hepatīts E, izmeklēšanas gaitā izslēdzot A, B, C hepatītus [11]. Savukārt seroprevalences dati dažādās vecuma grupās norāda uz vairākkārtēju saskarsmi ar HEV mūža laikā [2]. Lielākoties hepatīta E infekcija sastopama pusmūža/vecāka gada gājuma vīriešiem (vidējais vecums 63 gadi) [12].

Attīstoties diagnostikas metodēm, vairākas industrializētas valstis identificētas kā „karstie punkti”, kurās reģistrēts augsts HEV seroprevalences līmenis cilvēkiem: Nīderlande, Čehija, Marseļas, Tulūzas un Korsikas reģioni Francijā, kā arī Abruco reģions Itālijā, Japāna, Ķīna [2], [12]. Lielākā daļa rezultātu šajos pētījumos norāda uz biežu iedzīvotāju saskarsmi ar HEV, kas kontrastē ar zemo ziņoto saslimšanas gadījumu skaitu, norādot uz problēmām diagnostikā [6]. Lielākoties saslimšana ar hepatītu E gan jaunattīstības, gan industrializētās valstīs noris kā akūta, bet pašlimitējoša saslimšana, un simptomi ir ļoti līdzīgi citu akūtu hepatītu izraisītajiem simptomiem: aknu iekaisums, drudzis un dzelte [15], [2]. Izņēmums ir HEV-3, kas spēj izraisīt hronisku hepatītu imūnsupresētiem cilvēkiem [10]. Pētījumi liecina, ka cilvēkiem, kas saņēmuši orgānu transplantus, hronisks hepatīts E attīstās 60% gadījumos [12]. HEV genotipu sastopamību pasaulē parādīta 2. attēlā.



2. attēls. Hepatīta E vīrusa genotipu 1 – 4 sastopamība pasaulē [16].

Jāatzīmē, ka pieejamos datus par infekcijas patiesajiem apmēriem gan globālā, gan lokālā līmenī ietekmē nepietiekamā hepatīta E diagnostika, kas ir aktuāla problēma visā pasaulē [2]. Jau minēts, ka tikai apmēram 6% no saslimšanas gadījumiem ir simptomātiski, taču visbiežāk hepatīts E tiek nepareizi diagnosticēts, kā medikamentu izraisīti aknu bojājumi. Turklāt bez simptomiem, kas norāda uz aknu bojājumiem, hepatīta E gadījumos var attīstīties arī neiroloģiskas komplikācijas, piemēram, Giliana-Barra sindroms, neiralģiskā amiotrofija, perifērā neiropātija u.c. Konstatējot pacientiem iepriekšminētās pazīmes, ārsti ne vienmēr apsver HEV infekciju kā diagnozi [12]. Ja jaunattīstības valstīs finansiālo līdzekļu trūkums, kā arī iedzīvotāju kopējā labklājība ietekmē viņu iespējas griezties pie ārsta un saņemt pareizu diagnozi, tad industrializētās valstīs hepatīts E joprojām tiek uzskatīts par infekciju, kas saistīta ar izceļošanu uz endēmiskiem reģioniem, tātad speciāliem apstākļiem. Bieži vien, ja pacienta anamnēzē netiek uzrādīts ceļojums uz kādu no HEV endēmiskajiem reģioniem, speciālists neapsver iespējamu inficēšanos ar konkrēto vīrusu [11].

Hepatīta E vīrusa raksturojums

Hepatīta E vīruss pieder *Hepeviridae* dzimtai. Pie tās pieder divas ģintis *Orthohepevirus* un *Piscihepevirus*. *Orthohepevirus* ģintij pieder četras sugas (A – D), no kurām pie *Orthohepevirus A* pieder hepatīta E vīruss. Šai sugai izšķir septiņus genotipus, no kuriem pieci (HEV-1, -2, -3, -4, -7) inficē cilvēkus, divi (HEV-3, -4) – mājas cūkas, četri (HEV-3, -4, -5, -6) – meža cūkas, viens (HEV-3) – zaķus un briežus, viens (HEV-4) – jakus un viens (HEV-7) – kamieļus. Visi septiņi genotipi pieder vienam serotipam [10], [11].

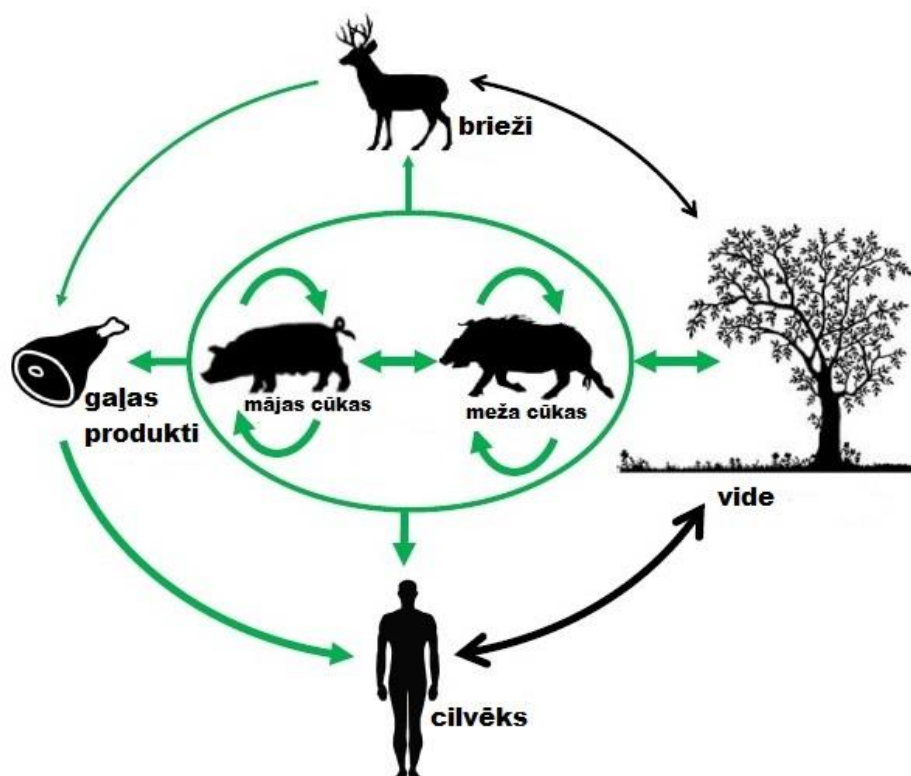
Hepatīta E vīruss ir sfērisks, neapvalkots vīruss, kas sastāv no kapsīdas proteīna un nukleīnskābes. Tā diametrs ir 27-34 nm, savukārt tā vienspirāles, pozitīvas polaritātes RNS genoms ir 7,2 kbp garš. Tas satur trīs atvērtās lasīšanas rāmjus jeb ORF (no angļu valodas – *Open Reading Frames*). Katrs no ORF kodē specifiskus, vīrusam nozīmīgus proteīnus: ORF1 – nestrukturālos proteīnus, piemēram, metiltransferāzi, proteāzi, helikāzi un RNS polimerāzi, kas

vitāli nepieciešami vīrusa replikācijas procesiem, ORF2 – kapsīdas proteīnu, kam ir svarīga loma vīrusa iekļūšanai mērķa šūnā un kas satur neitralizējošo antivielu piesaistīšanās vietas, bet ORF3 kodē ar citoskeletu saistītu fosfoproteīnu, kas nodrošina vīrusa izkļūšanu no šūnas un līdz ar to tālāku izplatību organismā [15], [14].

Kopumā HEV ir stabils, nonākot apkārtējā vidē. Uzglabājot vīrusu vienu mēnesi istabas temperatūrā, tas saglabā savas infekcioloģiskās īpašības. Ievietojot vīrusu +4°C, vīruss spēj izraisīt saslimšanu pat pēc diviem mēnešiem [13]. Vīrusa iznīcināšanai efektīvi var izmantot termisko apstrādi. Veikts pētījums, kurā pierādīts, ka termiskā apstrāde vismaz 20 minūtes, pārtikas produkta iekšējai temperatūrai sasniedzot +71°C, pilnībā inaktivē hepatīta E vīrusu [17]. Efektīvi vīrusa iznīcināšanai ir arī hloru saturoši dezinfekcijas līdzekļi un ultravioletais starojums [7].

Hepatīta E vīrusa dabiskie rezervuāri un izplatīšanas ceļi

Primārais cilvēku inficēšanās avots ir vide – ūdens un dzīvnieku valsts produkti. Pārtikas produkti un vides faktori ir veids, kā vīruss izplatās, inficējot arvien lielākas dzīvnieku un cilvēku populācijas (3. attēls). Lai sekmīgi novērstu cilvēku inficēšanās iespējas ar HEV-3 un HEV-4 un attīstītu diagnostikas metodes, ir jāizprot tā izplatības ceļi mājas cūku un meža dzīvnieku populācijās.



3. attēls. Hepatīta E vīrusa izplatības ceļi no inficētiem organismiem uz neinficētiem organismiem.

Lai gan ir nepieciešami papildus pētījumi par HEV transmisijas ceļiem starp dzīvnieku sugām un starp dzīvniekiem un cilvēkiem, pētījumi liecina, ka vides faktoriem ir ļoti liela nozīme [18]. Cūku fekālijas un urīns ir viens no galvenajiem veidiem, kā vīruss no inficētiem dzīvniekiem nonāk apkārtējā vidē. Līdz ar to iespējama HEV akumulācija vidē, kurā dzīvnieki un cilvēki uzturas diendienā. Kontaminācijai ar HEV pakļauts arī dzīvniekiem pieejamais dzeramais ūdens un barība. Arī tiešs ikdienas kontakts starp dzīvniekiem un dzīvnieku kontakts ar cilvēku var

novest pie HEV tālākas izplatības konkrētajā populācijā. Kā riska faktori tiek minēti arī cūku novietnes izmērs un lopkopības paradumi [3].

Vidēji lielas un mazas cūku fermas, kā arī piemājas saimniecības tiek minētas kā riska faktors, kas saistīts ar HEV seroprevalenci [3], [19], [20], [21], [22]. Pētījumi liecina, ka HEV seroprevalence ir ievērojami augstāka bioloģiskajās saimniecībās, salīdzinot ar industriālajām fermām, attiecīgi 89% un 72%. Augstāka HEV seroprevalence (76%) nekā industriālajās fermās novērota saimniecībās, kurās dzīvnieki brīvi uzturas āra aplokos vai ganībās [23]. No lopkopības paradumiem kā galvenie riska faktori tiek minēti vēla sivēnu atšķiršana no sivēnmātēm un slikti higiēnas apstākļi [24]. Biodrošības pasākumu ievērošana atzīta kā no HEV infekcijas pasargājošs faktors. Saimniecībās, kurās jāievēro stingrākas sanitārās prasības, piemēram, duša pirms ieiešanas fermā, novērota ievērojami zemāka HEV RNS prevalence fekāliju paraugos [25]. Ķīnā veikts pētījums norāda, ka HEV RNS sastopamībai ir sezonāls raksturs – visaugstākā sastopamība martā-aprīlī, kam seko nedaudz zemāka sastopamība septembrī-oktobrī [26].

Literatūrā pieejama pretrunīga informācija arī par HEV spēju pārvarēt transplacentāro barjeru. Vienā pētījumā konstatēts, ka grūsnās sivēnmātes, ja tām novēro HEV izraisītu virēmiju, šo vīrusu var nodot sivēniem, jo HEV RNS tika konstatēts abortētu sivēnu aknās [27]. Turpretī citā pētījumā sivēniem nenovēroja vertikālu HEV pārnesi no eksperimentāli intravenozi inficētām grūsnām sivēnmātēm [28].

Meža dzīvniekos slimības izplatību veicina dzīvnieku piebarošana, inficētiem dzīvniekiem dalot barību ar veselīgiem indivīdiem, kā arī kopējais populācijas blīvums konkrētā teritorijā [11].

Savstarpēju inficēšanos starp mājas un meža cūkām veicina tiešs kontakts starp tām, piemēram, ja mājas cūkas tiek audzētas atvērta tipa audzētavās. Šādi tiek dalīta gan vide, gan barība, gan iespējama pēcnācēju radīšana [13]. Literatūrā pieejama pretrunīga informācija par to, vai hepatīta E vīruss tiek nodots no meža cūkām (*Sus scrofa*) uz mājas cūkām (*Sus scrofa domesticus*) [3], vai tomēr otrādi [29]. HEV prevalence meža cūkās parasti ir zemāka nekā mājas cūkās, kas ļautu izdarīt secinājumu, ka vīruss izplatās no mājas cūkām uz meža cūkām. Tomēr jāņem vērā arī pierādījumi, ka brīvi dzīvojošās cūkās parasti vīrusa prevalence ir zemāka nekā nožogojumos dzīvojošiem dzīvniekiem [11]. Šādos apstākļos infekcijas starp mājas cūkām izplatītos ātrāk biežā un tuvā dzīvnieku kontakta dēļ. Neskatoties uz neskaidro vīrusa transmisijas ceļu, neapšaubāms ir fakts, ka abas sugas ir uzņēmīgas pret konkrēto vīrusu un rada inficēšanās risku cilvēkiem [3], [18].

No cūkām un cilvēkiem izolēto HEV ģenētiskā radniecība, pierāda to, ka vīrusa transmisija starp abām sugām ir iespējama [3]. Turklāt cilvēkiem, kuri nodarbošanās dēļ ir biežākā kontaktā ar dzīvniekiem (mednieki, mežkopji, lopkopji, veterinārārsti), HEV prevalence ir augstāka nekā pārējā cilvēku populācijā, norādot uz sugu savstarpējo uzņēmību pret HEV [1].

Hepatīta E vīruss cūku populācijā

Cūku populācijā Eiropā, Ziemeļ-, un Dienvidamerikā, Āfrikā, Dienvidaustrumāzijā, Okeānijā un Japānā dominē HEV-3, savukārt Ķīnā, Japānā un Indonēzijā plaši izplatīts ir HEV-4. Jāpiezīmē, ka līdzīgs vīrusa genotipu sadalījums novērojams arī cilvēku populācijā attiecīgajās pasaules daļās. Seroprevalence dažādās pasaules daļās atšķiras, tāpat dažādās valstīs cūku ganāmpulkos HEV seroprevalence variē no 5 līdz 100%. Atšķirības lielākoties pamatotas ar

izmeklēšanas metožu un izmeklēto paraugu dažādību. Cūkām diagnosticēt saslimšanu ar HEV ir sarežģīti, jo tām nenovēro specifiskus saslimšanas simptomus [13].

Kopš 1997. gada, kad HEV tika pirmo reizi konstatēts mājas cūkām [10], veikti aktīvi pētījumi, nosakot gan RNS, gan antivielu prevalenci cūku populācijā visā pasaulē. Pētījumi liecina, ka infekcija mājas cūkās visbiežāk attīstās tām sasniedzot 8 – 12 nedēļu vecumu, tātad īsi pēc maternālo antivielu izzušanas. Infekcijas gadījumā virēmija ilgst apmēram 1 – 2 nedēļas. Ir novēroti arī ilgstošāki virēmijas gadījumi, īpaši, ja cūkas ar HEV inficējas vēlākā augšanas posmā, šādos gadījumos virēmija var tikt novērota arī līdz kaušanas vecumam [3]. Skotijā veiktā pētījumā virēmija kaušanas laikā tika novērota 44,4% cūku [30], turpretī Apvienotajā Karalistē veiktā pētījumā tikai 3% cūku novēroja virēmiju kaušanas laikā [31].

Vīrusa izdalīšana ar fēcēm visaktīvāk notiek 3 – 8 nedēļas pēc sivēna atšķiršanas no mātes. Parādīties antivielām, sākumā IgM, vēlāk IgG, ap 15 – 18 nedēļu, vīrusa izdalīšana pakāpeniski samazinās [13], [3]. Spānijā veiktā pētījumā par HEV antivielu sastopamību cūkās, IgM antivielas konstatēja 7 – 13 nedēļas veciem sivēniem, bet IgG antivielas parādīšanos novēroja sākot no 13 nedēļu vecuma, atsevišķos gadījumos pat no 18 nedēļu vecuma. Savukārt IgG antivielas kaušanas vecumā (ap 26 nedēļām) novēroja 50 – 100% cūku piecās no sešām pētījumā iesaistītajām fermām [32]. HEV izdalīšanās ilgums ar fekālijām ir dažāds un atkarīgs no vairākiem faktoriem – saimniekošanas veida, higiēnas ievērošanas fermā, kā arī no citām infekcijas slimībām, ar kurām cūkas slimo paralēli HEV [3]. Eksperimentāli inficējot cūkas ar cūku reproduktīvi respiratorā sindroma (CRRS) vīrusu un HEV, tika pierādīts, ka šīm cūkām HEV izdalīšanās ar fekālijām notika ilgāk un intensīvāk nekā cūkām, kuras bija inficētas tikai ar HEV [33].

Eiropas Savienībā tieši mājas cūkas tiek uzskatītas par primāro HEV avotu. Mājas cūku populācija ir ievērojami lielāka, salīdzinot ar meža cūkām. Līdz ar to arī pārtikas produkti, iegūti no mājas cūkām, uzturā tiek lietoti biežāk nekā meža dzīvnieku gaļas produkti [1].

Meža cūkas par nopietnu HEV rezervuāru tiek uzskatītas kopš deviņdesmito gadu beigām, kad HEV pirmo reizi tika identificēts brīvi dzīvojošās meža cūkās Austrālijā. Meža cūkas lielākoties ir inficētas ar HEV-3, taču atsevišķi HEV-4 gadījumi reģistrēti Japānā. Eiropā seroprevalence svārstās 4,9 – 57,4% robežās, savukārt RNS prevalence reģistrēta līdz pat 68,2%. Atšķirībā no mājas cūkām, augstāka seroprevalence novērota pieaugušās cūkās [13].

Apkopojot informāciju, kas pieejama par Latvijas kaimiņvalstīm un citām tuvākajām valstīm, redzams, ka šajās valstīs ir fiksēta HEV klātbūtne mājas un meža cūku populācijās (1. tabula). Nav precīzu datu par hepatīta E sastopamību Krievijā, tomēr par HEV klātbūtni šīs valsts teritorijā liecina Igaunijas kolēģu atsauce uz nepublicētiem datiem [34]. Līdzīgi kā citās Eiropas valstīs [1] arī šajās valstīs HEV prevalence atšķiras gan ganāmpulku, gan individuālu dzīvnieku līmenī. Tomēr tā ir pietiekami augsta, lai raisītu pārdomas par iespējamo infekcijas izplatīšanos arī Latvijā.

HEV seroprevalence individuālos dzīvniekos Latvijai tuvākajās valstīs

Valsts (publikācija)	Dzīvnieku veids	RNS klātbūtne (individuālos dzīv.)	Antivielas pret HEV (individuālos dzīv.)
Igaunija [34]	Mājas cūkas	23%	62%
	Meža cūkas	16%	17%
Baltkrievija [35]	Mājas cūkas	15%	29%
	Meža cūkas	0%	35%
Lietuva [36], [37]	Mājas cūkas	33% ORF1; 23% ORF2	44%
	Meža cūkas	26% ORF1; 17% ORF2	57%
Norvēģija [18]	Mājas cūkas	–	73%
Zviedrija [38]	Mājas cūkas	30%	–
Somija [39]	Mājas cūkas	39%	82%
Polija [40]	Mājas cūkas	–	41%
	Meža cūkas	–	31%

Latvija ir apkopojusi datus par inficēšanās gadījumiem ar hepatītu E cilvēku populācijā, veicot uzraudzību nacionālā līmenī [41]. Balstoties uz Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes (EFSA) 2017. gada ziņojumu [1], Latvija nav sniegusi datus par HEV klātbūtni biežāk identificētajās vīrusa pārnēsājošajās dzīvnieku sugās, kā arī to gaļas produktos.

Antivielu noteikšana pret hepatīta E vīrusu un HEV RNS izdalīšana no mājas un meža cūku, kā arī no cūkgaļas un cūku aknu saturošiem produktu paraugiem projekta ietvaros sniedz ieskatu par slimības izplatību Latvijā mājas un meža cūku populācijās, un iespējamo sastopamību cūkgaļas un cūku aknas saturošos pārtikas produktos.

MĒRĶIS: veikt hepatīta E monitoringu mājas un meža cūkās un to gaļas produktos, kas rezultātā sniegs informāciju par hepatīta E izplatību. Monitoringa rezultāti kalpos kā agrīna brīdināšanas sistēma, kas dos signālu hepatīta E apkarošanas un uzraudzības uzsākšanai.

PROJEKTA UZDEVUMI:

1. Mājas un meža cūku paraugu ievākšana seroloģiskajām un molekulāri bioloģiskajām analīzēm.
2. Veikt ievāktu mājas un meža cūku paraugu seroloģisko un molekulāri bioloģisko izpēti: noteikt HEV antivielu (IgG) klātbūtni mājas un meža cūku asins paraugos, pētīt HEV RNS iespējamo klātbūtni mājas un meža cūku paraugos.
3. Uzkrāto un iegūto datu apkopošana un analizēšana: veidot datu bāzi par ievāktu mājas un meža cūku paraugu epidemioloģiskajiem datiem un laboratorisko analīžu rezultātiem, analizēt un apkopot HEV izplatību un ģenētisko daudzveidību mājas un meža cūku populācijās Latvijā.
4. Cūkgaļas un cūku aknas saturošu pārtikas produktu ievākšana un molekulāri bioloģiskā izpēte uz iespējamo hepatīta E vīrusa klātbūtni, datu bāzes veidošana par ievāktajiem pārtikas paraugiem un to laboratoriskajiem izmeklēšanas rezultātiem.
5. Sagatavot ieteikumus turpmākai hepatīta E vīrusa uzraudzībai, kontrolei un apkarošanai cūkkopības un cūkgaļas produktu nozares uzņēmumos.

1. Projekta darba uzdevumu izpilde

1.1. Paraugu atlase seroloģiskajām un molekulāri bioloģiskajām analīzēm

Mājas un meža cūku paraugu atlase seroloģiskai izmeklēšanai

Seroloģiskās analīzes tika veiktas mājas un meža cūku asins paraugiem. Veicot paraugu atlasī, tika izveidota datu bāze, kurā reģistrēta dažāda informācija par ievāktajiem mājas un meža cūku paraugiem (4A. un 4B. attēli). Visi asins paraugi tika iesaldēti un uzglabāti -20°C līdž analīžu veikšanai. Primārā informācija, piemēram, paraugu skaits, mājas cūku novietņu atrašanās vietas un numuri, meža cūku nomedīšanas vietas, cūku vecums gan par mājas, gan meža cūkām tika iegūta no veterinārārstu un mednieku norādītās informācijas, paraugu nododot.

Nr.p.k.	Novads	Pagasts	Reģions	novietnes izmērs	Novietnes tips	vecuma grupa	vecums		Prionics		ID.VET	
							gadi	mēneš	Rezultāts	OD	Rezultāts	S/P%

4A. attēls. Mājas cūku datu bāzē apkopotā informācija.

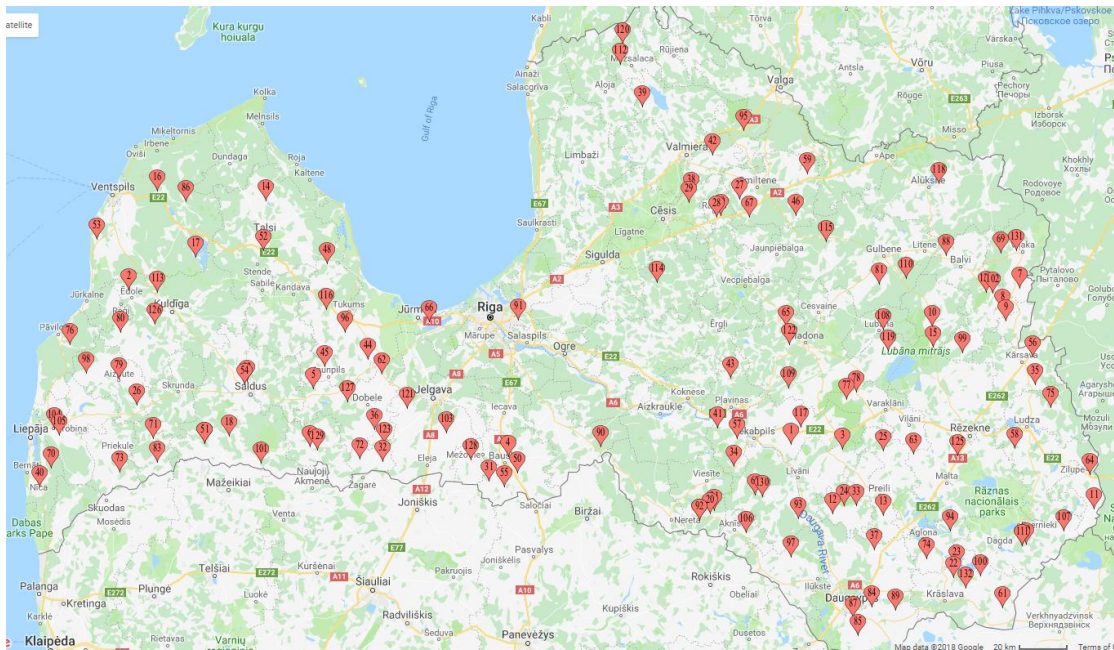
Nr.p.k.	Novads	Pagasts	Reģions	Vecums (gados)	Prionics		ID.VET	
					Rezultāts	OD	Rezultāts	S/P%

4B. attēls. Meža cūku datu bāzē apkopotā informācija.

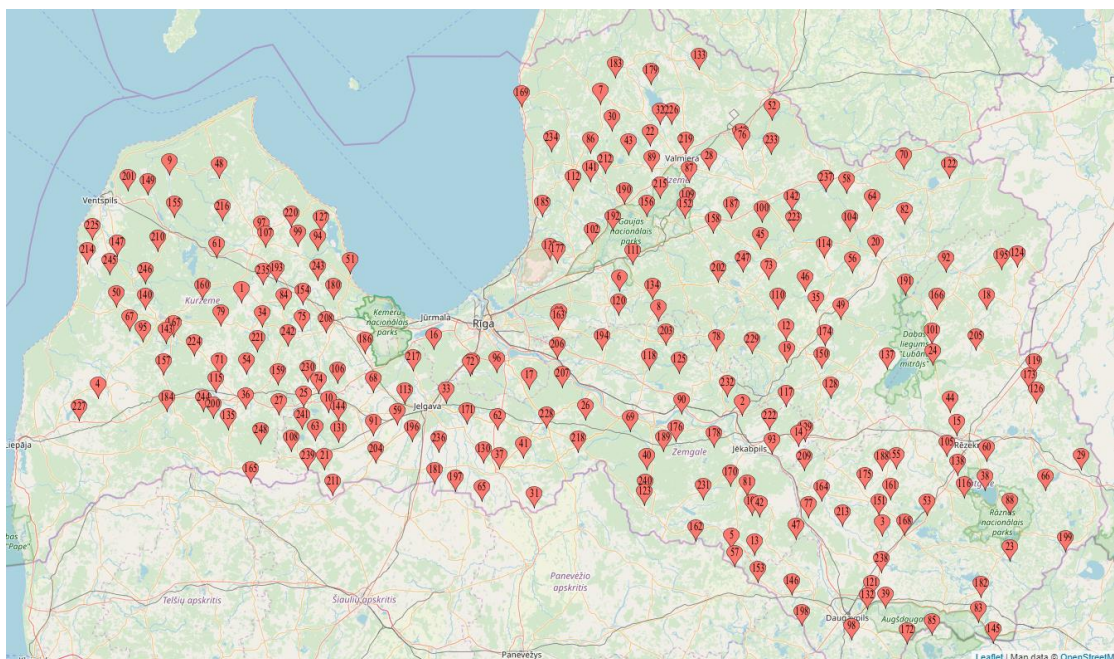
Pētījumā iekļautas cūku saimniecības no visas Latvijas teritorijas (skat. 5. attēlu). Cūkkopības saimniecības tika iedalītas grupās gan pēc lieluma, gan ražošanas tipa. Vadoties pēc kopējā cūku skaita, kas reģistrēts konkrētajā novietnē Lauksaimniecības datu centra (LDC) datubāzē, tika izveidotas piecas saimniecību grupas: 1 – 10 cūkas „ļoti maza”, 11 – 100 cūkas „maza”, 101 – 1000 cūkas „vidēja”, 1001 – 5000 cūkas „liela”, 5001 un vairāk cūku „ļoti liela” saimniecība. Iedalot saimniecības pēc ražošanas tipa tika izveidotas trīs grupas: slēgta ražošanas cikla un dalīta ražošanas cikla saimniecības, izšķirot nobarošanas un sivēnu ražošanas tipa saimniecības.

Lai ar 95% ticamības varbūtību noteiktu HEV antivielu izplatību, pieņemot, ka vidējā HEV izplatība ganāmpulkā ir 10%, tika atlasīts atbilstošs paraugu skaits no katras saimniecības. Citu valstu pētījumos pieejamā informācija liecina par ļoti dažādu HEV izplatības līmeni ganāmpulkā, tādēļ, nezinot situāciju par Latvijas cūku populāciju, tika izvēlēts HEV izplatības līmenis 10%, kas ir nedaudz zemāks kā vairumā pētījumu un ļauj izmeklēt lielāku paraugu skaitu (atbilstoši 95% ticamības varbūtībai) no katras saimniecības.

Arī meža cūku asins paraugi tika atlasīti tā, lai pētījumā iekļautu pēc iespējas plašāku Latvijas valsts teritoriju (skat. 6. attēlu). Lai ievāktie paraugi aptvertu pēc iespējas plašāku valsts teritoriju, Latvija tika iedalīta četros reģionos, balstoties uz vēsturisko iedalījumu novados: Vidzemē, Latgalē, Kurzemē un Zemgalē. Atlasot paraugus, tika sekots līdz paraugu skaitam katrā reģionā, lai tas būtu līdzīgs.



5. attēls. Cūku novietnes Latvijas teritorijā, no kurām ievākti mājas cūku asins paraugi HEV seroloģiskai izmeklēšanai.



6. attēls. Latvijas teritorijā ievāktie meža cūku asins paraugi HEV seroloģiskai izmeklēšanai.

Mājas un meža cūku paraugu atlase molekulāri bioloģiskai izmeklēšanai

Hepatīta E vīrusa noteikšanai un Latvijā cirkulējošo vīrusa genotipu noteikšanai tika izmantoti mājas un meža cūku asins un audu paraugi. Veicot paraugu atlasī, tika izveidota datu bāze, kurā registrēta informācija par ievāktajiem mājas un meža cūku paraugiem (7A. un 7B. attēli). Primārā informācija, piemēram, paraugu skaits, mājas cūku novietņu atrašanās vietas un numuri, meža cūku nomedīšanas vietas, cūku vecums gan par mājas, gan meža cūkām tika iegūta no veterinārārstu un mednieku norādītās informācijas, paraugu nodotot.

Nr.p.k.	Novads	Pagasts	Reģions	Materiāls	Vecums	RNS extraction	rtRT-PCR (Jothikumar, 2006)	nested PCR ORF1 (Johne, 2009)	nested PCR ORF2 (Huang, 2002)	sequencing ORF1	sequencing ORF2
---------	--------	---------	---------	-----------	--------	-------------------	-----------------------------------	--	---	--------------------	--------------------

7A. attēls. Mājas cūku molekulāri bioloģisko izmeklējumu datu bāzē apkopotā informācija

Nr.p.k.	Novads	Pagasts	Reģions	Materiāls	Vecums	RNS extraction	rtRT-PCR (Jothikumar, 2006)	nested PCR ORF1 (Johne, 2009)	nested PCR ORF2 (Huang, 2002)	sequencing ORF1	sequencing ORF2
---------	--------	---------	---------	-----------	--------	-------------------	-----------------------------------	--	---	--------------------	--------------------

7B. attēls. Meža cūku molekulāri bioloģisko izmeklējumu datu bāzē apkopotā informācija

Mājas cūku paraugi izvēlēti saskaņā ar projekta 1. gada rezultātiem – pēc iespējas jaunāki dzīvnieki no saimniecībām, kurās atbilstoši projekta 1. gadā iegūtajiem seroloģisko analīžu rezultātiem novērota augsta hepatīta E vīrusa antiviēlu sastopamība. Meža cūku paraugi izvēlēti no visas Latvijas teritorijas, taču lielākais īpatsvars bija Kurzemē nometītie dzīvnieki, kas skaidrojams ar to, ka šajā reģionā ir lielāks populācijas blīvums. Testēšanai atlasīti galvenokārt gadu vecas vai jaunākas meža cūkas. Kopumā izmeklēti 270 mājas cūku paraugu (202 asins paraugi un 68 audu paraugi) no 32 novietnēm un 361 meža cūku paraugi (300 asins paraugi un 61 audu paraugs).

Cūkgaļas un cūku aknas saturošu pārtikas produktu atlase molekulāri bioloģiskai izmeklēšanai

Projekta ietvaros HEV klātbūtnes analizēšanai tika izvēlētas trīs pārtikas produktu grupas: cūku aknas, malta cūkgaļa un rūpnieciski ražotas pastētēs, kuru sastāvā norādītas cūku aknas. Tika izveidota datu bāze, kurā reģistrēta informācija par ievāktajiem cūku aknas saturošajiem un cūkgaļas produktu paraugiem (8. attēls). Kopumā uz HEV RNS klātbūtni tika izmeklēti 57 pārtikas produktu paraugi: 15 paraugi no svaigām cūku aknām, 12 paraugi no maltas cūkgaļas, 29 pastētes paraugi, kuru sastāvā bija cūku aknas, un 1 fermentētas, vītīnātas desas paraugs. Pārtikas produktiem bija dažādu valstu izcelsme. Pārtikas produkti iegādāti mazumtirdzniecības vietās, t.sk. veikalos ķēdēs, galvenokārt Rīgā un tās apkaimē.

Nr.p.k.	Produkts	Masa	Ražotāja/ izcelsmes valsts	aknu saturs %	cūkgaļas saturs %	Homoge- nizēšana	1) RNS izdalīšana	2) RNS izdalīšana	rtRT-PCR (Jothikumar, 2006)	nested PCR ORF1 (Johne, 2009)	nested PCR ORF2 (Huang, 2002)	Sequen- cing ORF1	Sequen- cing ORF2
---------	----------	------	----------------------------------	------------------	----------------------	---------------------	----------------------	----------------------	-----------------------------------	---	---	-------------------------	-------------------------

8. attēls. Cūkgaļas un cūku aknu saturošo pārtikas produktu paraugu datu bāzē apkopotā informācija

1.2. Paraugu izmeklēšanas metodes

1.2.1. Seroloģiskās izmeklēšanas metodes

Antivielas pret HEV gan mājas, gan meža cūku asins paraugos tika noteiktas, izmantojot imūnfermentatīvo analīzi jeb ELISA testu. Vispirms visi asins paraugi tika izmeklēti ar *PrioCHECK® HEV Ab porcine* (Prionics, Šveice) netiešo skrīninga ELISA testu. Mājas un meža cūku asins paraugiem, kuriem šis tests uzrādīja rezultātu “aizdomīgs”, tika veikta papildus izmeklēšana ar *ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species* (ID.vet, Francija) netiešo verificējošo ELISA testu, lai precizētu šādu paraugu imunoloģisko statusu.

1.2.2. Molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas metodes

Mājas un meža cūku paraugu sagatavošana testēšanai

Gan mājas, gan meža cūkām testēšanai izmantots divu veidu bioloģiskais materiāls – asinis un audu suspensijas paraugi. Vīrusa RNS izolēšanai tika izmantotas divas dažādas metodes – manuāli ar *QIAamp cador® Pathogen Mini Kit* (QIAGEN) un automatizēti ar *NucliSENS® easyMAG* (bioMèrieux) reaģentu komplektu. Manuālā RNS ekstrakcijas metode tika pielietota 70,7% mājas cūku un 75,6% meža cūku paraugiem, bet automatizētā RNS ekstrakcijas metode tika izmantota 29,3% mājas cūku un 23,8% meža cūku paraugiem.

Cūkgaļas un cūku aknas saturošu pārtikas produktu sagatavošana testēšanai

Katrs pārtikas produkts tika testēts divos atkārtojumos. Vīrusa koncentrēšanai tika izmantota sekojoša metode [42]:

- nosver 3g produkta, ņemot 0.5 cm³ lielus gabaliņus no dažādām produkta vietām, homogenizē 30 ml PBS (*phosphate-buffered saline*) buferī 230 rpm 2 minūtes;
- iegūto suspensiju centrifugē 30 min 10 000 rpm +4°C, lai atbrīvotos no taukiem un pārtikas atliekām;
- supernatantu pārlej jaunā 50 ml stobriņā un pievieno ¼ tilpuma 5x PEG (*polyethylene glycol*)/NaCl, maisot inkubē +4°C 1 – 2 stundas;
- suspensiju centrifugē 30 min 10 000 rpm +4°C, supernatantu nolej, izveidojušās nogulsnes resuspendē 1 ml PBS un uzglabā -80°C līdz nukleīnskābju izdalīšanai.

HEV RNS tika izolēta no 200 µl PBS suspensijas pēc *QIAamp cador Patogen Mini Kit* (QIAGEN) protokola, kas tika izmantots arī dzīvnieku paraugiem un uzrādīja labus rezultātus. Atsevišķiem aizdomīgiem paraugiem tika veikta atkārtota RNS izdalīšana no lielāka daudzuma materiāla (800 – 1000 µl suspensijas), izmantojot *NucliSENS® easyMAG* reaģentus (bioMèrieux), kas ir rekomendēti darbam ar pārtikas vīrusiem, tomēr pozitīvs rezultāts nevienā no atkārtotajiem paraugiem netika iegūts.

Paraužu testēšana ar molekulārās bioloģijas metodēm

Projekta 2. gadā kā galvenā metode HEV RNS klātbūtnes noteikšanai tika izmantota *nested* RT-PCR reakcija, kas amplificē vīrusa ORF-1 fragmentu [43]. Pēc reakcijas apstākļu pielāgošanas šī metode bija jutīgāka (deva vairāk pozitīvu paraugu), salīdzinot ar projekta 1. gadā atstrādāto reālā laika RT-PCR metodi [44], turklāt iegūtos amplikonus iespējams uzreiz sekvenēt un izmantot vīrusa genotipēšanai. Ja *nested* RT-PCR ORF-1 deva pozitīvu signālu, tad šim paraugam papildus tika amplificēts ORF-2 fragments [45], un abi fragmenti izmantoti genotipa noteikšanai. Iegūto sekvenču analīzei izmantota starptautiskā sadarbības projekta *HEVnet* datubāze un tiešsaistes programma *Hepatitis E Virus Genotyping Tool Version 0.1* (programma: <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hev/>), sekvenču filoģenētiska analīze veikta, izmantojot programmu MEGA 7.0 [46], [47], [48], [49].

1.3. Ieteikumi HEV uzraudzībai, kontrolei un apkarošanai cūkkopības un cūkgaļas produktu nozares uzņēmumos

Cūku novietņu līmenī

HEV izplatība starp cūkām ir cieši saistīta ar fekālo piesārņojumu apkārtējā vidē, kas norāda uz iespēju samazināt inficēto cūku skaitu, ievērojot atbilstošas novietnes apsaimniekošanas, higiēnas (ieskaitot efektīvus dezinfekcijas pasākumus cūku turēšanas telpās un aprīkojuma dezinfekciju, ja to izmanto vairākos korpusos) un biodrošības prasības [50]. Vecums, kurā novēro HEV infekciju, ir saistīts ar novietnē izmantoto apsaimniekošanas veidu, piemēram, sivēnu grupēšanu pēc zīdīšanas perioda beigām un higiēnas prasību ievērošanas novietnē [51]. Lielākajā daļā pētījumu norādīts, ka visintensīvāk ar fekālijām HEV izdala sivēni 3 – 4 mēnešu vecumā [52], [53], [54], tikai dažiem dzīvniekiem novēro pozitīvu PCR rezultātu pēc 6 mēnešu vecuma (mazāk kā 10%) [55], [56]. Primāri, vīruss tiek izdalīts ar fekālijām, kā rezultātā HEV akumulējas dzīvnieku uzturēšanās vietās inficētajās fermās. Cūku izdalītais HEV uzkrājas kūtsmēslos. Atkarībā no grīdas seguma (režģu grīda vai pakaiši) cūkas ir pastāvīgā kontaktā ar kūtsmēsliem, līdz ar to arī ar HEV avotu fermu apkārtējā vidē. HEV izdalās ne tikai ar fekālijām, bet arī ar urīnu, kontaminējot dzeramā ūdens un barības uzglabāšanas vietas, līdz ar to barība un dzeramais ūdens var būt kā netieši HEV izplatīšanās vektori no vienas dzīvnieku grupas uz otru [53].

Cūku savstarpējais kontakts katru dienu, īpaši, ja ir liels dzīvnieku blīvums paātrina HEV izplatību novietnes vidē. Vairums pētījumu pierāda, ka fekāli – orālais inficēšanās ceļš ir galvenais HEV izplatīšanas veids cūkām [57], [52], [58], [59], [60].

Viena no iespējamām kontroles opcijām varētu būt izvairīšanās no HEV ienešanas fermā, tādējādi uzturot ganāmpulku brīvu no HEV infekcijas. Ja tas nav iespējams, tad kā cita kontroles opcija tiek minēta HEV inficēto cūku skaita samazināšana kaušanas vecumā, lai virēmija, aknu infekcija un vīrusa izdalīšanās no organisma notiktu pietiekami ilgu laiku pirms kaušanas, tādējādi izvairoties no kautķermeņu kontaminācijas kautuvē. Risks, ka cūku aknas būs HEV pozitīvas pieaug, ja cūkas tiek kautas agrā vecumā [1], [24]. Arī cūku audzēšana pa partijām jeb cikliem un efektīva tīrīšana un dezinfekcija pirms jaunas partijas ielaišanas telpās tiek minēts kā

HEV izplatību mazinošs faktors cūku novietnēs. Jāsamazina mājas cūku kontakta iespējas ar savvaļas dzīvniekiem, īpaši meža cūkām, kas ir HEV rezervuārs [1].

Arī citu infekcijas slimību kontrole ir būtisks HEV izplatības samazināšanas solis. Jo inficējoties ar citiem slimību ierosinātājiem, piemēram cūku reprodiktīvi respiratorā sindroma vīrus, kas bieži sastopams cūkkopībā, cūkām samazinās imunitāte un organisma spēja pretoties pret citām infekciju slimībām, to skaitā arī HEV [33].

Kā potenciāls HEV kontroles veids varētu būt cūku vakcinācija pret HEV. Līdzšinējie pētījumi parāda, ka cilvēkiem ražotā HEV vakcīna bija efektīva izmantošanai trušiem, bet trūkst pētījumu par šīs vakcīnas efektivitāti cūkām. Šobrīd arī nav komerciāli pieejama vakcīna pret HEV [1], [61].

Cūkgaļas produktu nozares uzņēmumos

Šobrīd nav oficiālas HEV kontroles politikas dzīvniekiem. Inficētie dzīvnieki bieži neizrāda klīniskās pazīmes, tādēļ var tikt nosūtīti uz kautuvi, kā rezultātā HEV kontaminēti orgāni un gaļa nonāk pārtikas ķēdē. Kautuvē daļu dzīvnieku pārnēsāto patogēnu, kā piemēram, HEV nav iespējams atklāt ikdienas gaļas inspekcijās (pirmskaušanas un pēckaušanas). Tādēļ esošajiem ierobežojumiem, kas jāievēro, lai izvairītos vai samazinātu kautķermeņu kontamināciju ar fekālijām, ir būtiska nozīme kautķermeņa virsmas kontaminācijas ar HEV samazināšanai. Ievērojot labturības noteikumus un t.s. labu praksi cūku transportēšanas laikā, pirmskaušanas turēšanas laikā un kautuvē, kā arī pašā kaušanas procesā un kautķermeņu uzglabāšanas procesā, iespējams samazināt cūkgaļas krustkontamināciju ar HEV. Zarnu trakta izņemšana jāveic uzmanīgi, lai neradītu tā perforāciju un izvairītos no kautķermeņa un instrumentu kontaminācijas ar zarnu saturu. Jāuzmanās arī no kautķermeņa kontaminācijas ar žulti [1].

Attiecīgais inventārs un instrumenti, īpaši naži, ir jālieto tikai tam paredzētajā darbībā. Šis noteikums kategoriski jāievēro, kad tiek veikta iekšējo orgānu izņemšana. Naži un griešanas instrumenti robotos ir jāapstrādā ar karstu ūdeni (85°C 15 sek.) pēc katras operācijas [1].

Pētījumi ir pierādījuši, ka kautuvju darbiniekiem novēro augstāku HEV antivielu prevalenci nekā cilvēkiem, kuri nav pakļauti regulāram kontaktam ar cūkām (attiecīgi 42% un 16%) [62], kautuvju darbinieki un pārtikas ražotnē iesaistītais personāls ir jāinformē par HEV un jāveicina, lai viņi ievēro labas higiēnas prakses prasības. Īpaši jāpievērš uzmanība ādas nobrāzumu aizsardzībai, lai izvairītos no inficēšanās tieša kontakta ceļā. Personāla inficēšanās risku var samazināt, ja tiek lietots speciāli paredzētais aizsargapģērbs un individuālie aizsardzības līdzekļi [1], [63].

Kaušanas laikā dzīvniekiem infekciozs vīruss var būt arī asinīs un aknās, līdz ar to arī pašā gaļā vai subproduktos, tādēļ pasākumi, lai novērstu krustkontamināciju šajā gadījumā nebūs pietiekoši efektīvi. Šādā gadījumā jāpievērš uzmanība, lai HEV tiktu inaktivēts, ievērojot atbilstošu produktu termisko apstrādi. Tādēļ ir ieteicams apsvērt papildus pārbaudes gaļai un iekšējiem orgāniem, kuri paredzēti patēriņam jēlā vai viegli pagatavotā (ne līdz galam pagatavotā) veidā, kura laikā HEV netiek pilnīgi inaktivēts [1].

2. Rezultāti un diskusija

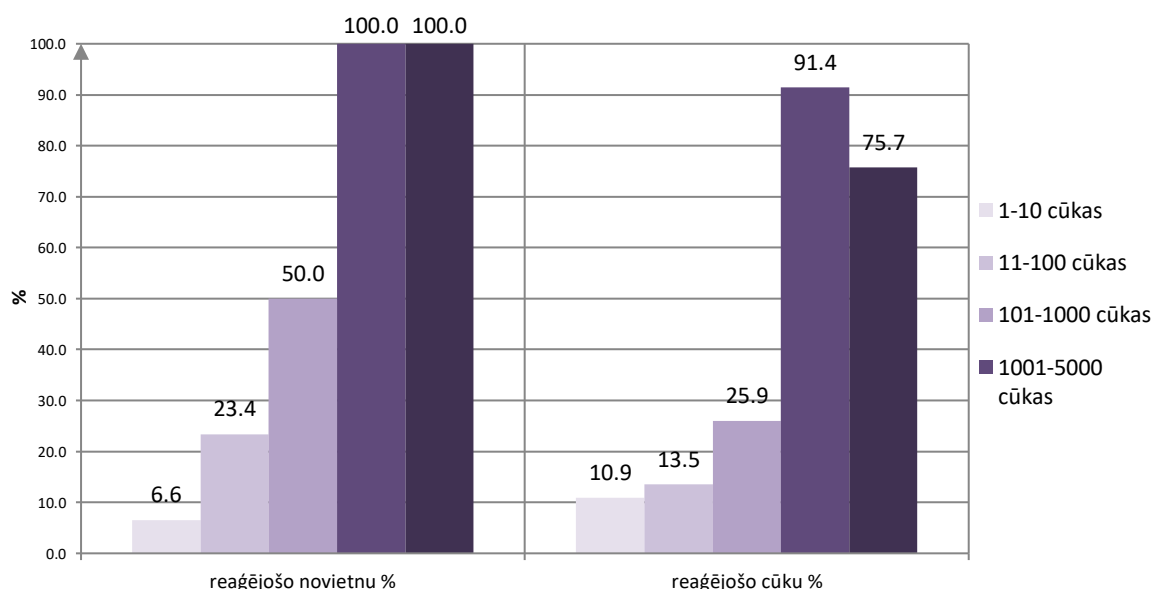
2.1. Seroloģisko izmeklējumu rezultāti un diskusija

2.1.1. HEV antivielu sastopamība mājas cūku populācijā

Projekta izpildes laikā tika izmeklēti 1254 mājas cūku asins paraugi no 157 novietnēm visā Latvijas teritorijā. Veicot paraugu seroloģisko izmeklēšanu, 46,4% no tiem tika konstatētas antivielas pret hepatīta E vīrusu. Antivielas pret HEV mājas cūkām tika konstatētas 38 novietnēs.

Iegūtie rezultāti norāda (skat. 9. attēlu), ka ganāmpulka līmenī visbiežāk HEV antivielas (100,0%) konstatētas lielās un ļoti lielās cūku novietnēs, savukārt visretāk (6,6%) ļoti mazās novietnēs. Antivielas pret HEV vidēja un maza izmēra novietnēs konstatētas attiecīgi 50,0% un 23,4% gadījumu. Vairākos literatūras avotos [3], [19], [20], [21], [22] ļoti mazas līdz vidēja izmēra saimniecības tiek biežāk norādītas kā HEV rezervuāri, jo tās biežāk tiek apsaimniekotas kā bioloģiskās saimniecības. Lai gan šajā pētījumā iegūtie rezultāti pierāda antivielu klātbūtni arī šāda izmēra saimniecībās, ievērojami biežāk HEV antivielas tika novērota lielās un ļoti lielās, industrializētās saimniecībās.

Analizējot seroloģiskos rezultātus dzīvnieku individuālā līmenī (skat. 9. attēlu), novērojām, ka biežāk antivielas pret HEV bija sastopamas lielās (91,4%) un ļoti lielās (75,7%) cūku novietnēs. Savukārt visretāk antivielas pret HEV tika novērotas ļoti mazās novietnēs (10,9%), kam seko mazas (13,5%) un vidēja izmēra (25,9%) novietnes. Šādi novērojumi individuālu dzīvnieku līmenī sakrīt ar literatūrā pieejamo informāciju [3], [53], ka lielum dzīvnieku skaitam uzturoties ciešā kontaktā, dalot ūdeni un barību, vīrusa izplatīšanās tiek veicināta.



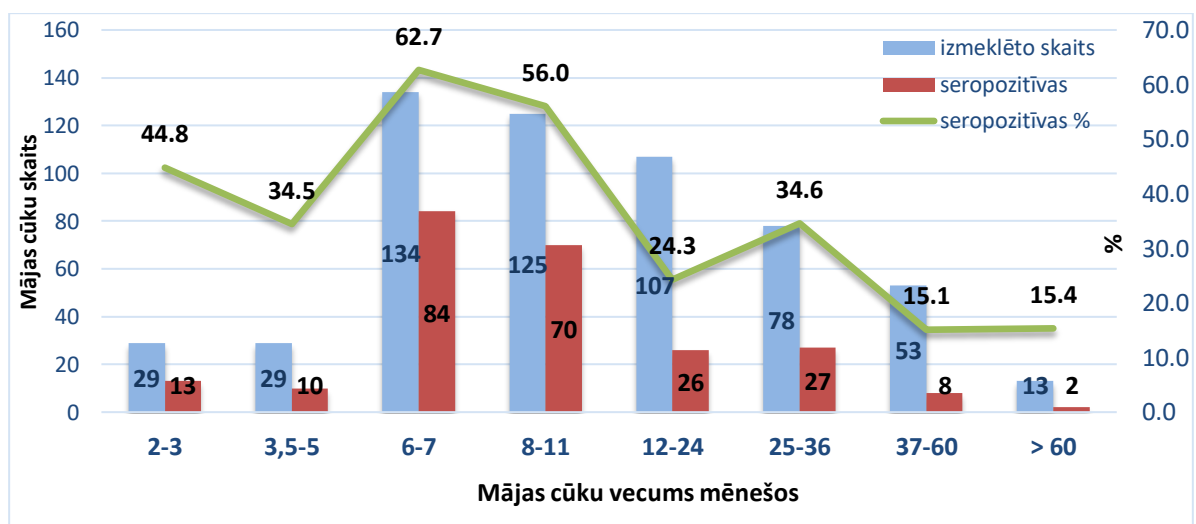
9. attēls. Seroreagējošu mājas cūku novietņu un dzīvnieku skaits %, iedalot novietnes pēc cūku skaita tajās.

Analizējot seroloģiski reagējošo cūku skaitu dažāda tipa novietnēs, novērojām, ka novietnēs, kas koncentrējas uz sivēnu ražošanu, uzturot tikai vaislas dzīvnieku populāciju, HEV

antivielas konstatētas visbiežāk – attiecīgi 55,6%. Slēgta ražošanas cikla novietnēs antivielas pret HEV konstatētas 27,0% gadījumu, savukārt nobarošanas tipa novietnēs HEV antivielas netika konstatētas.

Līdzīgi rezultāti tika iegūti, analizējot antivielu sastopamību dzīvnieku individuālā līmenī katrā no grupām: 64,6% dzīvnieku sivēnu ražošanas novietnēs konstatētas antivielas pret HEV, kam seko slēgta ražošanas cikla novietnes ar 46,6% reaģējošu dzīvnieku, savukārt nobarošanas tipa novietnēs nevienai cūkai netika konstatētas antivielas pret hepatīta E vīrusu. Šis novērojums netieši norāda uz to, ka HEV antivielas sastopamas cūku novietnēs, kurās tiek turētas pieaugušas cūkas, jo gan slēgta tipa, gan sivēnu ražošanas tipa saimniecībās ir pieaugušas vaislas cūkas. Taču ir nepieciešami plašāki pētījumi, lai apstiprinātu šādu pieņēmumu.

Precīzs vecums cūkām bija zināms 568 (45,3%) no izmeklētajiem mājas cūku paraugiem. Seroreagējošo mājas cūku skaits attiecīgajā vecuma grupā redzams 10. attēlā. Iegūtie rezultāti norāda, ka antivielas mājas cūkām pret HEV biežāk konstatētas 6-7 un 8-11 mēnešu vecumā, attiecīgi 62,7% un 56%. Literatūrā pieejamā informācija [52] liecina, ka līdzīgi dati iegūti arī citos pētījumos, norādot, ka HEV antivielas 6,5 mēnešus vecām cūkām konstatētas 50 – 100% gadījumu.



10. attēls. Seroreagējošo mājas cūku skaits atkarībā no vecuma.

Daudz lielākai izmeklēto paraugu daļai, 912 paraugiem (72,7%), bija zināma informācija par fizioloģisko vecuma grupu. Cūkas tika iedalītas trīs grupās – nobarojamās cūkas, jauncūkas/remontcūkas un sivēnmātes un kuļi. Jāņem vērā, ka precīzu vecumu katrai no šīm grupām ir grūti noteikt, jo gan nobarojamās cūkas, gan jauncūkas/remontcūkas ir sivēni no to atšķiršanas vecuma līdz vai nu nokaušanai, vai vaislas gatavības sasniegšanai. Lai gan dzīves ilgums šīm grupām mēdz pārklāties, nobarojamās cūkas nosacīti var uzskatīt par jaunāku fizioloģiskā vecuma grupu nekā jauncūkas/remontcūkas, jo nobarojamās cūkas tiek nokautas pirms vaislas gatavības sasniegšanas (vidēji 5 – 6 mēnešu vecumā). Sivēnmātes un kuļi reprezentē pieaugušus, dzimumgatavību sasniegušus individuus. Visretāk antivielas konstatētas nobarojamās cūkās – 24,3% gadījumu, bet visbiežāk – vaislas jauncūkās (77,2%). Iegūtie rezultāti apliecina literatūrā atrodamo informāciju [2], ka HEV vairāk apdraud sivēnu

populācijas. Salīdzinot nobarojamos sivēnus ar vaislas jauncūkām, antivielas pret HEV ~3,2 reizes biežāk konstatētas vaislas jauncūkās.

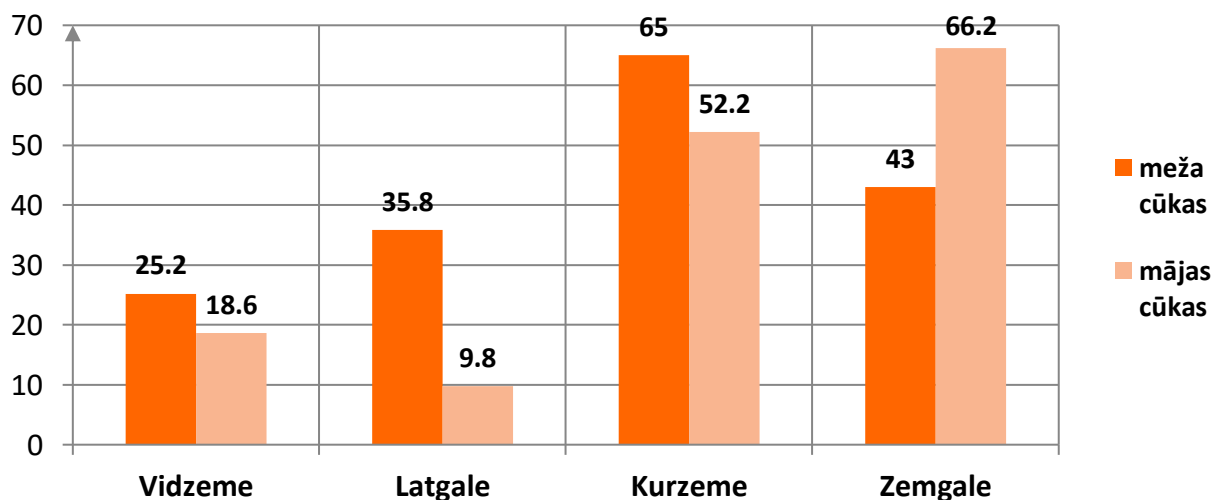
Jāpiemin, ka nobarojamo cūku paraugi, kuros tika konstatētas antivielas pret HEV, bija no slēgta ražošanas cikla saimniecībām. Jau iepriekš tika aprakstīts, ka pētījumā iekļautajās nobarošanas tipa saimniecībās cūkām netika konstatētas HEV antivielas.

2.1.2. HEV antivielu sastopamība meža cūku populācijā

Projekta izpildes laikā izmeklēšanai uz HEV antivielām ievākti 450 meža cūku asins paraugi no visas Latvijas teritorijas. No izmeklētajiem paraugiem 40,9% tika konstatētas antivielas pret HEV.

Izmeklēto meža cūku paraugi tika sadalīti trīs vecuma grupās, balstoties uz informāciju, ko snieguši mednieki, nododot paraugu. Vienam no paraugiem vecums netika norādīts. Pamatojoties uz šādu iedalījumu, novērojām, ka, pieaugot meža cūku vecumam, pieaug arī cūku skaits, kurām konstatētas antivielas pret hepatīta E vīrusu. Arī literatūrā pieejamā informācija [13] liecina par to, ka meža cūkās biežāk inficēšanās ar HEV konstatēta pieaugušos īpatņos.

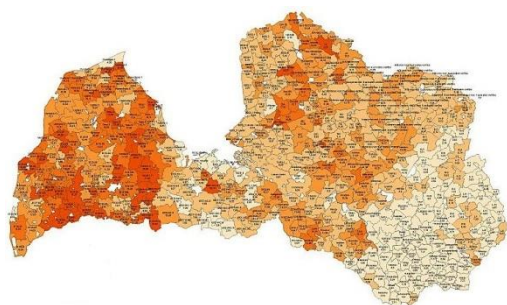
Analizējot rezultātus, Latvijas valsts teritorija tika sadalīta vēsturiskajos novados: Vidzeme, Latgale, Kurzeme un Zemgale. Šādi rezultāti norāda uz izteiktāku antivielu cirkulāciju mājās un meža cūku populācijās Kurzemē un Zemgalē (11. attēls).



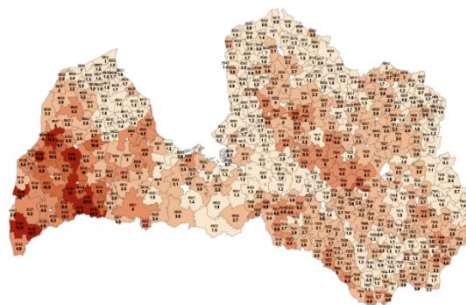
11. attēls. Seropozitīvo mājas un meža cūku skaits procentos katrā no valsts reģioniem.

Novērojums, ka HEV antivielas relatīvi retāk sastopamas meža cūkām Vidzemē un Latgalē, salīdzinot ar Kurzemi un Zemgali, skaidrojams ar meža cūku blīvumu šajos reģionos. Kurzemē un Zemgalē vienmēr ir bijis lielāks meža cūku blīvums nekā Latgalē un Vidzemē (pēc Valsts meža dienesta datiem [64]) (skat. 12A. un 12B. attēlus). Iespējams, ka reģionos ar mazāku meža cūku blīvumu, infekcijas slimību, kas izplatās dzīvnieku tiešā kontaktā, tajā skaitā HEV, izplatība tiek dabīgi ierobežota. Turklāt, ņemot vērā savstarpējo vīrusa uzņēmību starp mājās un meža cūkām, arī zemāka HEV antivielu cirkulācija mājās cūkās šādos reģionos var tikt skaidrota ar zemāku HEV antivielu sastopamību meža cūkām.

Jāmin arī apstākļi, ka pēdējos 4 gados Āfrikas cūku mēra dēļ notiek meža cūku aktīva (finansiāli atbalstīta sīviešu kārtas meža cūku) populācijas samazināšana Vidzemē un Latgalē. Tikai kopš 2016. gada arī Kurzemē un Zemgalē norit aktīvas medības šīs infekcijas slimības ierobežošanas nolūkos. Dzīvnieku savstarpējās kontaktēšanās iespējas samazinās, ja dzīvnieku blīvums ir zemāks. Tādejādi tiek ierobežota arī infekcijas slimību izplatība konkrētā populācijā, kad slimības ierosinātāja inficēts dzīvnieks kontakta ceļā nodod saslimšanu citiem dzīvniekiem. Domājams, ka pateicoties aktīvai meža cūku skaita kontrolei Vidzemē un Latgalē, izdevies netieši samazināt arī HEV sastopamību šajos reģionos.



12A. attēls. Meža cūku blīvums Latvijas teritorijā 2013.gadā.



12B. attēls. Meža cūku blīvums Latvijas teritorijā 2018.gadā.

Salīdzinot vidējo HEV antivielu sastopamību mājas cūkām (46,4%) un meža cūkām (40,9%), līdzīgi kā citās Eiropas valstīs tā ir augstāka mājas cūku populācijā. Salīdzinot ar tuvākajām kaimiņvalstīm Lietuvu un Igauniju, HEV antivielu sastopamība mājas cūkām Latvijā ir zemāka nekā Igaunijā (62%), bet augstāka nekā Lietuvā (44%). Savukārt meža cūku populācijā HEV antivielu sastopamība ir augstāka nekā Igaunijā (17%), bet zemāka nekā Lietuvā (57%) [37], [34].

Kopumā šī projekta seroloģisko izmeklējumu rezultāti norāda uz vērā ņemamu hepatīta E vīrusa antivielu cirkulāciju gan mājas, gan meža cūku populācijās. Tā kā antivielu klātbūtne norāda uz iepriekšēju organisma saskarsmi ar slimības ierosinātāju, tad iegūtie rezultāti liecina par aktīvu dzīvnieku saskarsmi arī ar pašu slimības ierosinātāju – hepatīta E vīrusu.

2.2. Molekulāri bioloģisko izmeklējumu rezultāti un diskusija

2.2.1. HEV sastopamība un genotipu daudzveidība mājas cūku populācijā

Projekta ietvaros tika pārbaudīti 270 mājas cūku asins un audu paraugi, no kuriem 17 jeb 6,3% tika konstatēta HEV RNS klātbūtne. Lai salīdzinātu dažādu faktoru ietekmi uz HEV klātbūtni mājas cūku populācijā, tika aprēķināta riska attiecība (*odds ratio* – *OD*). Kā galvenie riska faktori (2. tabula) tika identificēti cūku novietnes atrašanās vieta, Kurzemē identificējot līdz pat 18,9% pozitīvu paraugu, un cūku vecums – mājas cūkām, kuras nav sasniegušas četrus mēnešu vecumu HEV RNS tika novērots 19,3% gadījumu. No pētījumā izmeklētajām 32 novietnēm HEV pozitīvi

paraugi tika konstatēti piecās dažādās novietnēs – pa vienai Vidzemē un Zemgalē, savukārt Kurzemē trīs novietnēs konstatēti 15 HEV pozitīvas mājas cūkas.

Salīdzinot ar citiem tuvējās valstīs veiktiem pētījumiem, Lietuvā, izmeklējot 470 mājas cūku serumu paraugus, HEV RNS tika konstatēts 32,98%, bet testēto dzīvnieku vecums nebija norādīts [36]. Igaunijā 2 – 4 mēnešus vecu sivēnu fekāliju paraugos HEV RNS detekcijas biežums bija 22,9%, kopumā tika testēti 449 paraugi [34]. Lielbritānijā veiktā pētījumā konstatēts, ka no 629 cūku paraugiem, kas ievākti kautuvēs, uz HEV RNS klātbūtni pozitīvi bija 5,7% seruma paraugu un 17% zarnu paraugu. Minēts, ka 90% no dzīvniekiem bija jaunāki par 12 mēnešiem, bet precīzāks vecums netiek norādīts [31]. Citā pētījumā no Francijas kautuvēm, analizējot tikai mājas cūku paraugus no seropozitīvām fermām, divos no 24 jeb 8,3% paraugu tika konstatēta HEV RNS klātbūtne, abi šie dzīvnieki bija jaunāki par sešiem mēnešiem [65]. Mūsu veiktajā pētījumā iegūtie rezultāti atbilst iepriekš publicētajiem datiem. Gandrīz 70% mūsu pētījumā iekļauto mājas cūku bija četrus un vairāk mēnešus vecas, līdz ar to pārslimojušas HEV aktīvo fāzi, ko parasti novēro 2 – 3 mēnešu vecumā. Savā starpā salīdzinot dažādu pētījumu rezultātus, jāņem vērā, ka pētījumi veikti ar dažādiem paraugiem – asins serumu, aknu audiem, fekālijām u.c., kā arī lietojot atšķirīgas paraugus vākšanas, RNS ekstrakcijas un testēšanas metodes, rezultāti pat vienai un tai pašai paraugkopai var ļoti variēt [31], [36].

2. tabula

Dažādu faktoru ietekme uz mājas cūku HEV pozitīvo paraugu noteikšanas biežumu.

		Mājas cūkas			
		n	Pozitīvi, n	Pozitīvi, %	OR, p vērtība
Parauga ģeogrāfiskā izcelsme	Kurzeme	79	15	18.9%	22.1, p<0.005
	Zemgale	85	1	1.2%	0.1, p=0.012
	Vidzeme	101	1	0.9%	0.1, p=0.003
	Latgale	5	0	0.0%	0, p=0.587
	Kopā	270	17	6.3%	
Vecuma grupa	Mājas: līdz 4 mēnešu vecumam	83	16	19.3%	36.2, p<0.005
	Mājas: 4-6 mēnešus vecas	187	1	0.5%	0.03, p<0.005
Testējamais paraugs	Asinis	202	0	0.0%	0, p<0.005
	Audu paraugi	68	17	25.0%	Inf, p<0.005
RNS ekstrakcijas metode	Manuāli/ <i>QIAamp cador Pathogen</i>	191	17	8.9%	Inf, p=0.002
	Automatizēti/ <i>NucliSENS easyMAG</i>	79	0	0.0%	0, p=0.002

Lai gan 2. tabulā redzams, ka būtiska ietekme uz pozitīvo paraugu biežumu ir arī testējamā parauga veidam un RNS izdalīšanas metodei, šīs, visticamāk ir novirzes, kas radušās koncentrējoties uz noteiktu dzīvnieku grupu. Līdz 4 mēnešu veciem sivēniem testēšanai bieži tiek iesūtīts patoloģiskais materiāls jeb audu paraugi un šāda tipa paraugiem RNS ekstrakcija vienmēr tiek veikta manuāli. Četrus mēnešus un vecākām mājas cūkām slimību uzraudzībai bieži tiek izmantoti individuālu dzīvnieku asins paraugi, pie tam RNS ekstrakcijai var tikt izmantota arī automatizēta iekārta, taču, saskaņā ar literatūru, šajā vecumā sivēni visbiežāk HEV jau ir pārslimojuši un akūta virēmija novērojama tikai atsevišķiem dzīvniekiem [52]. Meža cūku paraugkopā šie faktori savu nozīmi vairs nesaglabā, līdz ar to nav pamata uzskatīt, ka metožu

izvēle ir ietekmējusi pētījuma rezultātus. Projekta ietvaros pētījuma pirmajā gadā tika ievākti arī cūku fekāliju paraugi no kautuvēm (no 6 mēnešus un vecākām mājas cūkām), tomēr HEV sastopamība šajā vecuma grupā vērtējama kā ļoti zema, tādēļ ierobežota finansējuma dēļ šo paraugu izmeklējumi netika turpināti.

Visiem pētījumā iegūtajiem pozitīvajiem paraugiem tika veikta sekvenēšana, 16 no 17 paraugiem izdevās iegūt sekvences. Visos gadījumos iegūtā sekvence piederēja *Ortohepevirus* ģintij HEV 3 genotipam (3g, 3e un 3l).

2.2.2. HEV sastopamība un genotipu daudzveidība meža cūku populācijā

Kopumā tika izmeklēti 361 meža cūku asins un audu paraugi, no kuriem 38 jeb 10,5% tika konstatēta HEV RNS klātbūtne. Arī meža cūku populācijā galvenie riska faktori saistīti ar parauga ģeogrāfisko izcelsmi un meža cūku vecumu – Kurzemē HEV RNS tika konstatēts 16,5% testēto dzīvnieku, un vīrusa klātbūtne netika konstatēta nevienai meža cūkai, kura vecāka par 12 mēnešiem (3. tabula).

3. tabula

Dažādu faktoru ietekme uz meža cūku HEV pozitīvo paraugu noteikšanas biežumu.

		Meža cūkas			
		n	Pozitīvi, n	Pozitīvi, %	OR, p vērtība
Parauga ģeogrāfiskā izcelsme	Kurzeme	145	24	16.6%	2.86, p=0.002
	Zemgale	50	4	8.0%	0.71, p=0.369
	Vidzeme	81	1	1.2%	0.08, p<0.005
	Latgale	85	9	10.6%	1.00, p=0.561
	Kopā	361	38	10.5%	
Vecuma grupa	Meža: 12 mēneši un jaunākas	311	38	12.2%	Inf, p=0.002
	Meža: vecākas par 12 mēnešiem	50	0	0.0%	0, p=0.002
Testējamais paraugs	Asinis	300	30	10.0%	0.74, p=0.300
	Audu paraugi	61	8	13.11%	1.36, p=0.300
RNS ekstrakcijas metode	Manuāli/ <i>QIAamp cadof Pathogen</i>	273	25	9.1%	0.56, p=0.089
	Automatizēti/ <i>NucliSENS easyMAG</i>	86	13	15.1%	1.77, p=0.089

Līdzīgi rezultāti meža cūku populācijā novēroti arī Igaunijā – 16% paraugu konstatēja HEV RNS [34], Vācijā HEV RNS konstatēja 11,0% meža cūku paraugu [66], savukārt, Horvātijā – 11,5% [67]. Lietuvā HEV RNS mežacūku paraugos konstatēts 25,94% [36]. Latvijā HEV konstatēšanas biežuma atšķirības starp noteiktiem reģioniem skaidrojamas ar atšķirīgo meža cūku populācijas blīvumu – Kurzemē tas ir lielāks, salīdzinot ar citiem reģioniem. Jāpiemin arī, ka slimojošo īpatņu skaits gadu no gada var variēt [66], tādēļ būtu nepieciešams veikt regulāru monitoringu, lai novērtētu patieso infekcijas izplatību valstī.

Visiem pētījumā iegūtajiem pozitīvajiem paraugiem tika veikta sekvenēšana, 26 no 38 paraugiem izdevās iegūt sekvences. Visos gadījumos iegūtā sekvence piederēja *Ortohepevirus* ģintij HEV 3 genotipam. Meža cūku populācijā, salīdzinot ar mājas cūkām, cirkulē atšķirīgi HEV genotipi – 3c, 3i, 3g. Interesanti, ka Lietuvā HEV 3i genotips atrasts mežacūkām un arī briežu paraugos [36].

2.2.3. HEV sastopamība cūkgaļā un cūku aknas saturošos pārtikas produktos

Projekta ietvaros tika pārbaudīti 57 dažādi cūkgaļu vai cūku aknas saturoši pārtikas produkti, kas pieejami mazumtirdzniecībā. Tikai vienā no tiem jeb 1.75% paraugu tika konstatēta HEV RNS klātbūtne. Šis paraugs bija Latvijā ražota pastēte, kur cūku aknu saturs bija 32% no kopējās masas.

Jāņem vērā, ka svaigas cūku aknas reprezentē pārtikas produktu, kas iegūts no individuāla dzīvnieka, visticamāk arī maltā gaļa paraugu sagatavošanai iegādātajos apjomos (100 – 200 g) iegūta no viena dzīvnieka. Šajā pētījumā mājas cūkām kaušanas vecumā tikai vienai no 188 cūkām (0,5%) tika konstatēta HEV RNS klātbūtne, saglabājot risku izplatīt infekciju apkārtējā vidē un pārtikā. Lai iegūtu reprezentatīvus datus par HEV sastopamību šajās pārtikas produktu grupās, pētījumā nepieciešams iekļaut daudz lielāku paraugu apjomu. Savukārt pastētes ražošanai lielos apjomos tiek izmantotas aknas no vairākiem dzīvniekiem, kas tiek pilnībā homogenizētas, līdz ar to pieaug risks, ka ražošanā izmantojot tikai viena HEV inficēta dzīvnieka aknas, kontaminēta būs liela daļa no saražotās pārtikas produkta partijas.

Līdz šim HEV izplatība pārtikā nav sistemātiski uzraudzīta, līdz ar to nav harmonizētas metodes vīrusa testēšanai dažādās matricās, šo un citu faktoru ietekmē rezultāti dažādos pētījumos variē. Piemēram, svaigās cūku aknās no kautuvēm rezultāti atšķiras pat 10 reizes un HEV konstatēts no 1,3% līdz 13,5%, tāpat arī mazāk par 10% HEV pozitīvu cūku aknu paraugu konstatēts mazumtirdzniecībā [1], kas nozīmē, ka nepieciešams vismaz 100 individuālu paraugu izmeklēšana, lai varētu iegūt objektīvus rezultātus. Analizējot HEV klātbūtni desiņās, kas gatavotas no cūkas gaļas un/vai aknām, vairākos pētījumos ziņots par pozitīviem rezultātiem – Spānijā 6% (6/93), bet Čehijā un Itālijā HEV netika atrasts 92 un 128 analizētajos minēto desiņu paraugos [68]. Vācijā tirdzniecībā konstatēti 22% (11/50) HEV kontaminētu aknu desiņu [69]. Mūsu pētījumā izvēlētā produktu grupa “aknu pastētes” varētu būt līdzvērtīga šajos pētījumos izmantotajām aknu desiņām, tikai jāņem vērā atšķirības pagatavošanas tehnoloģijā, piemēram, termiskā apstrāde, aknu saturs produktā u.c.

Analizējot pozitīvā parauga sekvenci, tika noteikts, ka tas pieder pie HEV 3c genotipa. Šis genotips netika konstatēts mājas cūkām, bet tika novērots atsevišķām meža cūkām, tomēr sekvenču līdzība nebija pietiekama, lai varētu izdarīt secinājumus par HEV kontaminācijas iespējamo avotu.

3. Secinājumi

1. Mājas cūkām HEV antivielas tika novērotas nedaudz biežāk (46,4%) nekā meža cūkām (40,9%).
2. Antivielas pret HEV gan ganāmpulka līmenī, gan individuālu dzīvnieku līmenī biežāk tika konstatētas lielās (1001 – 5000 cūku) un ļoti lielās (5001 < cūku) mājas cūku novietnēs, kā arī tādās novietnēs, kuras nodarbojas ar sivēnu ražošanu.
3. Mājas cūku novietnēs, kas nodarbojas tikai ar cūku nobarošanu, antivielas pret HEV netika konstatētas.
4. Mājas cūkām antivielas pret HEV biežāk tika konstatētas 6 – 7 un 8 – 11 mēnešu vecumā, bet meža cūkām 3 līdz 5 gadu vecumā.
5. HEV vīrusa klātbūtne konstatēta 6,9% analizēto mājas cūku paraugu, visbiežāk tas konstatēts mājas cūkām, kuras jaunākas par 4 mēnešiem.
6. HEV vīrusa klātbūtne konstatēta 38 no 361 analizētajiem meža cūku paraugiem, visbiežāk tas konstatēts meža cūkām, kas ir 12 mēnešus vecas un jaunākas.
7. Gan mājas, gan meža cūkām HEV nozīmīgi biežāk konstatēts Kurzemes reģionā. HEV antivielu sastopamība gan mājas cūkām, gan meža cūkām augstāka bija Kurzemē un Zemgalē.
8. Mājas cūku un meža cūku populācijā cirkulē dažādi HEV genotipi, kas starp populācijām nepārklājas.
9. Vienā no 29 analizētajiem pastētes paraugiem tika konstatēta HEV RNS klātbūtne, datu par dzīvotspējīgu vīrusu nav. Pastētes paraugā detektētais HEV pieder pie 3c genotipa un ir atšķirīgs no šajā pētījumā konstatētajiem vīrusiem mājas cūku populācijā.

Projekta vadītāja: Žanete Šteingolde

Literatūras saraksts

- [1] European Food Safety Organization (EFSA), "Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV)", *EFSA Journal*, 2017.
- [2] Murrison L.B., Sherman K.E., "The Enigma of Hepatitis E Virus,» *Gastroenterology & Hepatology*", 13 (8), pp. 484-491, 2017.
- [3] Salines M., Andraud M., Rose N., "From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review", *Veterinary Research*, 48 (1), pp. 31-44, 2017.
- [4] World Health Organization, "World Health Organization: Hepatitis E", 19 September 2018, Available: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. [1 October 2018].
- [5] Berto A., Backer J.A., Mesquita J.R., Nascimento M.S., Banks M., Martelli F., Ostanello F., Angeloni G., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Vasickova P., Diez-Valcarce M., Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., van der Poel W.H., "Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries", *BMC Research Notes*, 5, 2012.
- [6] Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., Vettorazzi E., Lohse A.W., Dalton H.R., Pischke S., "Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis", *Viruses*, 8, 2016.
- [7] Group, WHO Hepatitis E Vaccine Working, "Hepatitis E: epidemiology and disease burden", WHO Strategic Advisory Group of Experts, Geneva, 2014.
- [8] Tolmane I., Lauva E., Laivacuma S., Madelāne M., Rozentāle B., "Latvijas Infektologu, hepatologu un HIV/AIDS speciālistu asociācija", 2015. Available: http://www.infekcija.lv/wp-content/uploads/2015/08/E_v%C4%ABrushepat%C4%ABts.pdf. [2 October 2018].
- [9] Slimību profilakses un kontroles centrs, "Slimību profilakses un kontroles centrs", 2018. Available: <https://www.spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/infekcijas-slimibas/valsts-statistikas-parskati/statistikas-parskati>. [2 October 2018].
- [10] Syed S.F., Zhao Q., Umer M., Alagawany M., Ujjan I.A., Soomro F., Bangulzai N., Baloch A.H., Abd El-Hack M., Zhou E.M., Arain M.A., "Past, present and future of hepatitis E virus infection: Zoonotic perspectives", *Microbial Pathogenesis*, 119, pp. 103-108, 2018.
- [11] M. Boadella, "Hepatitis E in wild ungulates: A review", *Small Ruminant Research*, 128, pp. 64-71, 2015.
- [12] Dalton H.R., Seghatchian J., "Hepatitis E virus: Emerging from the shadows in developed countries", *Transfusion and Apheresis Science*, 55, (3), pp. 271-274, 2016.
- [13] Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., John R., "Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human", 48 (78), 2017.

- [14] Sridhar S., Lau S.K.P., Woo P.C.Y., "Hepatitis E: A disease of reemerging importance", *Journal of the Formosan Medical Association*, 114 (8), pp. 681-690, 2015.
- [15] Hakze-van der Honing R.W., van Coillie E., Antonis A.F., van der Poel W.H., "First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium", *PLoS One*, 6 (8), 2011.
- [16] Pérez-Gracia M.T., García M., Suay B., Mateos-Lindemann M.L., "Current Knowledge on Hepatitis E", *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3, pp. 117-126, 2015.
- [17] Barnaud E., Rogée S., Garry P., Rose N., Pavio N., "Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food", *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2012.
- [18] Lange H., Øverbø J., Borgen K., Dudman S., Hoddevik G., Urdahl A.M., Vold L., Sjurseth S.K., "Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine", *Epidemiology and Infection*, 145, pp. 181-186, 2017.
- [19] Jinshan, Jirintai, Manglai D., Takahashi M., Nagashima S., Okamoto H., "Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia", *Archives of Virology*, 155, 2010.
- [20] Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M., "Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy", *Veterinary Microbiology*, 132, 2008.
- [21] Hinjoy S., Nelson K.E., Gibbons R.V., Jarman R.G., Chinnawirotpisan P., Fernandez S., Tablerk P., Labrique A.B., Patchanee P., "A cross-sectional study of hepatitis E virus infection in pigs in different-sized farms in northern Thailand", *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 2013.
- [22] Li W., She R., Wei H., Zhao J., Wang Y., Sun Q., Zhang Y., Wang D., Li R., "Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China", *Veterinary Microbiologist*, 133, 2009.
- [23] Rutjes S.A., Bouwknegt M., van der Giessen J.W., de Roda Husman A.M., Reusken C.B., "Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in The Netherlands", *Journal of Food Protection*, 77, 2014.
- [24] Walachowski S., Dorenlor V., Lefevre J., Lunazzi A., Eono F., Merbah T., Eveno E., Pavio N., Rose N., "Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France", *Epidemiology & Infection*, 142, 2014.
- [25] Wilhelm B., Leblanc D., Leger D., Gow S., Deckert A., Pearl D.L., Friendship R., Rajić A., Houde A., McEwen S., "Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs", *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80, 2016.

- [26] Lu Y.H., Qian H.Z., Hu A.Q., Qin X., Jiang Q.W., Zheng Y.J., "Seasonal pattern of hepatitis E virus prevalence in swine in two different geographical areas of China", *Epidemiology & Infection*, 141, 2013.
- [27] Hosmillo M., Jeong Y.J., Kim H.J., Park J.G., Nayak M.K., Alfajaro M.M., Collantes T.M., Park S.J., Ikuta K., Yunoki M., Kang M.I., Park S.I., Cho K.O., "Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows", *Archives of Virology*, 155, 2010.
- [28] Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng X.J., "Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus", *Canadian Journal Of Veterinary Research*, 67, 2003.
- [29] Charrier F., Rossi S., Jori F., Maestrini O., Richomme C., Casabianca F., Ducrot C., Jouve J., Pavio N., Le Potier M.F., "Aujeszky's Disease and Hepatitis E Viruses Transmission between Domestic Pigs and Wild Boars in Corsica: Evaluating the Importance of Wild/Domestic Interactions and the Efficacy of Management Measures", *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 2018.
- [30] Crossan C., Grierson S., Thomson J., Ward A., Nunez-Garcia J., Banks M., Scobie L., "Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland", *Epidemiology & Infection*, 143, 2015.
- [31] Grierson S., Heaney J., Cheney T., Morgan D., Wyllie S., Powell L., Smith D., Ijaz S., Steinbach F., Choudhury B., Tedder R.S., "Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013", *Emerging Infectious Diseases*, 21, 2015.
- [32] Casas M., Cortés R., Pina S., Peralta B., Allepuz A., Cortey M., Casal J., Martín M., "Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds", *Veterinary Microbiology*, 148, 2011.
- [33] Salines M., Barnaud E., Andraud M., Eono F., Renson P., Bourry O., Pavio N., Rose N., "Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus", *Veterinary Research*, 2015.
- [34] Ivanova A., Tefanova V., Reshetnjak I., Kuznetsova T., Geller J., Lundkvist Å., Janson M., Neare K., Velström K., Jokelainen P., Lassen B., Hütt P., Saar T., Viltrop A., Golovljova I., "Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia", *Food and Environmental Virology*, 7 (4), pp. 403-412, 2015.
- [35] Arabey A.A., Zhavoronok S.V., "Animal reservoirs of hepatitis E virus in Belarus", Scientific department of Belarusian state medical university, Minsk.
- [36] Spancerniene U., Grigas J., Buitkuvienė J., Zymantiene J., Juozaitiene V., Stankeviciute M., Razukevicius D., Zienius D., Stankevicius A., "Prevalence and phylogenetic analysis of hepatitis E virus in pigs, wild boars, roe deer, red deer and moose in Lithuania", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60, 2018.
- [37] Spancerniene U., Buitkuvienė J., Grigas J., Pampariene I., Salomskas A., Cepulienė R., Zymantiene J., Stankevicius A., "Seroprevalence of hepatitis E virus in Lithuanian domestic pigs and wildlife", 85,

2017.

- [38] Widén F., Sundqvist L., Matyi-Toth A., Metreveli G., Belák S., Hallgren G., Norder H., "Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden", *Epidemiology and Infection*, 139, pp. 361-371, 2011.
- [39] Kantala T., Oristo S., Heinonen M., von Bonsdorff C.H., Maunula L., "A longitudinal study revealing hepatitis E virus infection and transmission at a swine test station", *Research in Veterinary Science*, 95 (3), pp. 1255-1261, 2013.
- [40] Marcin Weiner M., Tokarska-Rodak M., Plewik D., Pańczuk A., Szepeluk A., Krajewska M., "Preliminary study on the detection of hepatitis E virus (HEV) antibodies in pigs and wild boars in Poland", *Journal of Veterinary Research*, 60, pp. 385-389, 2016.
- [41] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), "Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015", European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, 2017.
- [42] Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S., "Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food," *Int J Food Microbiol.*, pp. 176:1-8, 2014.
- [43] Johne R., Plenge-Bonig A., Hess M., Ulrich R.G., Reetz J., Schielke A., "Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR," *Journal of General Virology*, pp. 91: 750-758, 2010.
- [44] Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X.J., Hill V.R., "A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus", *Journal of Virological Methods*, 131 (1), 2006.
- [45] Huang F. F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J., "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," *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 1326–1332, 2002.
- [46] Saitou N. and Nei M., "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees," *Molecular Biology and Evolution*, pp. 406-425, 1987.
- [47] Felsenstein J., "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap," *Evolution*, pp. 783-791, 1985.
- [48] Kumar S., Stecher G., and Tamura K., "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets," *Molecular Biology and Evolution*, pp. 1870-1874, 2016.
- [49] Tamura K., Nei M., and Kumar S., "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 11030-11035, 2004.
- [50] P. N. Rose N., "Epidemiology of hepatitis E virus in pigs: the way forward to limit consumer

exposure", 2014.

- [51] Andraud M., Casas M., Pavo N. and Rose N., "Early-life hepatitis e infection in pigs: the importance of maternally-derived antibodies", *PLoS ONE*, 9, 2014.
- [52] de Deus N., Casas M., Peralta B., Nofrarias M., Pina S., Martin M., Segales J., "Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm", *Veterinary Microbiology*, 132, 2008.
- [53] Fernández-Barredo S., Galiana C., García A., Vega S., Gómez M.T., Pérez-Gracia M.T., "Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 2006.
- [54] Takahashi M., Nishizawa T., Tanaka T., Tsatsalt-Od B., Inoue J., Okamoto H., "Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan," *Journal of General Virology*, 86, pp. 1807-1813, 2005.
- [55] McCreary C., Martelli F., Grierson S., Ostanello F., Nevel A., Banks M., "Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom", *Veterinary Record*, 163 (9), 2008.
- [56] Nakai I., Kato K., Miyazaki A., Yoshii M., Li T.C., Takeda N., Tsunemitsu H., Ikeda H., "Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75, pp. 1171-1177.
- [57] Bouwknecht M., Frankena K., Rutjes S.A., Wellenberg G.J., Husman AMDR, Poel WHMVD, Jong MCMD, "Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure", *Veterinary Research*, 39(5), 2008.
- [58] Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X-J, Halbur P.G., "Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs", *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (11), pp. 5047-5052, 2004.
- [59] Bouwknecht M., Rutjes S.A., Reusken C.B., Stockhofe-Zurwieden N., Frankena K., de Jong M.C., de Roda Husman A.M., Poel W.H., "The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation", *BMC Veterinary Research*, 5 (7), 2009.
- [60] Casas M., Pina S., de Deus N., Peralta B., Martin M., Segalés J., "Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels," *Veterinary Microbiology*, 138, 2009.
- [61] Krain L.J., Nelson K.E. and Labrique A.B., "Host immune status and response to hepatitis E virus infection," *Clinical Microbiology Reviews*, 27, p. 139–165, 2014.
- [62] Krumbholz A., Mohn U., Lange J., Motz M., Wenzel J.J., Jilg W., Walther M., Straube E., Wutzler P. and Zell R., "Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs," *Medical*, 201, p. 239–244, 2012.
- [63] Wichmann O., Schimanski S., Koch J., Kohler M., Rothe C., Plentz A., Jilg W. and Stark K.,

“Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany,” *Journal of Infectious Diseases*, 198, p. 1732–1741, 2008.

- [64] LR Zemkopības ministrija, 2011. Available: <http://www.vmd.gov.lv/valsts-meza-dienests/statiskas-lapas/medibas/valsts-meza-dienests/statiskas-lapas/skaitli-un-fakti?id=766#jump>. [2 November 2018].
- [65] Jori F., Laval M., Maestrini O., Casabianca F., Charrier F. and Pavio N., “Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France,” *Viruses*, p. 8: 236, 2016.
- [66] Anheyer-Behmenburg H.E., Szabo K., Schotte U., Binder A., Klein G., Johne R., “Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013–2015,” *Emerging Infectious Diseases*, pp. 130-133, 2017.
- [67] Jemeršić L., Prpić J., Brnić D., Keros T., Pandak N., Rode O.D., “Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017,” *BMC Infectious Diseases*, p. 19: 269, 2019.
- [68] Di Bartolo I., Diez-Valcarce M., Vasickova M., Kralik P., Hernandez M., Angeloni G., Ostanello F., Bouwknecht M., Rodríguez-Lázaro D., Pavlik I., Ruggeri F.M., “Hepatitis E Virus in Pork Production Chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010,” *Emerging Infectious Diseases*, 18 (8), pp. 1282-1289, 2012.
- [69] Szabo K., Trojnar E., Anheyer-Behmenburg H., Binder A., Schotte U., Ellerbroek L., Klein G., Johne R., “Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method,” *International Journal of Food Microbiology*, pp. 149-156, 2015.