

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

**Doctorand,
Daniela POREA**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**IAȘI
2018**

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND
VETERINARY MEDICINE
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION INFECTIOUS DISEASES**

**PhD student,
Daniela POREA**

DOCTORAL THESIS

**PhD coordinator,
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD**

**IAȘI
2018**

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ȘI ETIOLOGICE
PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E LA
ANIMALELE SĂLBATICE ȘI EVALUAREA RISCULUI
ZOOTIC AL ACESTEIA**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
Daniela POREA**

**IAȘI
2018**

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND
VETERINARY MEDICINE
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION INFECTIOUS DISEASES**

DOCTORAL THESIS

**EPIDEMIOLOGICAL AND ETIOLOGICAL
INVESTIGATIONS ON HEPATITIS E VIRUS INFECTION
IN WILD ANIMALS AND ASSESSMENT OF
ZONOTIC RISK**

**PhD coordinator,
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD**

**PhD student,
Daniela POREA**

**IAȘI
2018**

CUPRINS

INTRODUCERE.....	13
REZUMAT	19
PARTEA I STADIUL CUNOAȘTERII	
CAPITOLUL I DATE BIBLIOGRAFICE PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E.....	34
1.1 Descrierea agentului patogen - virusul hepatitei E	34
1.1.1 Încadrarea taxonomică și relațiile filogenetice în cadrul familiei Hepeviridae	34
1.1.2 Structura virionului și organizarea genomului	37
1.1.3 Replicarea genomului	39
1.2 Descrierea entității morbide - hepatita E	40
1.2.1 Caractere epidemiologice.....	40
1.2.2 Patogeneza infecției cu VHE	44
1.3 Diagnosticul infecției cu virusul hepatitei E	46
1.3.1 Exemenul serologic.....	47
1.3.2 Examenul virusologic	48
1.4 Măsurile de profilaxie și combatere ale infecției cu virusul hepatitei E	49
1.4.1 Măsurile de profilaxie	49
1.4.2 Măsurile de combatere	50
CAPITOLUL II STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E LA ANIMALE SĂLBATICE.....	51
2.1 Cercetări privind infecția cu VHE la mistreți, cervide și la iepurele sălbatic	52
2.1.1 Cercetări privind infecția cu VHE la mistreți.....	52
2.1.2 Cercetări privind infecția cu VHE la cervide.....	54
2.1.3 Cercetări privind infecția cu VHE la iepurele sălbatic.....	55

2.2 Cercetări privind infecția cu VHE la șobolan și la alte specii de animale sălbatice	56
2.2.1 Cercetări privind infecția cu VHE la șobolan	57
2.2.2 Cercetări privind infecția cu VHE la alte specii de animale sălbatice	58
CAPITOLUL III STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E ÎN ROMÂNIA.....	59
3.1 Cercetări privind infecția cu VHE la om	59
3.2 Cercetări privind infecția cu VHE la animale.....	60
CAPITOLUL IV STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND HEPEVIRUSURILE CU CARACTER ZOONOTIC ȘI EPIDEMIOLOGIA INFECȚIEI LA OM	61
4.1 Rezervoarele animale și căile de transmitere ale VHE în infecțiile cu caracter zoonotic	61
4.2 Epidemiologia infecției cu VHE la om în Europa.....	64
4.3 Transmiterea experimentală a VHE între speciile receptive	66
PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL V SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	69
CAPITOLUL VI INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU VHE LA MISTREȚI.....	71
6.1 Material și metodă.....	72
6.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor	72
6.1.2 Testarea serologică	74
6.2 Rezultate și discuții	76
6.2.1 Rezultate	76
6.2.2 Discuții.....	78
6.3 Concluzii parțiale.....	79
CAPITOLUL VII DETECȚIA MOLECULARĂ A VIRUSULUI HEPATITEI E LA MISTREȚI, CERVIDE ȘI IEPURI SĂLBATICI	80
7.1 Material și metodă.....	81
7.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor	81
7.1.2 Extracția acidului nucleic (ARN).....	83
7.1.3 Probele de control utilizate pentru validarea reacțiilor	84
7.1.4 Revers transcripție - PCR în timp real (TaqMan - RT-PCR).....	84
7.1.5 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică	85

7.2 Rezultate	88
7.2.1 Detecția cantitativă a ARN-ului VHE în probele analizate	88
7.2.2 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică	91
7.3 Discuții	95
7.4 Concluzii parțiale	99
CAPITOLUL VIII STUDII MOLECULARE PENTRU IDENTIFICAREA TULPINILOR VHE CIRCULANTE LA ȘOBOLAN ȘI LA ALTE SPECII DE ANIMALE	100
8.1 Material și metodă	101
8.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor	101
8.1.2 Extracția acidului nucleic (ARN)	103
8.1.3 Probele de control utilizate pentru validarea reacțiilor	103
8.1.4 Amplificarea genică	104
8.1.5 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică	107
8.2 Rezultate	107
8.2.1 Detecția ARN-ului VHE în probele de ficat recoltate de la animalele sălbatice	107
8.2.2 Detecția ARN-ului VHE în probele de fecale recoltate de la suine	111
8.2.3 Caracterizarea moleculară și analiza filogenetică a tulpinilor VHE izolate	111
8.3 Discuții	114
8.4 Concluzii parțiale	116
CAPITOLUL IX CERCETĂRI PRIVIND CARACTERUL ZOONOTIC AL INFECȚIEI CU VIRUSUL HEPATITEI E PRIN EVALUAREA ACESTEIA LA POPULAȚIA DIN ESTUL ROMÂNIEI	117
9.1 Material și metodă	118
9.1.1 Eșantionarea și condiționarea probelor	118
9.1.2 Testare serologică	121
9.1.3 Amplificarea genică – RT-nested PCR	121
9.1.4 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică	123
9.1.5 Analiza statistică	123
9.2 Rezultate	123
9.2.1 Rezultatele testărilor serologice	123
9.2.2 Detecția ARN-ului VHE în probele analizate	126

9.2.3 Caracterizarea moleculară și analiza filogenetică a tulpinilor VHE izolate	128
9.3 Discuții	130
9.4 Concluzii parțiale.....	133
CAPITOLUL X CONCLUZII FINALE	134
BIBLIOGRAFIE.....	139
ANEXA 1 ABREVIERI	156
ANEXA 2 LISTA TABELELOR	158
ANEXA 3 LISTA FIGURILOR	161
ANEXA 4 LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	164

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	16
SUMMARY	26
PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
CHAPTER I LITERATURE REVIEW ON HEPATITIS E VIRUS INFECTION	34
1.1 Description of the pathogen-hepatitis E virus.....	34
1.1.1 Taxonomy and phylogenetic relationships within the <i>Hepeviridae</i> family..	34
1.1.2 Virion structure and genome organization	37
1.1.3 Genom replication.....	39
1.2 Description of the morbid entity - hepatitis E.....	40
1.2.1 Epidemiological characters	40
1.2.2 HEV infection pathogenesis	44
1.3 Diagnosis of hepatitis E virus infection.....	46
1.3.1 Serological examination	47
1.3.2 Virological examination	48
1.4 Prophylaxis and control of HEV infection	49
1.4.1 Prophylaxis	49
1.4.2 Control measures.....	50
CHAPTER II CURRENT STATE OF KNOWLEDGE ON HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN WILD ANIMALS	51
2.1 Studies regarding HEV infection in wild boars, cervids and wild rabbits.....	52
2.1.1 Studies regarding HEV infection in wild boars	52
2.1.2 Studies regarding HEV infection in cervids.....	54
2.1.3 Studies regarding HEV infection in wild rabbits	55
2.2 Studies regarding HEV infection in rat and other wildlife species.....	56
2.2.1 Studies regarding HEV infection in rats	57

2.2.2 Studies regarding HEV infection in other wildlife species.....	58
CHAPTER III CURRENT STATE OF KNOWLEDGE REGARDING HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN ROMANIA.....	59
3.1 Studies regarding HEV infection in human	59
3.2 Studies regarding HEV infection in animals.....	60
CHAPTER IV CURRENT STATE OF KNOWLEDGE REGARDING ZONOTIC HEPEVIRUSES AND THE EPIDEMIOLOGY OF THE INFECTION IN HUMAN POPULATION.....	61
4.1 Animal reservoirs and transmission routes of HEV in zoonotic infections	61
4.2 Epidemiology of human zoonotic hepeviruses infection	64
4.3 Experimental transmission of HEV among the susceptible species.....	66
PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS	
CHAPTER V GOAL AND OBJECTIVES	69
CHAPTER VI SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION ON HEPATITIS E INFECTION IN WILD BOARS.....	71
6.1 Material and methodes.....	72
6.1.1 Sample collection and storage.....	72
6.1.2 Serological analysis.....	74
6.2 Results and discussions.....	76
6.2.1 Results	76
6.2.2 Discussions	78
6.3 Partial conclusions	79
CHAPTER VII MOLECULAR DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS IN WILD BOAR, CERVIDS AND WILD RABBIT	80
7.1 Material and methodes.....	81
7.1.1 Sample collection and storage.....	81
7.1.2 Nucleic acid extraction (RNA)	83
7.1.3 RT and PCR controls.....	84
7.1.4 TaqMan real-time RT-PCR assay.....	84
7.1.5 Nucleotide sequencing and sequence analysis	85
7.2 Results.....	88
7.2.1 Quantitative detection of HEV RNA in the analysed samples.....	88
7.2.2 HEV Sequence analysis	91

7.3 Discussions	95
7.4 Partial conclusions.....	99
CHAPTER VIII MOLECULAR IDENTIFICATION OF HEPATITIS E VIRUS STRAINS CIRCULATING IN RATS AND OTHER ANIMAL SPECIES	100
8.1 Material and methodes	101
8.1.1 Sample collection and storage	101
8.1.2 Nucleic acid extraction (RNA)	103
8.1.3 RT and PCR controls	103
8.1.4 Gene amplification - PCR assays.....	104
8.1.5 Nucleotide sequencing and sequence analysis	107
8.2 Results	107
8.2.1 Detection of HEV RNA in wild animals liver samples.....	107
8.2.2. Detection of HEV RNA in swine stool samples.....	111
8.2.3 HEV sequence analysis	111
8.3 Discussions	114
8.4 Partial conclusions.....	116
CHAPTER IX RESEARCH ON THE ZOOTIC CHARACTER OF THE HEV INFECTION THROUGH ITS EVALUATION IN THE EASTERN ROMANIA'S HUMAN POPULATION	117
9.1 Material and methodes	118
9.1.1 Sampling and storage	118
9.1.2 Serological analysis	121
9.1.3 Gene amplification - RT-nested PCR assay	121
9.1.4 Nucleotide sequencing and sequence analysis.....	123
9.1.5 Statistical analysis.....	123
9.2 Results	123
9.2.1 Serological results.....	123
9.2.2 Detection of HEV RNA in the analysed samples	126
9.2.3 HEV sequence analysis	128
9.3 Discussions	130
9.4 Partial conclusions.....	133
CHAPTER X FINAL CONCLUSIONS.....	134
BIBLIOGRAPHY	139

ANNEX 1 ABBREVIATIONS	156
ANNEX 2 LIST OF TABLES	158
ANNEX 3 LIST OF FIGURES	161
ANNEX 4 SCIENTIFIC PAPERS.....	164

INTRODUCERE

Virusul hepatitei E (VHE) este unul dintre cei mai importanți agenți cauzali ai hepatitei virale acute la nivel mondial. Însemnătatea infecției cu VHE este dată de caracterul endemic, asociat cu transmiterea virusului prin intermediul surselor de apă contaminată, în țările în curs de dezvoltare și de transmiterea virusului prin intermediul alimentelor contaminate, responsabilă de apariția cazurilor sporadice și a focarelor în țările dezvoltate. Aceste infecții sunt produse de diverse hepevirusuri, care sunt încadrate în familia *Hepeviridae*. Focarele asociate cu sursele de apă contaminată se datorează genotipurilor 1 și 2 (VHE-1 și VHE-2), strict patogene pentru om, în timp ce genotipurile 3 și 4 (VHE-3 și VHE-4) sunt considerate zoonotice. Aceste genotipuri au fost încadrate în genul *Orthohepevirus*, specia *Orthohepevirus A*. Dintre celelalte specii ale acestui gen, doar specia *Orthohepevirus C* a fost suspicionată ca având un potențial zoonotic, datorită virusului de la șobolan.

În Europa, VHE-3 este cel mai frecvent genotip identificat, infecția autohtonă fiind considerată o boală emergentă. În plus față de caracterul zoonotic, simptomatologia variată a infecției cu VHE-3 la om face ca hepatita E să fie una dintre cele mai importante boli hepatice. Datorită acestor aspecte și celor legate de notificarea bolii, care nu este obligatorie în toate statele membre ale UE și care include programe de supraveghere diferite între țările cu sisteme de notificare, situația reală a infecției cu VHE nu este cunoscută. De asemenea, infecția cu VHE la animale nu este inclusă în sistemele de notificare la nivel European (ex: Sistemul de Notificare a Bolilor Animalelor - ADNS), majoritatea analizelor de supraveghere fiind realizate de către diverși cercetători în baza unor granturi de cercetare. Dinamica infecției cu VHE la animale, care implică un caracter asimptomatic și modalități de transmitere nedefinite, poate reprezenta considerentul neinclunderii hepatitei E într-un astfel de sistem.

Caracterul zoonotic al infecției cu VHE a fost evidențiat prin dovezi directe și indirecte, acestea din urmă fiind preponderente. Dovezile indirecte, bazate pe gradul de înrudire genetică dintre tulpinile izolate de la om cu cele izolate de la animale, arată că nu toate tulpinile VHE de la animale pot fi asociate cu infecția zoonotică. Dintre animalele susceptibile la infecția cu acest virus, suinele domestice și cele sălbatice sunt principalele surse de VHE. În Europa, consumul alimentelor de origine animală contaminate pare să fie principala cale de transmitere a infecției cu VHE la om. Dovezile directe au arătat că dintre acestea, consumul alimentelor obținute de la porc, mistreț și cerb au fost implicate în infecția cu VHE la om. Dovezile indirecte arată că

iepurele poate fi o altă sursă de VHE zoonotic. De asemenea, un potențial rol în transmiterea zoonotică a VHE a fost sugerat pentru șobolani, pe baza gradului de înrudire genetică dintre tulpini izolate de la această specie cu tulpini VHE izolate de la om, dar și de la alte specii de animale.

În România, absența unui program de notificare a hepatitei E face ca această boală să fie subdiagnosticată. Mai mult, importanța fiecărei surse de virus cu risc major pentru sănătatea publică din România nu este cunoscută. Atât la om cât și la animale studiile sunt limitate, fiind accesibile datele de la un număr redus de anchete seroepidemiologice. Studiile care au vizat identificarea infecției cu VHE la porci și mistreți au fost realizate în efective de animale din județe din estul țării. Caracterizarea VHE a fost realizată la suinele domestice, tulpinile izolate fiind încadrate în genotipul VHE-3.

Scopul acestei lucrări a vizat evaluarea caracterul zoonotic al tulpinilor VHE circulante în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea datelor epidemiologice și etiologice ale infecției cu VHE în zona de est a țării. În acest sens, obiectivele propuse au constatat în: evidențierea circulației VHE la animale sălbatice din estul României prin evaluarea seroprevalenței anticorpilor specifici anti-VHE la mistreți, identificarea tulpinilor VHE circulante la animalele sălbatice a căror carne poate fi utilizată în cosumul uman, evaluarea rolului șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în aria de studiu, identificarea tulpinilor VHE circulante la populația umană din estul țării și stabilirea relațiilor filogenetice dintre tulpinile identificate, dintre acestea și cele anterior detectate la suinele domestice din România și alte tulpini VHE din întreaga lume, disponibile în GenBank. Pentru aceasta, au fost realizate succesiv o serie de activități principale, alături de unele cu caracter preliminar sau secundar, destinate atingerii obiectivelor propuse. Aceste activități au uzat de metode serologice și moleculare și de analize bioinformatic.

MULȚUMIRI

Pentru această etapă importantă din viața mea doresc să adresez respect și recunoștință oamenilor frumoși, care prin onestitatea și entuziasmul lor au contribuit la dezvoltarea mea profesională și personală.

*În mod deosebit, mulțumesc **D-lui Profesor Univ. Dr. Savuța Gheorghe** pentru încrederea acordată proaspetei licențiate, oferindu-mi șansa să mă înscriu la doctorat. Sunt mândră că am avut ocazia să descopăr modestia și altruismul unui intelectual de elită, oferindu-mi sprijin la nevoie, călăuzindu-mă spre finalitatea unui lucru temeinic făcut, alungându-mi temerile și neputințele unui **“învățăcel”**.*

*Mulțumesc **D-nei Dr. Nicole Pavio** de la UMR 1161 - Virologie, Maisons-Alfort, Franța pentru acceptarea mea în minunata-i echipă din “labirintul cercetării franceze”, pentru felul în care m-a integrat în rândul ei, contribuind esențial la evoluția mea profesională, dar și personală. A pus temelia încrederii în potențialul eului meu.*

Sincere mulțumiri adresez și distinșilor membri ai Comisiei de îndrumare și ai Comisiei de doctorat pentru efortul depus în analizarea tezei de doctorat.

Totodată, mulțumesc atât conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, cât și a Facultății de Medicină Veterinară pentru condițiile oferite pe durata desfășurării studiilor doctorale.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc familiei mele pentru tăria și răbdarea avută în susținerea morală și materială a evoluției mele profesionale.

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is one of the most important causal agents of acute viral hepatitis worldwide. The importance of HEV infection is due to the endemic character associated with the transmission of the virus through contaminated water sources in developing countries and the viral transmission through contaminated food that is responsible for the occurrence of sporadic cases and outbreaks in developed countries. These infections are produced by different hepeviruses, which are included in the *Hepeviridae* family. The outbreaks associated with contaminated water sources are due to genotypes 1 and 2 (HEV-1 and HEV-2), strictly human pathogens, while genotypes 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4) are considered zoonotic. These genotypes have been classified into the *Orthohepevirus* genus *Orthohepevirus A* species. Of the other species belonging to this genus, only *Orthohepevirus C* was suspected of having a zoonotic potential, due to rat HEV.

In Europe, HEV-3 is the most prevalent genotype, the autochthonous infection being considered an emerging disease. In addition to the zoonotic character, the widespread symptomatology of HEV-3 infection in humans makes hepatitis E one of the most important liver diseases. Because of these issues and those related to disease's notification, which is not present in all EU Member Countries and which includes different surveillance programs the actual situation of HEV infection is unknown. Moreover, the HEV infection in animals is not included in the European Notification Systems (for examples, the Animal Disease Notification System - ADNS), with the majority of tests being carried out by various researchers on the basis of research grants. The dynamics of HEV infection in animals, involving an asymptomatic character and undefined ways of transmission

The zoonotic character of the HEV infection was highlighted by direct and indirect evidence, the latter being preponderant. Indirect evidences, based on the genetic association between human and animal isolates, highlights that not all animal HEV strains may be associated with zoonotic infection. Of the animals susceptible to HEV infection, domestic and wild boars are the main sources of HEV. In Europe, the consumption of contaminated animal food appears to be a major route of transmission of HEV infection in humans. Direct evidence has shown that consumption of contaminated raw and undercooked pork, wild boar and deer meat have been related to HEV infection in humans. Indirect evidence shows that rabbit may be another source of zoonotic HEV. Also, a potential role in HEV zoonotic transmission has been

suggested for rats, based on the genetic association between the isolates from this species with strains isolated from human and other animal species

In Romania, the absence of a hepatitis E notification program makes this disease underdiagnosed. Sources of virus that represents important high-risks for public health in Romania are unknown. Also, research studies in humans and animals are limited. Studies that focused on HEV identification in domestic and wild boars in Romania were conducted particularly in livestock from eastern counties. Swine HEV molecular characterization was performed, the isolated strains being classified as HEV-3.

The purpose of this research was to assess the zoonotic character of circulating HEV strains in Romania through investigations aiming to improve the epidemiological and etiological data of HEV infection in the country's eastern area. In this regard, the proposed objectives were: to highlight HEV circulation in wild animals in eastern Romania by identifying the seroprevalence of specific anti-HEV antibodies in wild boars; identifying circulating HEV strains in wild animals whose meat can be consumed by humans; assessing the role of rats in the epidemiology of HEV infection in the studied area; identification of circulating HEV strains in the human population of the eastern part of the country; phylogenetic relationships between the strains identified, among them and previously detected in domestic swine in Romania and other HEV strains worldwide, available in GenBank. For this purpose serological and molecular methods, and bioinformatics analysis have been used.

ACKNOWLEDGEMENTS

For this important stage in my life I wish to address my gratitude to the special people, whom through their honesty and enthusiasm contributed to my professional and personal development.

*I especially thank **Professor Univ. Dr. Savuța Gheorghe** for trusting me and for giving me the chance to enroll in this Ph.D. I am proud to have discovered the modesty and altruism of an elite intellectual who provided me with his unconditional support all through this journey and guided me to the end of a thorough work, casting out the fears and weaknesses specific to “**the student**” at the beginning of his academic route.*

*Many thanks as well to **Mrs. Nicole Pavio**, from UMR 1161 Virologie, Maison-Alfort, France for accepting me into her wonderful team within the “labyrinth of French research”, for the way she helped me to integrate into it and for contributing to both my professional and personal evolution. She laid the foundation of trusting in my own potential.*

I would also like to express my gratitude to the distinguished members of the Guidance and Doctoral Committees for their courtesy to evaluate my thesis.

At the same time, I extend my thanks both to the management of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine “Ion Ionescu de la Brad” Iasi and to the Faculty of Veterinary Medicine for the organizational framework offered during my doctoral studies.

Last but not least, I want to thank my family for their strength and patience in supporting me morally and materially throughout my professional evolution these past years.

REZUMAT

Virusul hepatitei E (VHE) este agentul cauzal al unei hepatite acute cu evoluție autolimitantă la om și a unei infecții subclinice la animale. În Europa, atât la om, cât și la animale, cel mai frecvent genotip identificat este VHE-3. Dovezile directe au arătat că VHE de la suine și cerb au caracter zoonotic iar cele indirecte au arătat că în plus față de acestea, tulpini VHE de la iepure și probabil de la șobolan pot fi asociate cu infecția zoonotică. În România, există o necesitate în ceea ce privește identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante la om și animale. Caracterizarea tulpinilor VHE circulante în țara noastră și analiza filogenetică a acestora poate contribui la estimarea rolului animalelor în epidemiologia infecției cu VHE la om.

Teza de doctorat cu titlul **“Cercetări epidemiologice și etiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la animalele sălbatice și evaluarea riscului zoonotic al acesteia”** este structurată, conform normelor în vigoare, în două părți principale: partea I, denumită **“Stadiul actual al cunoașterii”** ce include un număr de 34 de pagini în care sunt prezentate date extrase din literatura de specialitate cu privire la infecția cu VHE și partea a II-a, intitulată **„Contribuții personale”** în care sunt expuse rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul perioadei de studii doctorale. Aceste părți sunt completate, conform aceluiași norme, cu introducerea, rezumatul și lista surselor bibliografice.

Prima parte, **“Stadiul actual al cunoașterii”**, este structurată în patru capitole și subcapitolele asociate acestora, în care au fost prezentate informațiile extrase din literatura de specialitate cu privire la agentul etiologic și infecțiile produse de acesta la om și animale, situația epidemiologică a infecției cu VHE la animalele sălbatice, stadiul cunoașterii în România, precum și date referitoare la caracterul zoonotic al infecției cu VHE și epidemiologia infecției cu VHE la om asociată tulpinilor VHE zoonotice.

Primul capitol, cu titlul **“Date bibliografice privind infecția cu virusul hepatitei E”**, descrie în primele două subcapitole date legate de agentul etiologic și dinamica infecțiilor produse de acesta la om și animale. În subcapitolele ulterioare sunt prezentate date cu privire la diagnosticul infecției cu VHE și măsurile de profilaxie și combatere ale acesteia. Sintetizarea datelor cuprinse în acest capitol arată că VHE este un virus de tip ARN, monocatenar, nesegmentat cu polaritate pozitivă, ce cuprinde trei cadre deschise de citire (ORF 1-3). Virusul hepatitei E este singurul membru al familiei *Hepeviridae* în care au fost desemnate genotipuri și subtipuri pentru încadrarea diverselor tulpini de virus izolate de la om și animale. Dintre acestea, genotipurile 1-4

sunt considerate genotipuri majore, ultimele două având caracter zoonotic. Cea mai importantă problemă cu privire la izolarea *in vitro* a VHE o reprezintă lipsa unui sistem eficient de culturi celulare pentru propagarea acestuia, ceea ce explică modalități de transmitere insuficient cunoscute, mecanisme patogenetice neelucidate, limitarea studiilor de virulență și a celor de elaborare a vaccinurilor.

Capitolul II, intitulat **“Stadiul cunoașterii privind infecția cu virusul hepatitei E la animale sălbatice”**, include două subcapitole, în care sunt prezentate situațiile epidemiologice ale infecțiilor cu VHE din specia *Ortohepevirus A* și, respectiv, *Ortohepevirus C* la animale sălbatice. Dintre genotipurile speciei *Ortohepevirus A*, doar VHE-3 a fost identificat la animale sălbatice în Europa. În acest continent, tulpini VHE încadrate în specia *Ortohepevirus C* au fost izolate de la șobolan, vulpe și nură.

În capitolul III, denumit **“Stadiul cunoașterii privind infecția cu virusul hepatitei E în România”**, sunt prezentate datele existente în literatura internațională și națională cu privire la infecția cu VHE în România. Datele prezentate în două subcapitole arată că infecția cu VHE a fost cercetată la om și suine. Studiile întreprinse la populația umană din estul României au fost realizate concomitent cu investigațiile realizate la suinele domestice și au dus la suspiciunea unei posibile asocieri a infecției la om cu prezența VHE la suine. Caracterizarea tulpinilor VHE izolate de la suinele domestice a arătat că acestea aparțin VHE-3.

Capitolul IV, **“Stadiul cunoașterii privind hepevirusurile cu caracter zoonotic și epidemiologia infecției la om”**, cuprinde date din literatura de specialitate cu privire la caracterul zoonotic al infecției cu VHE. Acest subiect a fost abordat sistematic, în trei subcapitole, prin documentări asupra capacității VHE de a traversa bariera de specie, asupra factorilor implicați în infecția zoonotică și asupra situației epidemiologice a infecției la om asociată tulpinilor VHE zoonotice. Atât studiile cu privire la infecția naturală, cât și la cea experimentală, arată că nu toate tulpinile VHE izolate de la animale pot fi asociate cu infecția zoonotică. În Europa, alimentația este considerată principala sursă de transmitere a infecției cu VHE. Predominanța subtipului VHE-3c la om și substituirea subtipurilor prevalente anterior în unele țări au fost asociate cu importurile cărnii de porc din alte țări Europene.

Partea a doua a prezentei teze de doctorat, **“Contribuții personale”**, cuprinde șase capitole (V-X): un prim capitol atribuit descrierii scopului, obiectivelor și activităților asociate acestora, urmat de alte 4 capitole în care sunt detaliate părțile componente ale fiecărui studiu întreprins, de la material și metodă la rezultate și discuții și un ultim capitol desemnat concluziilor finale, în care sunt enumerate remarcile observate prin analiza generală a rezultatelor obținute.

În România, infecția cu VHE a fost documentată într-un număr redus de studii și realizate preponderent în zona de est a țării. Prin urmare, scopul acestei lucrări este de a evalua caracterul zoonotic al tulpinilor VHE circulante în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea datelor epidemiologice și etiologice ale infecției cu VHE în zona de est a țării. În acest sens, obiectivele propuse au constat în: evidențierea circulației VHE la animale sălbatice din estul României prin evaluarea

seroprevalenței anticorpilor specifici anti-VHE la mistreți, identificarea tulpinilor VHE circulante la animalele sălbatice a căror carne poate fi utilizată în cosumul uman, evaluarea rolului șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în aria de studiu, identificarea tulpinilor VHE circulante la populația umană din estul țării și stabilirea relațiilor filogenetice dintre tulpinile identificate, dintre acestea și cele anterior detectate la suinele domestice din România și alte tulpini VHE din întreaga lume, disponibile în GenBank. Pentru aceasta, au fost realizate succesiv o serie de activități principale, alături de unele cu caracter preliminar sau secundar, destinate atingerii obiectivelor propuse. Activitățile întreprinse au uzat de metode serologice, moleculare și de analize bioinformatic. Acestea sunt descrise în capitolul V, intitulat **“Scopul și obiectivele tezei de doctorat”**.

În capitolul VI, denumit **“Investigații seroepidemiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la mistreți”**, sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării unei testări serologice a probelor de ser recoltate de la mistreți din 7 județe situate în estul României pentru detecția anticorpilor IgG anti-VHE. Au fost analizate 218 probe de ser recoltate de la mistreți în perioada sezoanelor de vânătoare 2014 și 2015, cu ajutorul kit-ului comercial ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța). Protocolul de lucru s-a realizat conform instrucțiunilor furnizate de producătorul kit-ului. Datele cu privire la vârsta mistreților au fost obținute pentru animalele din județul Galați iar distribuția acestora în fonduri de vânătoare a fost cunoscută pentru același județ și pentru județul Buzău. Distribuția numărului de probe în cele 7 județe a variat, cel mai mare număr de probe fiind recoltate de la mistreții din județul Iași (n=110), urmat de județele Galați (n=38) și Buzău (n=30). Un număr mai mic de probe au fost recoltate de la mistreții din județele Bacău (n=18), Vrancea (n=16), Suceava (n=5) și Botoșani (n=1).

Seroprevalența aparentă a anticorpilor IgG anti-VHE, înregistrată în cadrul acestui studiu, a fost de 11.92% (26/218; 95% CI, 0.076 – 0.162). Analiza rezultatelor obținute a arătat că au fost identificați pozitiv mistreți din 5 județe din cele 7 analizate, respectiv Iași, Bacău, Vrancea, Galați și Buzău, aceste rezultate putându-se datora distribuției neuniforme a numărului de probe în fiecare județ. Animale seropozitive au fost identificate în două din cele 18 fonduri de vânătoare analizate din județul Galați și în 3 din cele 15 fonduri de vânătoare analizate din județul Buzău. Aceste rezultate au semnalat caracterul persistent și, totodată, a celui de propagare a infecției cu VHE la populația de mistreți din estul României, prin identificarea infecției și în alte fonduri de vânătoare decât cele anterior identificate pozitiv de Botezatu și colab., 2014.

Seroprevalența înregistrată a este mai mare decât cea anterior detectată la mistreți din zona de studiu iar raportarea acesteia la ratele de seroprevalență înregistrate în alte țări Europene indică o rată relativ scăzută. Aceste rezultate se pot datora tehnicilor diferite de diagnostic, a factorilor aflați în legătură cu caracteristicile biologice și ecologice ale populațiilor de mistreți și a celor legați de răspândirea virusului în perioadele analizate.

Analiza rezultatelor în funcție de categoria de vârstă analizată a arătat că acestea sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, care atestă că infecția cu VHE la mistreți nu este dependentă de vârstă.

Semnalarea infecției cu VHE la populația de mistreți analizată, prin detecția anticorpilor IgG anti-VHE, a reprezentat fundamentul studiilor ulterioare, care au avut ca obiective identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante la animale sălbatice din zona de studiu.

În continuare, capitolul VII, intitulat “**Detecția moleculară a virusului hepatitei E la mistreți, cervide și iepuri sălbatici**”, cuprinde rezultatele obținute în urma testării probelor recoltate de la mistreți, cervide și iepuri din zona de studiu. Probele au fost recoltate de la animale vânat în perioada sezoanelor de vânătoare 2013-2015, dedicate fiecărei specii de vânat. Au fost analizate 78 de probe, 50 de la mistreți (probe de ficat, n=45 și probe de splină, n=5), 16 de la cervide (probe de ficat) și 12 de la iepuri sălbatici (probe de ficat). Nu se cunosc datele cu privire la vârsta cervidelor și a iepurilor de la care s-au recoltat probele de ficat și cele cu privire la distribuția numărului de animale în cadrul celor două specii de cervide analizate: *Capreolus capreolus* și *Cervus elaphus*. Pentru 37 din cei 50 de mistreți analizați, au fost obținute date cu privire la vârstă, aceștia fiind încadrați în una din următoarele categorii de vârstă: < 1 an (n=4), 1-2 ani (n=11), > 2 ani (n=22).

Activitățile întreprinse au utilizat metode moleculare clasice [Cooper și colab., 2005; Bouquet și colab., 2011] și în timp real [Jothikumar și colab., 2006; Barnaud și colab., 2012] iar analiza bioinformatică a inclus instrumentele necesare încadrării tulpinilor VHE identificate (BIOEDIT, BLAST, MEGA 7).

Rezultatele obținute a arătat că VHE a fost identificat în 9 probe din cele 78 analizate, acestea provenind de la mistreți. Datele publicate în literatura de specialitate arată că lipsa sau ratele scăzute de detecție a VHE la cervide sunt comune pentru o serie de studii care au întreprins cercetări simultane la mistreți și la acestea. În baza acestor date au fost emise unele ipoteze, care ar putea reprezenta o parte din cauzele lipsei de detecție a VHE la cervide: selectivitatea acestora în alegerea surselor de hrană și apă, precum și particularitățile anatomice - lipsa vezicii biliare, aceasta din urmă fiind esențială pentru disocierea lipidelor de virioni, prin secreția acidului dezoxicolic, necesar unui astfel de proces.

Mistreții ARN-VHE pozitivi au provenit din două județe, Vrancea și Suceava, care sunt situate la polurile opuse în aria de studiu - estul României. Prevalența aparentă a VHE la mistreții analizați a fost de 18%, iar cea pentru fiecare județ identificat pozitiv de 25% (2/8) și de 23.33% (7/30). ARN-ul VHE a fost detectat la mistreții din categoria de vârstă 1-2 ani (2/11 – 18.18%) și la cei din categoria > 2 ani (7/22 – 31.81%). Analiza rezultatelor, în funcție de tipul de țesut analizat, a arătat că 2 din cele 9 probe identificate pozitiv sunt de origine splenică.

Analizele ulterioare au arătat că 5 produși RT-nested PCR au fost obținuți: pentru una din cele două probe de splină VHE pozitive și pentru patru din cele șapte probe de ficat VHE pozitive. Analiza filogenetică a evidențiat că diferite tulpini de VHE

circulă la mistreții din cele două județe, prin încadrarea tulpinilor identificate în 2 grupuri monofiletice.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele notate în literatura de specialitate, care arată că ratele de prevalență sunt influențate de diverși factori și că gruparea tulpinilor VHE, în funcție de zona geografică de eșantionare, este comună și altor studii.

Raportarea rezultatelor obținute la cele prezentate în literatura de specialitate a dus la suspiciunea caracterului zoonotic al tulpinilor VHE identificate, prin înrudirea genetică a acestora cu tulpini ale VHE izolate din cazurile autohtone de infecție la om. De asemenea, înrudirea tulpinilor VHE izolate de la mistreți din județul Suceava cu o tulpină VHE anterior identificată la suinele domestice din țara noastră, sugerează o posibilă corelare a ratelor crescute de seroprevalență a anticorpilor IgG anti - VHE la populația din estul României cu prezența VHE la animalele din această zonă.

Pentru a evalua rolul șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în zona de studiu, dar și al altor animale sălbatice, în capitolul VIII, denumit **“Studii moleculare pentru identificarea tulpinilor VHE circulante la șobolan și la alte specii de animale”**, au fost efectuate analize moleculare și bioinformatică necesare încadrării tulpinilor VHE circulante. Au fost analizate, prin diferite metode de biologie moleculară, 69 de probe de ficat recoltate de la animale sălbatice (52 de șobolani, patru dihori, o nutrie, un bizam, o cârțiță, un șoarece și nouă vulpi). Toate probele au fost testate prin trei protocoale descrise în literatura de specialitate. Două dintre acestea sunt specifice pentru detecția genotipurilor patogene pentru om (VHE-1 - VHE-4) și au fost descrise în capitolul anterior iar una pentru detecția a diverse hepevirusuri, printre care și a VHE de la șobolan [Johns și colab., 2010]. În urma analizelor efectuate, VHE a fost identificat la șobolani prin utilizarea metodei specifice pentru detecția VHE de la șobolani și de la alte mamifere.

În plus, probele recoltate de la vulpi au fost analizate prin două protocoale de lucru PCR clasic dezvoltate în acest scop, care au utilizat seturile de primeri folosite de Bodewes și colab., 2013 pentru detecția VHE la vulpi din Olanda. Aceste protocoale au fost denumite PCR-ORF2 și PCR-ORF1, în funcție de segmentul amplificat. Analiza electroforetică a produsilor de amplificare obținuți prin PCR-ORF1 a evidențiat prezența unei benzi ADN în poziția așteptată (362bp) pentru una din cele 9 probe analizate. Prezența benzilor nespecifice de amplificare pentru acest produs arată necesitatea optimizării protocoalelor dezvoltate și a reconfirmării prezenței VHE la vulpe în țara noastră.

Șobolanii au fost capturați în diferite locații din patru județe (Suceava, Iași, Bacău și Tulcea) situate în zona de studiu: proximitatea unei crescătorii de suine în sistem intensiv, proximitatea unei crescătorii de suine în sistem semi-intensiv, proximitatea unei crescătorii de suine în sistem extensiv, proximitatea unei crescătorii cu diverse specii de animale (stână), proximitatea unei ferme de bovine, proximitatea ghelelor de gunoi și în împrejurimile așezărilor rurale. Au fost identificate ca fiind ARN-VHE pozitiv nouă din cele 52 de probe testate. Analiza rezultatelor a arătat că VHE

este prezent la șobolani din fiecare județ analizat și din patru locații din cele șapte analizate. Aceste rezultate arată o distribuție largă a VHE la șobolani în zona de studiu.

Caracterizarea tulpinilor VHE identificate a arătat că acestea aparțin subtipului specific VHE de la șobolan, respectiv C1. Analiza filogenetică a evidențiat grade diferite de înrudire genetică dintre tulpinile izolate (84.84% - 91.18%) iar procentele maxime de identitate nucleotidică dintre acestea și cele din GenBank au valori cuprinse între 85% și 89%. Aceeași analiză a arătat că una din tulpinile identificate la șobolanii din județul Bacău se înrudește genetic cu două tulpini VHE-4 izolate de la suine în China, în proporție de 73% și 72% (identitate nucleotidică). Aceste rezultate generează noi date cu privire la gradul de înrudire genetică dintre speciile genului *Orthohepevirus*.

Capitolul IX, **“Cercetări privind caracterul zoonotic al infecției cu virusul hepatitei E prin evaluarea acestuia la populația umană din estul României”**, cuprinde rezultatele analizelor serologice și moleculare realizate pentru identificarea infecției cu VHE la grupuri de pacienți din populația de est a României. În acest sens, au fost preluate probe biologice (ser, plasmă sau fecale) din 3 unități sanitare din estul României: Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași, Direcția de Sănătate Publică Iași (DSP Iași) și Direcția de Sănătate Publică Vrancea (DSP Vrancea).

Au fost analizate două grupuri de pacienți spitalizați în cadrul a două spitale din zona de studiu: pacienți cu hepatită acută (Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași) și pacienți fără afecțiuni hepatice (Spitalul Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani). În cadrul primului grup (n=94) au fost incluși pacienți cu hepatita acută de cauză necunoscută (n= 48) și pacienți cu hepatită acută non-A, non-B (n=46) iar în cadrul celui de-al doilea grup (n=40), pacienți cu TBC (n=3) și paciente lehuze (n=37). În studiu au fost incluse și probe de la personal medical (n=16) din cadrul Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" din Iași.

Probele de ser de la personalul medical, de la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută și de la cei fără afecțiuni hepatice au fost testate, inițial, pentru detecția anticorpilor totali anti-VHE (Ab VHE) cu ajutorul kit-ului comercial ELISA HEV Ab (Diagnostic Bioprobes, Italia). Ulterior, o parte din probele de la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută au fost testate, împreună cu cele de la pacienții cu hepatită acută non-A, non-B pentru detecția anticorpilor IgM anti-VHE cu ajutorul kit-ului comercial ELISA HEV IgM (Diagnostic Bioprobes, Italia). Probele de ser de la pacienții fără afecțiuni hepatice Ab VHE pozitivi și probele de la pacienții cu hepatită acută cu diferite rezultate serologice au fost testate pentru detecția ARN-ului VHE.

Rezultatele obținute arată că infecția cu VHE a fost prezentă la 29.16% (95% IC, 16.31 - 42.03) din pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută și la 32.5% (95% IC, 17.98 - 47.02) din pacienții fără afecțiuni hepatice, prin detecția anticorpilor totali anti-VHE. Detecția anticorpilor IgM anti-VHE la pacienții cu hepatită acută a arătat că 10% (9/90) au prezentat o infecție acută cu VHE la momentul spitalizării. Detecția ARN-ului VHE la doi pacienți dintre cei nouă IgM anti-VHE pozitivi, arată că aceștia au suferit o infecție cu VHE relativ recentă față de momentul spitalizării. Unul din cei doi

pacienți cu ARN-VHE pozitivi a consumat carne de porc aprovizionată din galantarul unui magazin.

Caracterizarea tulpinilor VHE circulante a dus la încadrarea acestora în subtipul VHE-3c, cel mai frecvent subtip identificat în Europa. Analiza filogenetică a arătat că acestea se înrudesesc genetic cu tulpini VHE de la om, suine, mistreți și capra domestică din Europa. Aceste rezultate, împreună cu cele obținute la caracterizarea tulpinilor VHE circulante la mistreți, care au arătat prezența a diferite subtipuri de VHE-3, au dus la emiterea a două ipoteze cu privire la infecția cu VHE detectată la om. Prima ipoteză sugerează asocierea infecției cu importurile cărnii de porc din țări ale UE în care VHE-3c este prevalent iar cea de-a doua ipoteză sugerează posibilitatea unei infecții autohtone și implicit existența a diverse subtipuri de VHE la om și animale în România.

Capitolul X, "**Concluzii finale**", cuprinde o sinteză a concluziilor parțiale, după o analiză de ansamblu a datelor prezentate în capitolele anterioare. Rezultatele acestei lucrări oferă date noi cu privire la infecția cu VHE în România, prin semnalarea acesteia la populația umană și la animale sălbatice din estul țării. Observațiile făcute pe parcursul acestei lucrări, în urma cercetărilor întreprinse, semnalează posibilitatea unor infecții zoonotice cu VHE și necesitatea implementării unui program național de prevenire, supraveghere și control a hepatitei E în România.

SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is the causal agent of an acute self-limiting hepatitis in humans and subclinical infection in animals. In Europe, both in humans and animals, the most commonly identified genotype is HEV-3. Direct evidence has shown that swine and deer HEVs are zoonotic. Indirect evidence revealed that rabbit HEV and rat HEV may be associated with the zoonotic infection. In Romania, there is a need for identification and characterization of circulating HEV strains in humans and animals, in order to estimate the role of animals in the epidemiology of human HEV infection.

The PhD thesis entitled **"Epidemiological and etiological investigations on hepatitis E virus infection in wild animals and assessment of zoonotic risk"** is structured, in accordance with the norms, in two main parts. Part I, entitled **"Current state of knowledge"** includes 34 pages in which data from the literature on the infection with HEV is presented. Part II, entitled **"Personal contributions"**, presents the results of research carried out during the doctoral studies.

The first part, **"Current state of knowledge"**, is structured in four chapters and the associated subchapters, where are presented the information extracted from the literature regarding the etiological agents and the infections produced in humans and animals, the epidemiological situation of the HEV infection in wild animals, the state of knowledge in Romania, and data on the zoonotic nature of HEV infection, as well as the epidemiology of human HEV infection associated with zoonotic HEV strains.

The first chapter, entitled **"Literature review on hepatitis E"**, describes in the first two subchapters the data related to the etiological agent and the dynamics of infections produced in humans and animals. In the following subchapters, data on HEV diagnosis, prevention and control are presented.

Data included in this chapter shows that HEV is a single-stranded positive-sense RNA comprising three open reading frames (ORF 1-3). The hepatitis E virus is the only member of the Hepeviridae family, in which genotypes and subtypes have been designated including various strains isolated from humans and animals. Genotypes 1-4 are considered major genotypes, gt3 and gt4 being zoonotic. The most important issue with regards to HEV infection is the lack of an effective cell culture system for the propagation of virus, which explains insufficiently known transmission ways, unclear pathogenetic mechanisms, limitation of virulence studies and vaccine development studies.

The second chapter, **"Current state of knowledge on hepatitis E virus infection in wild animals"**, includes two subchapters presenting the epidemiological situations of wild animals HEV infections of the species *Ortohepevirus A* and *Ortohepevirus C*. Of the genotypes of *Ortohepevirus A* species, only HEV-3 has been identified in wild animals in Europe. In the same area, HEV strains framed in *Ortohepevirus C* species isolated from rat, fox and mink.

In Chapter III, entitled **"Current state of knowledge of Hepatitis E virus infection in Romania"**, the existing data in the international and national literature on HEV infection in Romania are presented. The data presented in two subchapters, show that HEV infection has been investigated in humans and swine. The studies conducted in the eastern Romanian human population were carried out together with the investigations in the domestic swine and led to the suspicion of a possible association of the humans infection with the presence swine HEV. The characterization of HEV strains isolated from domestic swine showed that they belong to HEV-3.

Chapter IV, **"Current state of knowledge regarding zoonotic hepeviruses and the epidemiology of the infection in human population"**, contains data from the literature on the zoonotic character of HEV infection. This topic structured in three subchapters describes the ability of HEV to cross barrier species, zoonotic infection factors, and epidemiological situation of human infection associated with zoonotic HEV strains. Both natural and experimental studies show that not all HEV strains isolated from animals can be associated with zoonotic infection. In Europe, food is considered the main source of transmission of HEV infection. The predominance of HEV-3c subtype in humans and the substitution of those previously prevalent in some countries have been associated with imports of pork meat from other European countries.

The second part of this doctoral thesis, **"Personal contributions"** consists of six chapters (V-X): first chapter assigned to the description of the purpose, objectives and activities associated, followed by four chapters detailing each study undertaken, (material and method, results and discussions), and a final chapter dedicated to the final conclusions listing the remarks observed after the general analysis of the results obtained.

In Romania, the absence of a hepatitis E notification program makes this disease underdiagnosed. The purpose of this research was to assess the zoonotic character of circulating HEV strains in Romania through investigations aiming to improve the epidemiological and etiological data of HEV infection in the country's eastern area. In this regard, the proposed objectives were: to highlight HEV circulation in wild animals in eastern Romania by identifying the seroprevalence of specific anti-HEV antibodies in wild boars; identifying circulating HEV strains in wild animals whose meat can be consumed by humans; assessing the role of rats in the epidemiology of HEV infection in the studied area; identification of circulating HEV strains in the human population of the eastern part of the country; phylogenetic relationships between the strains identified, among them and previously detected in domestic swine in Romania and other HEV strains worldwide, available in GenBank. For this purpose, a series of

main activities, along with some with preliminary or secondary character, have been undertaken successively, aiming at achieving the proposed objectives. These activities have used serological and molecular methods, and bioinformatics analysis. These are described in Chapter V, **"Goal and objectives"**.

In Chapter VI, entitled **"Seroepidemiological investigation on hepatitis E infection in wild boars"**, results of serological testing (detection of anti-HEV IgG antibodies) of serum samples collected from wild boars in 7 counties from eastern Romania are presented. During the 2014 and 2015 hunting seasons, 218 serum samples were collected from wild boars. Samples were tested using ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species commercial kit (IDVet Diagnostics, Montpellier, France). The protocol was performed according to the manufacturer instructions.

The data on the boars' age were obtained for the animals in Galati County and their distribution in hunting funds was known for Buzau County, in addition to Galati. The distribution of samples number in the 7 counties varied, the largest number of samples being collected from wild boars in Iasi County (n=110), followed by Galati County (n=38) and Buzau County (n=30). A smaller number of samples were collected from wild boars in several counties: Bacau (n=18), Vrancea (n=16), Suceava (n=5) and Botosani (n=1).

The seroprevalence of anti-HEV IgG antibodies was 11.92% (26/218; 95% CI, 0.076-0.162). The analysis of obtained results showed that wild boars from 5 out of 7 counties were identified positive. These results were obtained probably due to the uneven distribution of the number of samples in each county. Seropositive animals were identified in two out of 18 analysed hunting funds in Galati County and in 3 out of 15 analysed hunting funds in Buzau County. Our results signalled the persistent character and the spread of HEV infection in wild boars in eastern Romania, by identifying the infection in other hunting funds than those previously identified positively by Botezatu et al., 2014.

The reported seroprevalence was higher than previously detected in wild boars in the studied area and lower to the ones reported in other European countries. Our results may be explained by the use of different diagnostic techniques, factors related to the biological and ecological characteristics of wild boar populations and those related to the spread of the virus during the analysed periods.

The analysis of HEV seropositivity by age groups are in line with literature confirming that HEV infection in wild boars is not age related. This results provided premises to investigate the hepatitis E virus presence in Romanian wild boar as well as in other wild animals, which are considered as potential HEV reservoirs.

Chapter VII, **"Molecular detection of hepatitis E virus in wild boars, cervids and wild rabbits"**, includes the results obtained at molecular analysis on collected samples from wild boars, cervids and wild rabbits from the study area. Samples were collected during the hunting seasons 2013-2015, dedicated to each species. The analysis included 78 samples, 50 from wild boars (liver samples, n=45 and spleen samples, n=5), 16 from cervids (liver samples) and 12 from wild rabbits (liver

samples). The data on the age of the cervids and rabbits from which the liver samples were collected and that on the distribution of the animals in the two species of cervids analysed, *Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*, are unknown. Age data were obtained for 37 of the 50 wild boars analysed. The animals were divided into three age groups: less than 1 year (n=4), between 1 and 2 years (n=11), older than 2 years (n=22). For analysis were used conventional molecular methods [Cooper et al., 2005; Bouquet et al., 2011] and in real time [Jothikumar et al., 2006; Barnaud et al., 2012]. Bioinformatics analysis included the tools needed to frame the identified HEV strains (BIOEDIT, BLAST, MEGA 7).

The obtained results show that HEV has been identified in 9 samples of the 78 analysed, these originating from wild boars. Data published in literature highlights that the lack or low rates of HEV detection in cervids is common for a number of studies that have carried out simultaneous research on wild boars and cervids. Based on these data, some hypotheses have been issued, which may be a part of the cause for the lack HEV detection in cervids: their selectivity in the choice of food and water sources, as well as the anatomical features - lack of gallbladder. Deoxycholic acid secreted by gallbladder is essential for the dissociation of lipids from virions.

Positive wild boars for HEV originated from two counties: Vrancea and Suceava, which are located on opposite sides of the analyzed area - eastern Romania. The overall HEV prevalence in wild boars was 18% (9/50). HEV prevalence for each positive-identified county were 25% (2/8) and 23.33% (7/30), respectively. HEV RNA was detected in wild boars aged between 1 and 2 years (2/11 to 18.18%) and in animals older than 2 years (7/22 - 31.81%). The analysis of the results, according to the type of tissue analysed, showed that two of nine RNA HEV-positive samples are splenic tissue.

Subsequent analyses showed that five nested RT-PCR products were obtained: one of the two positive spleen samples and four of the seven positive liver samples. To characterize the HEV strains, the positive products were sequenced and analyzed. Results showed that different HEV-3 subtypes are circulating in two counties which were found to have HEV-positive wild boar.

These results are in line with those noted in the literature, which show that prevalence rates are influenced by various factors and that the grouping of the HEV strains according to the geographical sample area, is common to other studies.

The reporting of these results to those presented in the literature has led to the suspicion of the zoonotic character of the identified HEV strains following genetically association with human HEV strains isolated from autochthonous infection cases. Presence of HEV in wild boars and previously detection of HEV in domestic swine from Romania suggests a possible correlation of the increased seroprevalence rates of anti-HEV IgG antibodies in human population in the same area.

In order to evaluate the role of rats in the epidemiology of HEV infection in the study area but also in other wild animals, in chapter VIII, **"Molecular identification of HEV strains circulating in rats and other animal species"**, molecular analyses and bioinformatics were performed in order to frame the circulating HEV strains. A total of 69 liver samples collected from wild animals (52 rats, 4 ferrets, 1 coypu, 1 bizam, 1 mole, 1 mouse and 9 foxes) were analysed by molecular biology methods. All samples were tested by three protocols described in the literature. Two of these are specific for detection of human HEV (HEV-1-HEV-4) and have been described in previous chapter. The protocol for detection of different hepeviruses, including rat HEV. [Johne et al., 2010] was used. Following the analysis, HEV was identified in rats only using HEV detection protocol described by Johnne et al., 2010.

Additionally, samples collected from foxes were analysed by two classical PCR methods developed for this purpose, which used primer sets described by Bodewes et al., 2013 for the detection of HEV in foxes in the Netherlands. These protocols targeted two different regions of the virus and were identified as: PCR-ORF2 and PCR-ORF1, depending on the amplified segment. The electrophoretic analysis of amplification products obtained by PCR-ORF1 revealed the presence of a DNA band at the expected position (362 bp) for one out of 9 analysed samples. The presence of nonspecific amplification bands for this PCR product bring us in attention the need of optimization of developed protocols and reconfirmation of the presence of HEV in foxes in our country.

Rats were captured in different locations in 4 counties (Suceava, Iasi, Bacau and Tulcea) situated in the study area: the proximity of a swine farm with an intensive system, the proximity of a semi-intensive system swine farm, the proximity of a swine farm in an extensive system, the proximity of a farm with various animal species, the proximity of a cattle farm, the proximity of garbage canes and the surroundings of rural settlements. 9 of the 52 tested samples were identified ARN-HEV positive. The analysis of the results showed that HEV is present in rats in each analysed county and in 4 locations of the 7 analysed. These results show a broad distribution of HEV in rats in the study area.

Characterization of identified HEV strains has revealed that belongs to HEV subtype C1, specific to rats. The phylogenetic analysis revealed different genetic degrees of genetic relatedness between isolated strains (84.84% - 91.18%) and the maximum nucleotide identity between these and those from GenBank database ranged between 85% and 89%. The same analysis showed that one of the strains identified in rats in Bacău is genetically linked to two HEV-4 strains, isolated from swine in China, at 73% and 72% (nucleotide identity). These findings generates new data on the degree of genetic association between species of the *Orthohepevirus* genus.

Chapter IX, **"Research on the zoonotic character of the HEV infection through its evaluation in the eastern Romania's human population"**, includes results of serological and molecular analyses for HEV infection detection in patient groups from eastern Romania. Biological samples (serum, plasma or faeces) were

collected from three sanitary units in eastern Romania: "Sfanta Parascheva" Infectious Diseases Hospital of Iasi, Public Health Directorate of Iași (DSP Vrancea) and the Public Health Directorate of Vrancea (DSP Vrancea).

Two groups of patients from two hospitals: patients with acute hepatitis ("Sfanta Parascheva" Infectious Diseases Hospital of Iasi) and patients without liver disease (Emergency County Hospital "St. Pantelimon" Focsani). In the first group (n=94), patients with acute hepatitis of unknown cause (n=48) and patients with acute non-A, non-B hepatitis (n=46) were included. In the second group (n=40), patients with TBC (n=3) and women patients in postnatal confinement (n=37) were included. The study also included 16 serum samples from medical staff at the "Sfanta Parascheva" Infectious Diseases Hospital of Iasi.

Serum samples from medical staff, from patients with acute hepatitis of unknown cause and those without liver disease were initially tested for the detection of total anti-HEV antibodies (Ab HEV) using the HEV Ab ELISA commercial kit (Diagnostic Bioprobes, Italy).

Subsequently, some of the samples from patients with acute hepatitis of unknown cause have been tested, along with samples from patients with acute non-A, non-B hepatitis for detection of anti-HEV IgM antibodies using HEV IgM ELISA commercial kit (Diagnostic Bioprobes, Italy). Serum samples from patients without hepatic disease Ab HEV positive and samples from patients with acute hepatitis with different serological results were tested for HEV RNA detection.

The results obtained revealed that HEV infection was present in 29.16% (95% IC, 16.31 - 42.03) of the patients with acute hepatitis of unknown cause and in 32.5% (95% IC, 17.98 - 47.02) of patients without hepatic disease, through the detection of total anti-HEV antibodies.

Detection of anti-HEV IgM antibodies in patients with acute hepatitis showed that 10% (9/90) had an acute infection with HEV at the time of hospitalization. Detection of HEV RNA in two patients out of 9 positive IgM anti-HEV shows that they have suffered HEV infection relatively recent to the time of hospitalization. One of two HEV -RNA positive patients consumed pork bought from a store.

The molecular characterization of circulating HEV has led to framing human strains in subtype HEV-3c, the most commonly identified subtype in Europe. Phylogenetic analysis revealed genetically relatedness of human, swine, wild boars and domestic goat HEV strains in Europe. These results, together with those obtained after wild boars HEV characterization, revealed the presence of different HEV-3 subtypes, leading to two hypotheses regarding HEV infection detected in humans. First hypothesis suggests the association of infection with pork imports from EU countries where HEV-3c is prevalent and the second hypothesis suggests the possibility of an indigenous infection and implicitly the existence of different HEV subtypes in humans and animals in Romania.

Chapter X, "**Final conclusions**", summarizes the partial conclusions, following an overview of the data presented in the previous chapters. The results provide new data on HEV dynamics in susceptible populations in Romania. Observations made during this study suggests the possibility of HEV zoonotic transmission and the need to implement a national program for prevention, surveillance and control of hepatitis E in Romania.

PARTEA I
- STADIUL CUNOAȘTERII -

PART I
- CURRENT STATE OF KNOWLEDGE -

CAPITOLUL I

DATE BIBLIOGRAFICE PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E

CHAPTER I

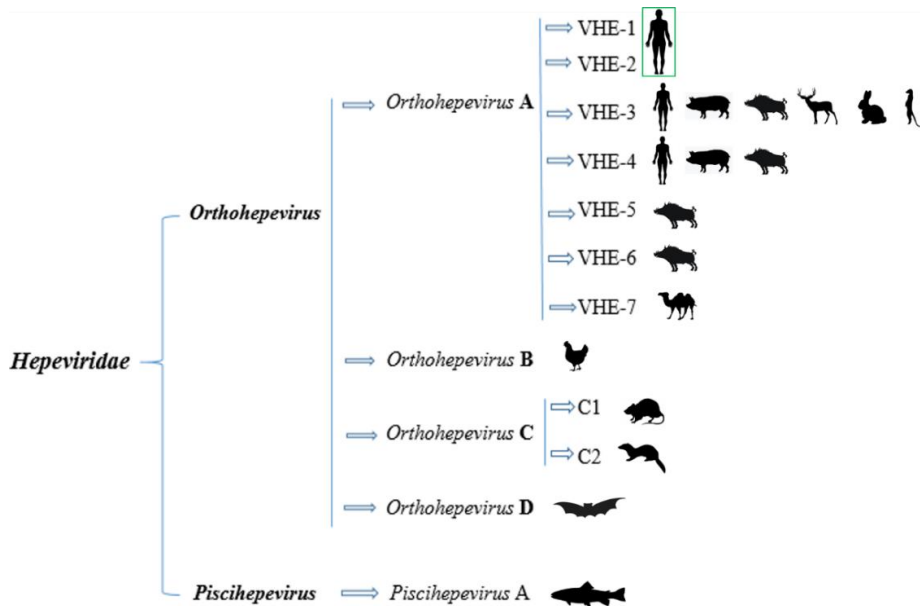
LITERATURE REVIEW ON HEPATITIS E VIRUS INFECTION

1.1 Descrierea agentului patogen - virusul hepatitei E

Virusul hepatitei E (VHE) este agentul cauzal al unei hepatite acute, autolimitante la om și al unei infecții subclinice la animale [Aggarwal, 2011; Pavio și colab., 2010]. Virusul hepatitei E este încadrat în familia *Hepeviridae*, care cuprinde două genotipuri distincte: *Orthohepevirus* și *Piscihepevirus* [Smith și colab., 2014].

1.1.1 Încadrarea taxonomică și relațiile filogenetice în cadrul familiei Hepeviridae

Descrierile publicate recent, cu privire la diviziunile taxonomice din cadrul familiei *Hepeviridae*, sunt contradictorii în ceea ce privește alocarea de specii și genotipuri. Prin analiza secvențelor existente s-a propus o schemă taxonomică, în care această familie să se dividă în genul *Orthohepevirus*, pentru încadrarea tulpinilor VHE izolate de la mamifere și păsări și *Piscihepevirus*, pentru cele izolate de la păstrăv. În cadrul genului *Orthohepevirus* au fost desemnate speciile *Orthohepevirus A* pentru încadrarea tulpinile VHE izolate de la om, porc, mistreț, cerb, mangustă, iepure și cămilă, *Orthohepevirus B* pentru tulpinile VHE izolate de la pasăre, *Orthohepevirus C* pentru cele izolate de la șobolan, marele iepure marsupial, scorpia mosc Asiatică, dihor și nurcă, și *Orthohepevirus D* pentru tulpinile VHE izolate de la liliac. De asemenea, analiza secvențelor existente a dus la încadrarea în genotipuri specifice a tulpinilor VHE în cadrul speciilor *Orthohepevirus A* și *Orthohepevirus C*. Tulpinile VHE izolate de la om au fost încadrate în 4 din cele 7 genotipuri ale speciei *Orthohepevirus A* (VHE-1, VHE-2, VHE-3 și VHE-4). Genotipurile 1 și 2 includ tulpinile VHE strict patogene pentru om, iar genotipurile 3 și 4 includ tulpini VHE cu caracter zoonotic (figura 1.1) [Smith și colab., 2014].

**Figura 1.1** Încadrarea taxonomică a VHE**Figure 1.1** Taxonomy of HEV

(conform descrierilor publicate de Smith și colab., 2014)

În scopul cunoașterii dinamicii epidemiologice a infecțiilor cu fiecare variantă genetică a VHE, precum și identificării principalelor căi de transmitere, mai ales a celor care sunt influențate de activitățile umane, au fost realizate studii menite să desemneze diferite subtipuri pentru tulpinile virale, patogene pentru om, în cadrul genotipurilor VHE 1-4. Criteriile prin care secvențele VHE au fost selectate pentru desemnarea subtipurilor de către Lu și colab., în anul 2006, au fost controversate și uneori au produs confuzii. Dat fiind faptul că până în anul 2006 au fost înregistrate doar 49 de secvențe ale întregului genom a VHE în GenBank, desemnarea mai multor subtipuri a avut la bază caracterizarea secvențelor regiunilor subgenomice.

Studiul epidemiologic retrospectiv, privind analiza moleculară al tulpinilor VHE din întreaga lume, realizat de Oliveira-Filho și colab., în anul 2013, arată că până în anul 2012 au fost efectuate 187 de secvențieri ale întregului genom, cel mai mare număr fiind realizat în Asia (78.07%). În anul 2016, din cele 240 de secvențe ale întregului genom al VHE, disponibile în GenBank, peste 120 de secvențe aparțin genotipului 3 [Doceul și colab., 2016]. Analiza filogenetică a secvențelor genomului complet a dus la desemnarea de secvențe de referință pentru fiecare subtip al VHE [Smith și colab., 2016]. Cu toate acestea, generarea arborilor filogenetici folosind secvențe scurte din regiuni subgenomice selectate (regiuni parțiale a ORF1 sau a ORF2) cu structuri similare cu cei generați pe baza secvențelor întregului genom au arătat că acestea pot fi utilizate pentru a subtipa majoritatea secvențelor VHE existente la ora actuală [Vina-Rodriguez și colab., 2015; Doceul și colab., 2016].

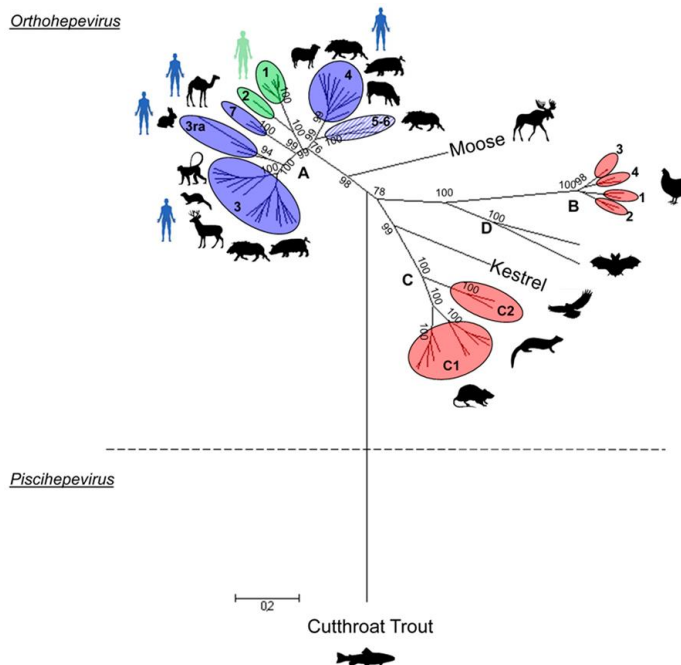


Figura 1.2 Reprezentarea filogenetică a tulpinilor de referință a membrilor familiei *Hepeviridae*

Figure 1.2 Phylogenetic tree of representative members of the Hepeviridae family [Doucel și colab., 2016]

Cele două genotipuri, strict patogene pentru om (VHE-1 și VHE-2), sunt înrudite genetic în proporție de 76% (identitate nucleotidică). Genotipul 1 este bine descris, fiind împărțit în 6 subtipuri (1a - 1f), în timp ce genotipul 2 este mai puțin documentat, fiind divizat în două subtipuri (2a și 2b) (figura 1.2) [Doceul și colab., 2016].

Tulpinile VHE-3 izolate de la om și animale, cu excepția celor izolate de la iepure, au fost încadrate în 10 subtipuri și în două clade principale, 3abchij (subtipurile 3a, 3b, 3c, 3h, 3i și 3j) și 3efg (subtipuri 3e, 3f și 3g). Identitatea nucleotidică a tulpinilor VHE încadrate în aceste două clade are valori cuprinse între 78.74% și 82.46%. În prezent, subtipul 3d nu a fost încadrat în nici una din cele două clade specificate. În cadrul primei clade, 3abchij, tulpinile VHE pot fi separate în două subclade, 3abj și 3chi, care împărtășesc o identitate nucleotidică cuprinsă între 81.16% și 85.33%. Identitatea nucleotidică dintre tulpinile VHE, grupate în subclada 3chi, are valori cuprinse între 84.7% și 96.46% și provin din Europa (Franța și Germania) și Mongolia. Tulpinile VHE din subclada 3abj prezintă o identitate nucleotidică mai mare de 83,75% și au fost izolate în Asia, Europa și America de Nord. Cea de a doua cladă, 3efg, include cele trei subtipuri e, f și g, înrudite genetic (82.75% - 90.57) și trei subtipuri neatribuite. Tulpinile VHE încadrate în subtipurile 3e și 3f au fost raportate, preponderent, în Asia și Europa [Doceul și colab., 2016].

Subtipul 3ra a fost desemnat provizoriu pentru a include tulpinie VHE izolate de la iepuri și o tulpină VHE izolată dintr-un caz uman de hepatită E (80.12% - 86.14% identitate nucleotidică) (figura 1.2). Pentru asignarea izolatelor VHE de la iepure în subtipul 3ra este necesară caracterizarea întregului genom a VHE de la această specie [Doceul și colab., 2016; Smith și colab., 2016].

Tulpinile VHE încadrate în genotipul 4 (VHE – 4) au fost izolate de la om și de la suinele domestice și cele sălbatice, în principal din Asia. Tulpinile VHE încadrate în acest genotip sunt înrudite cu cele din celelalte genotipuri VHE în proporții de 71.79% - 77.38% [Doceul și colab., 2016].

Genotipurile 5 și 6 au fost desemnate pentru a încadra tulpinile VHE izolate de la mistreți în Japonia [Takahashi și colab., 2011; Doceul și colab., 2016]. Tulpina VHE încadrată în genotipul 6, s-a dovedit a fi divergentă față de cele încadrate în genotipurile 3 și 4 (22.6% - 27.7% identitate nucleotidică) [Takahashi și colab., 2011].

Genotipul 7 cuprinde două tulpini izolate de la cămilă și o tulpină VHE izolată de la om (pacient cu transplant hepatic), acestea fiind înrudite genetic în proporții mai mari de 86%. Identitatea nucleotidică dintre aceste izolate și cele încadrate în genotipurile 1 - 6 are valori cuprinse între 72.55% - 76.13% [Doceul și colab., 2016].

Pe baza procentelor scăzute de similaritate nucleotidică (51.47%–55.05%) tulpinile VHE izolate de la păsări, încadrate în specia *Orthohepevirus B*, s-au dovedit a fi divergente față de cele izolate de la mamifere [Doceul și colab., 2016].

Tulpinile VHE încadrate în specia *Orthohepevirus C* sunt înrudite cu tulpinile VHE din cadrul celorlalte specii ale genului *Orthohepevirus* în proporții de 51.68% - 60.57%. Analiza filogenetică a secvențelor genomice complete ale tulpinilor VHE identificate la șobolani, a arătat că acestea sunt grupate în trei clade diferite în cadrul genotipului C1, care pot constitui trei posibile subtipuri. Genotipul C2 cuprinde tulpinile VHE izolate de la dihor și nură (figura 1.2) [Doceul și colab., 2016].

Specia *Orthohepevirus D* încadrează tulpinile VHE izolate de la lilieci. Această specie împarte între 52.8% și 56.06% identitate nucleotidică cu celelalte specii din cadrul genului *Orthohepevirus* [Doceul și colab., 2016].

În SUA a fost identificată o tulpină VHE la păstrăv. Gradul redus de înrudire genetică dintre acesta și tulpinile VHE izolate de la mamifere (13 - 27% identitate nucleotidică) a dus la o nouă propunere de gen în cadrul familiei *Hepeviridae*, genul *Piscihepevirus* [Yugo și Meng, 2013].

1.1.2 Structura virionului și organizarea genomului

Virionii VHE sunt particule icosaedrale, nude (lipsite de pericapsidă), cu diametre de aproximativ 27nm - 34nm. Pe baza observațiilor de la microscopia electronică, morfologia VHE s-a dovedit a fi similară cu cea a "virusurilor mici, rotunde", virusul Norwalk (familia *Caliciviridae*) și virusul hepatitei A (familia *Picornaviridae*) [Mori și Matsuura, 2011].

Genomul virusului hepatitei E este de tip ARN liniar, monocatenar, nesegmentat, cu polaritate pozitivă. Acesta are o lungime de aproximativ 7300 de nucleotide și conține trei cadre deschise de citire (ORFs 1-3). În plus, în genom au fost identificate două elemente cis-reactive (CRE) cu rol esențial în replicarea virală. Primul element cis-reactiv se suprapune cu capetele 3' ale ORF2 și UTR (regiune necodantă), iar cel de al 2-lea este localizat în joncțiunea (JR) dintre ORF1 și regiunea ARN subgenomică (figura 1.3) [Cao și Meng, 2012]. Organizarea genomului este asemănătoare ARNm de la eucariote, fiind căptușit la capătului 5' cu 7-metilguanozine (m⁷G) și poliadenilat la capătul 3' (coda poli A) [Kabrane-Lazizi și colab., 1999b; Reyes și colab., 1990].

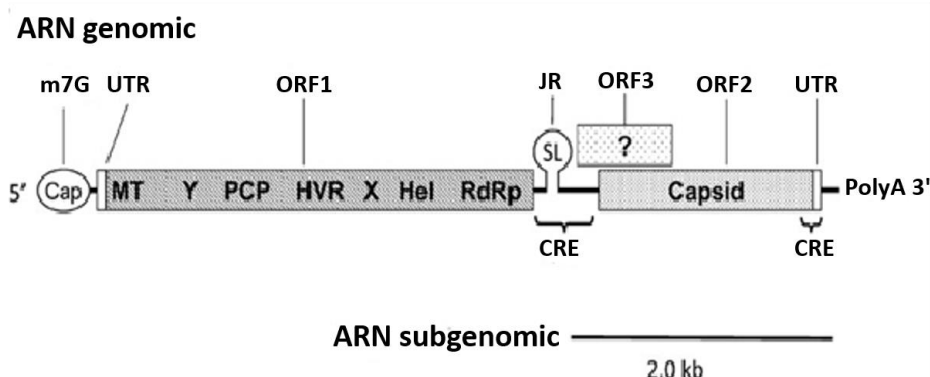


Figura 1.3 Reprezentarea schematică a organizării genomului VHE
Figure 1.3 A schematic diagram of the organization of the HEV genome
 [după Cao și Meng, 2012]

Primul cadru de lectură (ORF1) începe la capătul 5' al genomului viral după o secvență de 27 nucleotide ale regiunii necodante (5'UTR) și are o lungime de 5079 perechi de baze. ORF1 codifică o poliproteină de circa 1690 aminoacizi (aa) care este scindată în proteine nestructurale. Rolul ORF1 în replicarea genomului viral, transcripție și scindării proteice este dat de structurile sale conservate: metiltransferaza (MT), proteaza cisteinică asemănătoare papeinei (PCP), regiunea hipervaribilă bogată în prolină (HVR), helicaza (Hel) și ARN polimeraza-ARN dependentă (RdRp). În plus, ORF1 are două regiuni numite domenii, Y și X, cu funcții necunoscute (figura 1.3) [Koonin și colab., 1992].

Al 2-lea cadru de lectură (ORF2) începe de la nucleotida 5147 și se extinde până la nucleotida 7127, având o lungime de 1980 de nucleotide. ORF2 codează principala proteină structurală formată din 660 de aminoacizi (88kD). Aceasta este sintetizată și scindată prin intermediul semnalului secvenței de clivaj, în proteină matură, capabilă de auto-asociere și glicozilare. Glicozilarea acestei proteine la nivelul celor 3 situsuri posibile de glicozilare dependente de N (azot) are loc în reticulul endoplasmic [Zafrullah și colab., 1999]. Pe lângă localizarea membranară și de

suprafață, o fracțiune din proteina ORF2 este localizată în citoplasmă. Există două posibilități prin care o glicoproteină are acces în citoplasmă: direct prin retro-translocare din RE în citoplasmă sau prin transport retrograd de la suprafața celulară [Surjit și colab., 2007]. Proteina capsidei codificată de ORF2 este responsabilă de inducerea răspunsului imun umoral de protecție [Meng și colab., 2001].

Al 3-lea cadru de lectură (ORF3) se asociază citoscheletului hepatocelular și codează pentru o fosfoproteină foarte mică (123 de aminoacizi). Proteina codată de ORF3 interacționează cu întreaga lungime a formei neglicozilate a proteinei ORF2, ceea ce indică faptul că aceasta poate avea un rol în asamblarea virală. De asemenea, se crede că proteina ORF3 poate interacționa cu proteine nonvirale [Graff și colab., 2005]. Proteina ORF3 este cunoscută pentru interacțiunea sa cu alte proteine celulare cu proprietăți imunosupresive. Observațiile privind secreția sporită de α -microglobulină imunosupresoare în prezența proteinei ORF3, demonstrează faptul că acesta este un mecanism utilizat de virus pentru a menține un mediu de imunosupresie în jurul hepatocitelor, ajutându-l astfel în timpul infecției naturale [Ratra R. și colab., 2009].

Conform descrierilor publicate de Raj și colab., 2012, genomul VHE încadrate în specia *Orthohepevirus C* pare să conțină, în plus, un al 4-lea cadru deschis de citire (ORF4) cu funcție necunoscută.

1.1.3 Replicarea genomului

Datorită lipsei unui sistem eficient de cultură celulară sau a unui model animal, mecanismele replicării VHE nu sunt bine cunoscute. Cu toate acestea, a fost propus un model de replicare bazat pe analogia cu alte virusuri cu genom de tip ARN monocatenar și pe descrierile publicate cu privire la VHE. Pentru atașarea și pătrunderea virusului în celula gazdă nu au fost identificați receptori sau căi specifice, dar un rol îl pot avea proteoglicanii heparan sulfat. De asemenea, a fost emisă ipoteza în care situsurile de legarea a polizaharidelor din domeniile pORF2 ar putea fi implicate în aceste mecanisme [Guu și colab., 2009]. După pătrunderea virusului în celulele receptive, genomul viral este decapsidat și translatat de către ribozomii celulelor gazdă în proteine nestructurale codificate de ORF1. Se presupune că scindarea acestor proteine nestructurale codificate de ORF1 este realizată de către proteaza asemănătoare papeinei. ARN polimeraza dependentă de ARN (RdRp) poate fi implicată în generarea ambelor catene: pozitivă și negativă. Catenele ARN cu polaritate negativă servesc ca matrice pentru sinteza ARN-ului genomic cu polaritate pozitivă, precum și pentru cea a ARN-ului subgenomic de aceeași polaritate. În același timp, ARN-ul subgenomic (3,7 kb) inițiază producerea de proteine structurale codificate de ORF2 și ORF3. După asamblarea capsidei nucleare la ARN-ul genomic, probabil cu implicarea fosfoproteinei codificată de ORF3, are loc eliberarea virionilor noi formați prin mecanisme necunoscute (figura 1.4) [Chandra și colab., 2008].

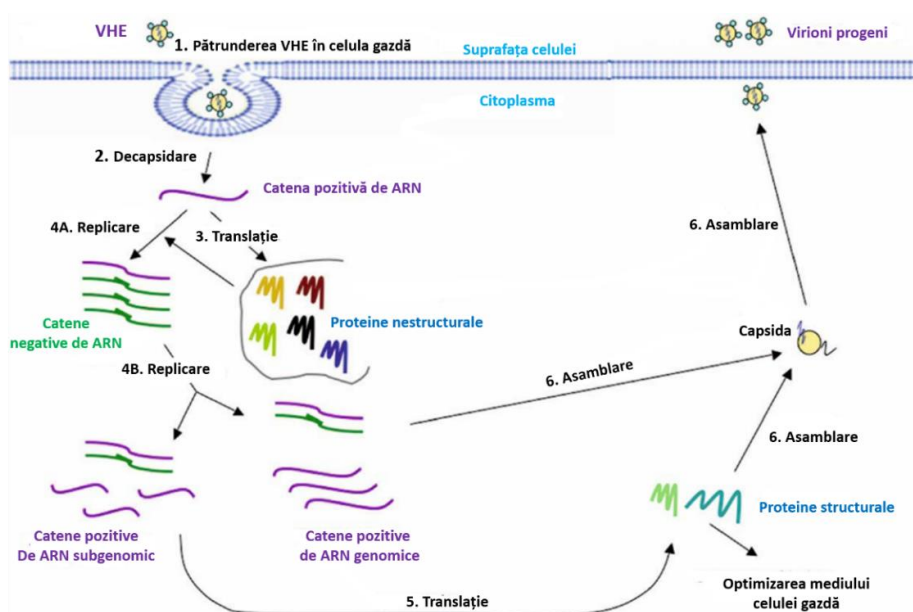


Figura 1.4 Reprezentarea schematică a ciclului de replicare al VHE
Figure 1.4 Proposed replication cycle of HEV [după Chandra și colab., 2008]

1.2 Descrierea entității morbide - hepatita E

Infecția cu VHE determină o boală hepatică acută, asemănătoare cu cea indusă de infecția cu virusul hepatitei A. Nespecificitatea, precum și diversitatea simptomelor clinice pot duce la un diagnostic eronat. În plus, majoritatea infecțiilor cu VHE sunt asimptomatice, având în vedere seroprevalența ridicată în unele țări dezvoltate, cum ar fi Marea Britanie, Germania și Franța, și de numărul relativ scăzut al infecțiilor diagnosticate clinic [Lapa și colab., 2015].

1.2.1 Caractere epidemiologice

Hepatita E este o boală emergentă cu caracter zoonotic prezentă în întreaga lume. În țările în curs de dezvoltare, infecția cu VHE evoluează endemic determinând o hepatită acută. Principala cale de transmitere a VHE este cea fecal-orală.

Receptivitate și surse de infecție

Genotipurile VHE-1 și VHE-2, strict patogene pentru om, sunt responsabile de apariția unor epidemii de hepatită acută în țările în curs de dezvoltare. Principala sursă de infecție este reprezentată de apa contaminată de către particulele virale excretate în cantități mari în materiile fecale de către populația infectată [Aggarwal, 2011].

Genotipurile VHE-3 și VHE-4 includ tulpini cu caracter zoonotic. Identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE la diferite specii de animale (porci, pasări, iepuri, șobolani, manguste, ș.a.) semnalează o gamă largă de gazde receptive, precum și diversitatea virusului hepatitei E [Meng., 2011]. Suinele domestice și cele sălbatice sunt considerate principalele rezervoare de virus VHE-3 și VHE-4 [Pavio și colab., 2010]. Infecția cu virusul hepatitei E la suine este larg răspândită în fermele de porci din întreaga lume atât în țările în curs de dezvoltare, cât și în cele industrializate. Cercetările privind importanța activităților de vânatoare și consumul cărnii de mistreți în expunerea oamenilor la diverși agenți patogeni, au demonstrat că această specie este și o sursă de infecție cu VHE [Meng și colab., 2009]. Cervidele sunt, de asemenea, rezervoare de virus VHE-3 și VHE-4. Relațiile filogenetice dintre tulpinile VHE izolate de la cervide și cele de la om, au sugerat că această specie poate reprezenta o sursă importantă de infecție cu VHE [Tei și colab., 2003]. Tulpini VHE înrudite genetic cu cele ale VHE-3 au fost izolate de la manguste. Abilitatea VHE la mangustă de a infecta întreaga specie este necunoscută [Nakamura și colab., 2006]. Cercetările efectuate de Cossaboom și colab., 2012, au demonstrat că virusul hepatitei E de la iepure poate traversa bariera de specie, sugerând că această specie poate reprezenta o sursă de infecție cu VHE pentru alte specii.

Șobolanii au fost mult timp suspecți ca un potențial rezervor de VHE. Tulpinile VHE-3 izolate de la șobolani capturați din jurul fermelor de porci, în Japonia, s-au dovedit a fi înrudite genetic cu tulpinile izolate de la animalele din fermele respective [Kanai Y. și colab., 2012]. Aceste rezultate nu sunt în concordanță cu cele relatate în studiile experimentale, care atestă faptul că VHE de la șobolan nu poate traversa bariera de specie [Doceul și colab., 2016].

Pe baza dovezilor serologice sau / și virusologice, VHE circulă și în alte efective de animale (rumegătoare domestice, carnivore și diferite specii de rozătoare) decât cele anterior menționate. Rolul acestor animale în infecția cu VHE nu este cunoscut.

Căi de transmitere ale infecției cu VHE

Principala cale de transmitere a VHE este cea fecal-orală. Calitatea apelor de suprafață afectează în mod direct populația. Cercetările privind prezența VHE în sursele de apă potabilă pentru consum și în cele utilizate în practicile agricole au raportat rate crescute de detecție a virusului în cadrul acestor surse. Apele reziduale și spațiile de depozitare a gunoierului de la animale, din fermele de porci, au fost implicate în infecțiile cu VHE-3 la om [Yugo și Meng., 2013; Perez-Gracia și colab., 2014].

Virusul hepatitei E își pierde capacitatea infectantă la temperaturi de 71°C, timp de 20 de minute [Barnaud și colab. 2012]. Transmiterea VHE prin ingestia cărnii și a subproduselor crude sau insuficient preparate provenite de la animalele sălbatice (cervide și mistreți) și cele domestice (porc și probabil iepure) infectate a fost documentată. Hepatita acută cu etiologie VHE a fost diagnosticată la pacienții care au consumat ficat și intestine de porc, carne și ficat de mistreț și carne de căprioară, crude

sau insuficient preparate termic [Pelosi și Clarke, 2008]. În Franța, produsele cu ficat de porc sunt asociate cu infecțiile autohtone de hepatită E la om [Berto și colab., 2013].

În comparație cu virusul hepatitei A (VHA), transmiterea secundară a VHE este un eveniment mai puțin frecvent în ambele contexte, atât în cel de focar cât și în cel de infecție sporadică [Pelosi și Clarke, 2008]. Alte căi de transmitere, precum cea verticală de la mama la făt și cea orizontală prin intermediul transfuziilor de sânge integral sau cu unele componente sangvine și prin transplantul de organe, au fost raportate, dar mai puțin frecvente decât cele anterior descrise (figura 1.5).

Expunerea la infecția cu VHE prin contactul cu animalele infectate a fost semnalată în literatura de specialitate. Persoanele care au intrat în contact direct cu porci: medici veterinari, crescători și fermierii din China, Thailanda, Olanda, Suedia, Republica Moldova și Statele Unite, au fost susceptibili la infecția cu VHE.

La suine, pe lângă calea fecal-orală, mișcările de animale de la o fermă la alta a fost sugerată ca fiind o altă cale de transmitere a VHE [Vasickova și colab., 2009].

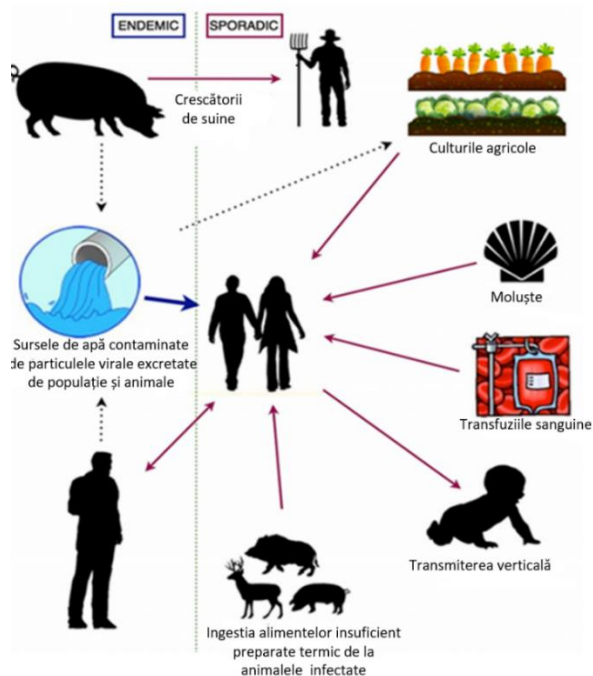


Figura 1.5 Căi de transmitere a VHE
Figure 1.5 Transmission routes of HEV
 [după Perez-Gracia și colab., 2014]

Dinamica epidemiologică

Infecția cu VHE are caracter hiperendemic în multe țări în curs de dezvoltare, cum ar fi India, Bangladesh, Egipt, Mexic, și China. Conform Centrului pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (CDC), în țările hiperendemice, hepatita E înregistrează o prevalență mai mare de 25% din totalul cazurilor de hepatită acută non-A, non-B. Infecția cu VHE are caracter endemic în țările în care această boală înregistrează valori mai mici de 25% din totalul cazurilor de hepatită non-A, non-B. Caracterul endemic al infecției cu VHE a fost raportat într-un număr mare de țări din Europa de Vest, SUA, America de Sud, Asia, Orientul Mijlociu și Noua Zeelandă (figura 1.6). Cantităților crescute de particule virale excretate de oameni și animale în faza acută a infecției contribuie, probabil, la menținerea ciclului de endemicitate [CDC; Yugo și Meng, 2013].

Infecțiile cu VHE-1 și VHE-2 au caracter de endemicitate și au fost raportate în Asia și în mai multe țări din America Latină, Mexic și Africa. Genotipurile 3 și 4 includ tulpini cu caracter zoonotic și au fost izolate din cazurile sporadice de hepatită E acută la om și de la mai multe animale, rezervoare de virus, în special de la porcul domestic, mistreț și căprioară [Kumar și colab., 2013].

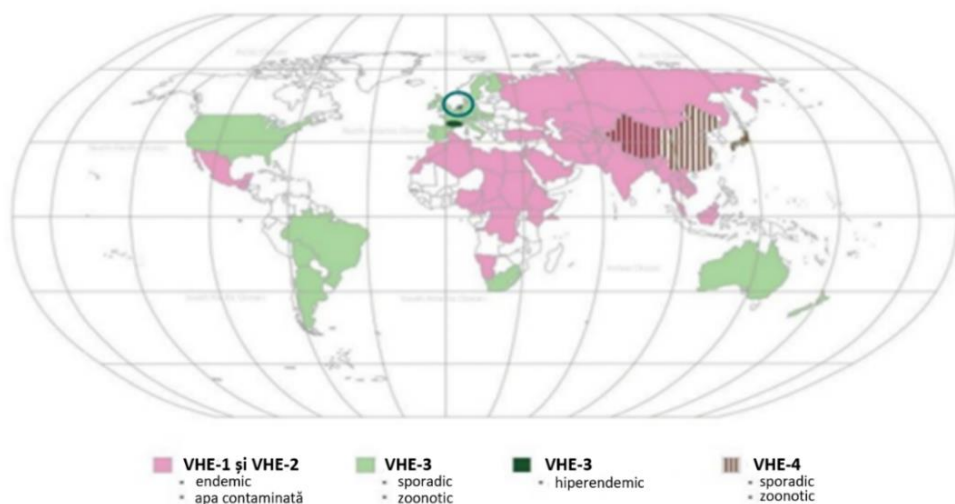


Figura 1.6 Distribuția geografică a cazurilor de hepatită E la om
Figure 1.6 Geographical distribution of human cases of Hepatitis E
 [după Adlhoch, 2016]

1.2.2 Patogeneza infecției cu VHE

Virusul hepatitei E este un virus cu tropism hepatic. Patogeneza infecției cu VHE, responsabilă pentru patologia hepatică și boala clinică, nu este pe deplin înțeleasă. Rezultatele cercetărilor privind infecțiile naturale cu VHE la subiecții umani și cele experimentale la primatelor infectate, sugerează că patologia hepatică este mai degrabă mediată de răspunsul imun al gazdei decât de acțiunea citotoxică directă a VHE.

Dinamica infecției cu VHE la om

La om, VHE provoacă o boală icterică acută cu evoluție stadială, de la forma subclinică de hepatită la cea fulminantă. Infecția debutează cu o perioadă de incubatie de 2 săptămâni până la 2 luni și o viremie tranzitorie, urmată de eliminarea virusului prin fecale. Dispariția viremiei și apariția semnelor clinice, precum și regresia eliminării virusului prin fecale cu o potențială stare de icter se observă la aproximativ 2-3 săptămâni de la infecție. Răspunsul imun este marcat de creșterea IgM anti-VHE urmată îndeaproape de IgG anti-VHE. Titrul IgM scade pe parcursul a 4-6 luni, iar IgG persistă o perioadă mai lungă de timp (figura 1.7) [Krawczynski și colab., 2011].

Monitorizarea a 20 de pacienți cu hepatită E de către Aggarwal și colab., 2000 a avut ca rezultat următoarele observații cu privire la dinamica infecției cu VHE: detecția ARN-ului VHE în serul sangvin la 29 de zile de la apariția simptomelor clinice la toți pacienții și după 45 de zile la un singur pacient, precum și lipsa acestuia în materiile fecale colectate la 35 de zile de la apariția primelor semne de boală.

O trasătură clinică și de patogenitate distinctă a hepatitei E, comparativ cu celelalte hepatite virale, este incidența și severitatea crescută a acestei boli la femeile însărcinate. Deși mecanismul nu este cunoscut, a fost prezentată o ipoteză pentru explicarea patogenezei hepatitei E fulminante la femeile însărcinate. Aceasta sugerează faptul că celulele sinuoase ale ficatului, în special celulele Kupffer, sunt afectate de VHE, ceea ce duce la diminuarea capacității de fagocitare a endotoxinelor elaborate de bacteriile Gram negative.

Hepatocitele pot fi afectate direct de endotoxine sau indirect de hormonii eicosanoizi (acizi grași polinesaturați cu un lanț de 20 de atomi de C) care produc agregare plachetară, inflamație și alte efecte negative. Eliberarea de prostaglandine cu rol chemotactic determină migrarea neutrofililor la locul infecției. Acest lucru poate duce la acumularea de lichid în țesuturi (edem) precum și la întreruperea fluxului biliar (colestază). Sensibilitatea sporită a femeilor însărcinate la acțiunea unui astfel de efect mediat de endotoxine este bine cunoscută și ar putea explica mortalitatea surprinzător de ridicată a acestora la infecția cu VHE. Cu toate acestea, validitatea acestei ipoteze, precum și mecanismele celulare/moleculare care stau la baza acesteia nu au fost confirmate [Jameel, 1999].

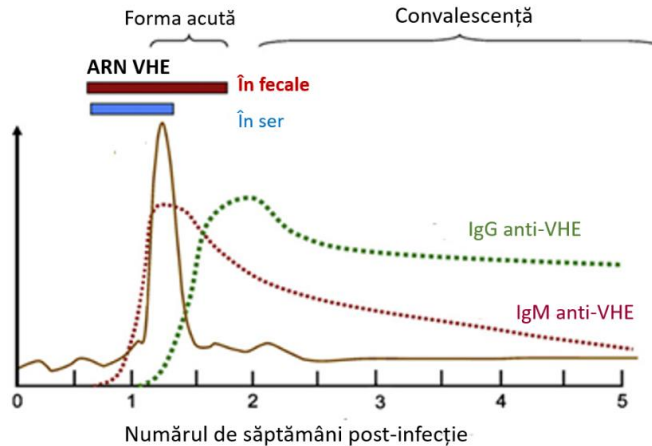


Figura 1.7 Dinamica infecției cu VHE la om

Figure 1.7 Dynamics of human HEV infection [după Krawczynski și colab., 2011]

Forma cronică a hepatitei E a fost prima dată raportată în anul 2008 la 8 pacienți francezi cu transplant de organe și cu consum de medicamente imunosupresoare, la care s-a observat o creștere rapidă a transaminazelor. Formele cronice de hepatită E au fost, de asemenea, raportate la pacienți cu boli hematologice, la cei cu HIV, sau la cei cu tratamente chimioterapice. Manifestări non-hepatice (pancreatită acută, glomerulonefrită membranoasă, etc) au fost observate în infecții cu VHE [Aggarwal și Jameel, 2011].

Dinamica infecției cu VHE la animale

Infecția naturală și experimentală cu VHE la suinele domestice (VHE-3 și VHE-4) determină o evoluție subclinică a bolii cu leziuni microscopice reduse la nivelul ficatului și a ganglionilor limfatici. Viremia are o durată de aproximativ 1-2 săptămâni, iar eliminarea virusului prin fecale are loc pe parcursul a 3-7 săptămâni. Infecția cu VHE la suine este dependentă de vârstă, până la 86% din porci infectați având vârsta de maxim 18 săptămâni [Leblanc D. și col., 2007]. Rezultatele studiilor efectuate în Marea Britanie, Spania și Japonia au arătat că eliminarea unui titru crescut de particole virale prin fecale a avut loc la următoarele categorii de vârstă: 10-12 săptămâni, 13-16 săptămâni și respectiv 1-3 luni [De Deus și colab., 2008; McCreary și colab., 2008; Nakai și colab., 2006]. Răspunsul imun, caracterizat prin apariția anticorpilor anti-VHE la suine apare ca urmare a scăderii anticorpilor maternali în jurul vârstei de 8-10 săptămâni și se concretizează prin apariția în primul rând a IgM anti VHE, aceasta atingând un titru maxim la debutul eliminării virusului prin fecale. IgG apare la scurt timp după apariția IgM și este în concordanță cu sfârșitul eliminării virusului prin fecale (figura 1.8) [Pavio și colab., 2010].

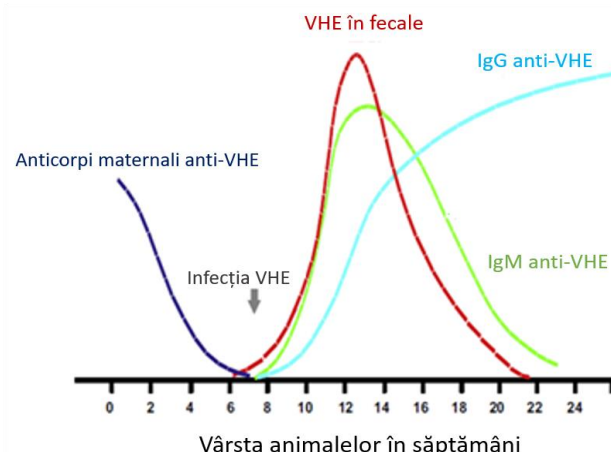


Figura 1.8 Dinamica infecției cu VHE la suine

Figure 1.8 Dynamics of swine HEV infection [după Pavio și colab., 2010]

Coinfecțiile dintre VHE și alți viruși pot produce disfuncții ale sistemului imunitar la suinele infectate. De exemplu, suinele domestice infectate cu VHE și cu circovirusul porcin tip 2 (PCV2) sunt mult mai susceptibile de a fi infectate cu virusurile Torque Teno (TTVs) [Savic și colab., 2010]. Coinfecția cu HEV/PRRSV (virusul sindromului respirator și de reproducție la porcine), frecvent observată în efectivele de suine, poate duce la infecții hepatice cronice și respectiv la prezența VHE în ficatul animalelor la momentul sacrificării [Salines și colab., 2015].

Spre deosebire de suinele domestice, la mistreți rate crescute de detecție a VHE au fost raportate atât la animalele tinere cât și la cele adulte. Mai mult, heterogenitatea VHE de la mistreți este mai mare decât cea a VHE de la suinele domestice [Oliveira-Filho și colab., 2013].

1.3 Diagnosticul infecției cu virusul hepatitei E

Simptomatologia infecției cu hepatita E este aproape indistinctibilă de cea a celorlalte infecții hepatice virale, cu excepția caracteristicilor epidemiologice și a factorilor de risc. Ținând cont de aceste aspecte, diagnosticarea hepatitei E trebuie să fie o opțiune pentru fiecare pacient cu semne clinice de hepatită [Aggarwal, 2011]. Cea mai certă metodă de depistare a infecției cu VHE este reprezentată de detecția ARN-ului viral prin tehnica PCR convențional sau în timp real. Această metodă este, de obicei, precedată de cele imunologice de depistare a markerilor infecției cu VHE.

Datorită caracterului asimptomatic al hepatitei E la animale, acestea sunt mai degrabă supuse unor examene de depistare decât unui diagnostic, cercetarea markerilor infecției cu VHE fiind esențială în stabilirea endemicității. Cel mai frecvent seroconversia este evidențiată prin prezența IgG anti-VHE sau a anticorpilor totali [Perianu și colab., 2012; Răpuntean 2014].

1.3.1 Exemenul serologic

Testele imunologice sunt teste de diagnostic practice, extrem de sensibile și economice pentru detectarea anticorpilor specifici infecției cu VHE. Proteinele recombinante ale VHE, derivate din sușele Burma și Mexico, au fost utilizate pentru realizarea de teste imunoenzimatiche necesare detectării anticorpilor anti-VHE. Domenii antigenice au fost identificate în structura proteinelor codificate de cele trei cadre deschise de citire ale VHE: 12 domenii antigenice în pORF1 (în special în domeniul ARN polimeraza- ARN dependentă), 6 domenii antigenice în pORF2 și 3 domenii antigenice în pORF3 [Vasickova și colab., 2007]. Cu toate acestea, ORF2 este cel mai imunogen, domeniile sale antigenice fiind folosite în majoritatea testelor serologice.

Kit-urile comerciale disponibile pentru diagnosticarea infecțiilor acute cu VHE diferă în ceea ce privește parametrii care definesc un test de diagnostic, sensibilitatea și respectiv specificitatea, majoritatea testelor indicând o specificitate ridicată pe baza valorilor scăzute a rezultatelor fals-pozitive. Cele mai multe teste sunt utilizate pentru detecția IgM și IgG, IgA chiar dacă este detectabilă în ser, nu este un marker analizat în majoritatea studiilor [Legrand-Abravanel și colab., 2009].

În prezent, există diverse teste imunoenzimatiche utilizate pentru detecția anticorpilor anti-VHE (ELISA și Western blot), atât comerciale, cât și dezvoltate in-house. Unul dintre cele mai utilizate kit-uri comerciale, este kit-ul HEV ELISA 4.0 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) captușit cu un antigen recombinat ce prezintă un epitop conformațional înalt conservat în diverse tulpini virale. Printre kiturile utilizate în studiile efectuate în Europa, se numără și kit-ul HEV Ab-ELISA (Axiom, Bürstadt, Germany), test ELISA dublu-sandwich care utilizează o porțiune semnificativă a proteinei ORF2 a VHE-1.

PrioCHECK HEV Ab (Prionics, Schlieren-Zürich, Elveția), este un kit ELISA indirect pentru detecția IgG anti-VHE în serul porcilor domestici, ce se bazează pe domeniile antigenice ale pORF2 și pORF3 ale VHE-1 și VHE-3. Un alt kit ELISA pentru identificarea anticorpilor specifici anti-VHE la animale este kitul ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța). Acest test a fost utilizat de Aniță, în anul 2012 pentru a pune în evidență prezența anticorpilor IgG anti-VHE în probele de ser recoltate de la suinele domestice și sălbatice din România [Aniță, 2010].

Testul recomBlotHEV IgG/IgM a fost produs și comercializat de Mikrogen GmbH (Neuried, Germany). Acest test a fost utilizat de Voiculescu M. și colab., în anul 2010 pentru determinarea seroprevalenței anticorpilor IgG anti-VHE la persoane din diferite categorii de risc, din sudul și sud-estul României. În anul 2010, Baechlein și colab., a adaptat acest kit pentru detectarea anticorpilor anti-VHE din probele de ser recoltate de la porci domestici din Germania, obținând o seroprevalență de 49.8% din totalul probelor testate.

1.3.2 Examenul virusologic

Virusul hepatitei E se replică în titruri relativ scăzute *in vivo*, iar creșterea și multiplicarea sa în culturi celulare (*in vitro*) s-a dovedit a fi extrem de dificilă. Primele sisteme *in vitro* capabile să multiplice particulele infecțioase VHE în titruri ridicate, au utilizat liniile celulare PLC/PRF/5 derivate din carcinomul hepatocelular uman și celulele A549 derivate din cancerul pulmonar uman, iar ca adjuvanți, acidul dezoxicolic și tripsina. Succesul obținut inițial cu genotipul 3, tulpina JE03-1760F, a fost extins la diferite tulpini ale VHE din probele de fecale și ser ale pacienților cu hepatită E, precum și din probele de fecale, ser și țesut hepatic ale porcilor domestici și mistreților cu hepatită E [Okamoto, 2013]. Dezvoltarea modelelor de replicare *in vitro* a VHE de către Rogée și colab., 2013, prin utilizarea liniilor celulare PICM-19 (linie celulară derivată din celule stem embrionare de origine porcină) și HepaRG (linie celulară derivată din hepatomul uman), reprezintă instrumente puternice pentru studiile cu privire la replicarea virală, a traversării barierei de specie și a factorilor de virulență a VHE [Rogée și colab., 2013]. Descrierile publicate recent de către Chingwaru și colab., 2016, au arătat ca VHE 3 de la porc poate fi propagat pe culturi celulare primare de origine suină (celulele epiteliale și macrofage), în prezența tripsinei în mediul de cultură [Chingwaru și colab., 2016]. Cu toate acestea, datorită lipsei sau apariției unui efect citopatic redus, detecția VHE se face, în principal, prin utilizarea testelor de biologie moleculară, cum ar fi cel de tip PCR.

Detectarea acidului nucleic viral (ARN), reprezintă o abordare extrem de sensibilă și specifică pentru diagnosticul infecțiilor curente cu VHE. Testele de detectare a ARN-ului VHE au avantajul de a fi independente de tipul probei și de speciile gazdă. Astfel, aceste teste pot fi utilizate nu numai pentru detectarea ARN-ului VHE în anumite tipuri de probe biologice de la oameni sau de la diferite specii de animale, ci și pentru detectarea acestuia în probele de apă și în alte probe din mediu înconjurător. Cu toate acestea, ratele de prevalență variază în funcție de proba biologică folosită (prevalența poate crește atunci când se folosesc mai multe probe biologice), de factorii în legătură cu primerii, precum și de specificitatea, locația și mărimea fragmentului țintă a genomului viral (fragmente de talie mai mică pot fi amplificate mai ușor) [de Deus și colab., 2007; Adlhoch și colab., 2009]. De asemenea, trebuie remarcat faptul că alegerea unei metode adecvate de extracție, trebuie să recupereze ARN-ul intact și să elimine substanțe inhibitoare, acestea fiind foarte importante pentru detectarea cu succes a genomului viral.

Cel mai frecvent, detectarea ARN-ului VHE se realizează prin tehnicile PCR: RT-PCR, RT-nested PCR sau PCR în timp real (qRT-PCR), amplificând fragmente genomice în oricare din cele trei cadre deschise de citire (ORF). Tehnicile de amplificare constituie etape inițiale în determinarea genotipului VHE prezent într-o anumită probă. Aceste tehnici sunt de asemenea utilizate ca etape premergătoare în secvențierea genomului viral, care poate determina gradul de omologie dintre tulpinile izolate din diverse surse de VHE. Există diferite protocoale pentru testele PCR, cele

mai multe dintre ele vizând regiunile conservate din ORF1, ORF2 sau din regiunea de suprapunere a ORF2/ORF3. Datorită heterogenității genetice a VHE, au fost dezvoltate protocoale PCR capabile să detecteze cele patru genotipuri patogene pentru om (VHE1-4) într-o singură reacție [Aggarwal, 2013]. Dintre acestea, cel mai utilizat protocol de amplificare prin RT-nested PCR este cel elaborat de Cooper și colab., 2005, iar cel de amplificare prin PCR în timp real este cel elaborat de Jothikumar și colab., 2006. Aceste protocoale au fost folosite ca atare, sau adaptate de unii autori.

În general protocoalele de detectare a ARN-ului VHE furnizate de literatura de specialitate, utilizează tehnica nested-PCR, datorită sensibilității crescute ca urmare a reamplificării regiunii de interes. Această reamplificare prevede utilizarea unor seturi de primeri interni, care poate fi considerată o strategie de confirmare a identității produsului PCR. În prezent, există o serie de protocoale RT-nested PCR elaborate pentru a depista VHE de la diverse specii de animale, prin utilizarea unor primeri specifici.

Alte tehnici de detectare a ARN-ului VHE, cum ar fi tehnica imunohistochimică, hibridizarea *in situ* și hibridizarea Southern Blot combinată cu transcripția inversă, au fost utilizate cu succes.

1.4 Măsurile de profilaxie și combatere ale infecției cu virusul hepatitei E

Prevenirea și combaterea infecției cu VHE sunt esențiale, mai ales în țările în curs de dezvoltare, unde dinamica epidemiologică a acestei infecții este de tip hiperendemic. Salubritatea și accesul la apa potabilă sunt cele mai eficiente modalități de a ține sub control infecția cu VHE, precum și a altor entități morbide transmise prin intermediul acestei surse [Pavio și colab., 2010]

1.4.1 Măsurile de profilaxie

Cele mai eficiente metode de prevenire a infecției cu VHE, ținând cont de faptul că principala cale de transmitere este cea fecal-orală, constau în: respectarea practicilor de igienă personală, alimentarea publică cu apă de înaltă calitate, evacuarea corespunzătoare a deșeurilor și siguranța generală a produselor alimentare.

În țările în curs de dezvoltare, strategia de prevenire a infecției cu VHE constă în reducerea expunerii prin îmbunătățirea infrastructurii sanitare, precum și prin furnizarea apei potabile decontaminate. În țările industrializate, măsurile de profilaxie sunt mult mai complexe deoarece există mai multe căi de transmitere a infecției care nu sunt pe deplin înțelese. În aceste țări, măsurile de profilaxie sunt focusate pe grupurile de risc crescut, cum sunt medicii veterinari și specialiștii care lucrează în imediata apropiere a suinelor. În acest sens, consumul cărnii și a produselor derivate insuficient preparate termic, provenind de la cervide, suinele domestice și sălbatice, trebuie evitate [Meng și colab., 2002].

Pentru realizarea măsurilor specifice de profilaxie la om, două posibile vaccinuri au fost supuse testelor clinice. Primul vaccin a fost preparat dintr-o proteină de 56kDa, codificată de ORF2, (aa 112-607), exprimată în celule de insecte, utilizând ca vector un buculovirus. Acest vaccin a fost testat în Nepal, pe 2000 de persoane voluntare, adulți, sănătoși, dar susceptibili la infecția cu VHE, eficacitatea acestui vaccin fiind de 95,5% [Shrestha colab., 2007]. Cel de al 2-lea vaccin VHE239 are la bază o proteină truncată de 26 kDa, p239 codificată de ORF2, VHE-1 (aa 368-606), exprimată în *Escherichia coli*. Acest vaccin a fost testat pe 11165 persoane din provincia Jiangsu, China, persoane cu vârsta cuprinsă într 16-65 de ani. Eficacitatea acestui vaccin s-a dovedit a fi de 100% după administrarea a trei doze la intervale de o săptămână, respectiv 6 săptămâni de la prima administrare [Zhu și colab., 2010].

Vacinul VHE239 a fost recent autorizat pentru utilizarea sa în China. Nu se știe dacă acest vaccin va fi disponibil și în alte țări. Disponibilitatea unui asemenea vaccin ar fi utilă în țările în curs de dezvoltare datorită caracterului endemic și hiperendemic al infecției cu VHE în aceste țări. Cu toate acestea, modul în care va fi finanțat un astfel de program de vaccinare nu este clar, deoarece unele dintre țările cu cea mai mare nevoie a unui astfel de vaccin sunt printre cele mai sărace din lume. În țările industrializate vaccinarea ar fi utilă în grupurile cu risc crescut la infecție, cum ar fi pacienți imunosupresați și cei cu boli hepatice cronice, precum și la persoanele care intenționează să călătorească în zonele endemice [Kamar și colab., 2012].

Datorită faptului că datele privind replicarea, patogenitatea și transmiterea interspecifică și intraspecifică a VHE la suine sunt incomplet cunoscute, prepararea unui vaccin sau a unei metode de profilaxie specifică nu a fost încă stipulată. Se consideră că în urma trecerii prin boală, animalul dezvoltă anticorpi neutralizanți și protectori [Perianu, 2012].

1.4.2 Măsuri de combatere

La om, utilizarea interferonului pegilat alfa 2a/alfa 2b sau a ribavirinei timp de 3-12 luni, a dus la absența detectării ARN-ului VHE în probele de ser, la 3-6 luni de la terminarea administrării acestor produse [Kamar și colab., 2012].

În momentul apariției unui focar de infecție, manipularea și eliminarea dejecțiilor provenite de la animalele infectate trebuie să respecte normele sanitar-veterinare, fiind obligatoriu supuse. În efectivele infectate animalele trebuie testate prin examen serologic și virusologic (RT-PCR) pentru identificarea suinelor purtătoare [Perianu, 2012].

CAPITOLUL II

STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E LA ANIMALE SĂLBATICE

CHAPTER II

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE ON HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN WILD ANIMALS

La începutul anilor '90, au fost efectuate primele cercetări cu privire la infecția cu VHE la animale. După infecția experimentală, suinele domestice au eliminat particule VHE prin fecale [Balayan și colab., 1990]. Într-un studiu, ulterior, a fost raportată prezența anticorpilor IgG anti-VHE și a ARN-ului VHE, prin RT-PCR, la suinele investigate [Clayson și co lab., 1995]. Prima caracterizare a VHE la animale a fost făcută în anul 1997, la suinele domestice din SUA. Pe baza analizei unui fragment parțial al genomului VHE, s-a confirmat faptul că tulpinile izolate de la acestea sunt înrudite genetic cu tulpinile VHE identificate la om [Meng și colab., 1997]. Aceste cercetări au reprezentat fundamentul studiilor ulterioare, în prezent, VHE fiind identificat și caracterizat la diverse specii de animale (mistreți, cervide, iepuri, șobolani, manguste, dihuri, nurci, lilieci, etc), din întreaga lume (figura 2.1). Dintre acestea, suinele domestice și cele sălbatice sunt considerate principalele surse de infecție cu VHE-3 și VHE-4 [Meng, 2009].

Cercetarea activă cu privire la indentificarea gazdelor rezervor de VHE, sugerează o gamă în continuă extindere, iar în cadrul familiei *Hepeviridae* sunt descrise în mod continuu clade filogenetice pentru încadrarea tulpinilor identificate. Cele mai recente exemple în acest sens sunt cele de atribuire a noi clade pentru încadrarea VHE identificat și caracterizat la liliac și cămilă [Drexler și colab., 2012; Woo și colab., 2014]. Aceste rezultate împreună cu avansarea tehnicilor de biologie moleculară, cum ar fi metagenomica, sugerează posibilitatea identificării unor noi tulpini de VHE la alte specii de animale, în viitorul apropiat [Yugo și Meng, 2013; Boadella, 2015].

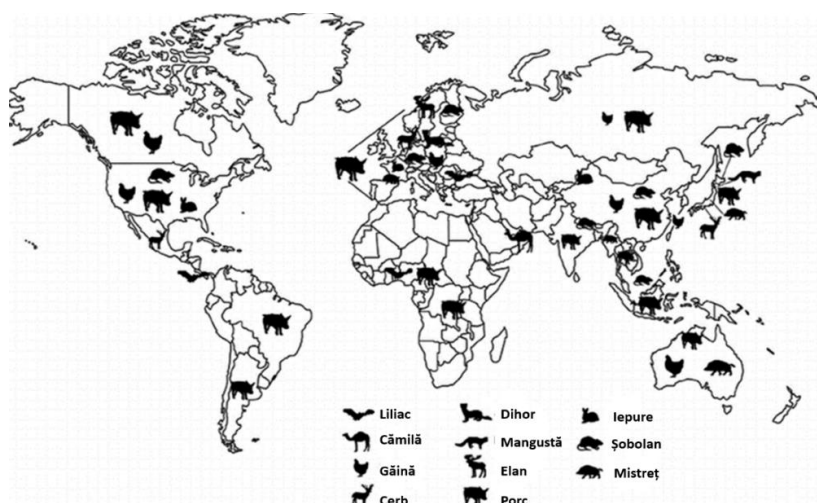


Figura 2.1 Distribuția geografică a VHE la animalele terestre

Figure 2.1 Geographical distribution of hepatitis E virus in terrestrial animals.
[după Sridhar și colab., 2012]

2.1 Cercetări privind infecția cu VHE la mistreți, cervide și la iepurele sălbatic

Raportarea cazurilor de infecție cu VHE la oameni ca urmare a consumului de cărnii de vânat de cerb (*Cervus nippon*), în anul 2003 de către Tei și colab., a reprezentat prima dovadă a transmiterii zoonotice directe a VHE prin intermediul alimentelor contaminate. Aceste rezultate au dus la intensificarea cercetărilor cu privire la identificarea VHE la animalele sălbatice a căror carne de vânat este destinată consumului uman.

2.1.1 Cercetări privind infecția cu VHE la mistreți

După suinele domestice, mistreții sunt considerate importante rezervoare de virus VHE. Prima semnalare a infecției cu VHE la mistreți a fost făcută în Australia, în anul 1999, prin identificarea anticorpi anti-VHE [Chandler și colab., 1999], dar prima detectare a ARN-ului VHE la mistreți a fost raportată în anul 2004, în Japonia [Sonoda și colab., 2004]. De atunci și până în prezent infecția cu VHE a fost detectată în efectivele de mistreți din întreaga lume (Tabelul 2.1). Ratele de seroprevalență a anticorpilor anti-VHE la mistreți variază între 3% și 56.2%, iar prevalența ARN-ului VHE între 2% și 68.2%. O serie de factori, precum tipul de țesut supus analizei, stadiul infecției în momentul prelevării probelor, caracterele fenotipice și diferențele ecologice ale populațiilor de mistreți, dimensiunea eșantioanelor analizate, etc., au fost sugerați

ca fiind implicați în ratele diferite de prevalență a VHE la mistreți [Adlhoch și colab., 2009; Caruso și colab., 2015; Jori și colab., 2016].

Tabelul 2.1/Table 2.1

Studii privind infecția cu VHE la mistreți / Studies on HEV infection in wild boars

Țara	Rata de detecție a anticorpilor anti-VHE	Rata de detecție a ARN-ului VHE	Referința
Australia	17% (15/59)	-	Chandler și colab., 1999
Japonia	9% (3/35)	2.4% (1/41)	Sonoda și colab., 2004
	25.5% (100/392)	3.1% (12/392)	Michitaka și colab., 2007
	4.4% (4/89)	1/89	Sakano și colab., 2009
	8.1% (41/507)	3.3% (19/578)	Sato și colab., 2011
	11.4% (58/511)	4.2% (24/511)	Takahashi și colab., 2014
Tailanda	-	2% (1/51)	Wiratsudakul și colab., 2012
USA	3% (9/306)	-	Dong și cola., 2011
Franța	-	2.5% (47/285)	Kaba și colab., 2010
	14% (59/421)	-	Carpentier și colab., 2012
	-	5.8% (5/86)	Lhomme și colab., 2015b
	26.1% (74/284)	1.8% (5/284)	Jori și colab., 2016
Germania	-	5.3% (10/189)	Kaci și colab., 2008
	-	14.9% (22/148)	Schielke și colab., 2009
	30% (32/107)	68.2% (90/132)	Adlhoch și colab., 2009b
	23.9% (81/339)	16.8% (39/232)	Anheyer-Behmenburg și colab., 2017
Ungaria	-	12% (9/74)	Reutere și colab., 2009
	-	11% (8/75)	Forgách și colab., 2010
Italia	-	25% (22/88)	Martelli și colab., 2008
	10.2% (226/2211)	0/77	Martinelli și colab., 2015
	4.9% (29/594)	3.7% (12/320)	Caruso și colab., 2015
	40.7% (93/228)	33.5% (55/164)	Montagnaro și colab., 2015
	56.2% (36/64)	9.4% (6/64)	Mazzei și colab., 2015
	-	1.5 % (3/196)	Di Profio și colab., 2016
	-	13.7% (40/291)	Apraia și colab., 2017
Olanda	-	4% (1/26)	Rutjes și colab., 2009
	12% (165/1029)	8% (8/106)	Rutjes și colab., 2010
Estonia	12% (293/1029)	7.5% (8/106)	Rutjes și colab., 2010
	17.2% (81/471)	16.0% (13/81)	Ivanova și colab., 2015
Belgia	34% (130/383)	4/69; 4/61	Thiry și colab., 2015
Spania	42% (64/150)	20% (27/138)	de Deus și col., 2008b
	26% (248/942)	-	Boadella și colab 2012
	57.40% (62/108)	10.12% (16/158)	Kukielka și colab., 2016
Suedia	-	8.2% (3/159)	Widén și col., 2011
Polonia	44.4% (116/261)	-	Larska și colab., 2015
	31% (90/290)	-	Weiner și colab., 2016
Portugalia	-	25% (20/80); 10% (4/40)	Mesquita și colab., 2014
Croația	-	12.3% (66/536)	Prpic și colab., 2016
Lituania	57.05 (178/312)	-	Spancerniene și colab., 2016

Tulpinile VHE identificate la mistreți, pe baza analizei filogenetice, sunt încadrate în genotipul 3 (VHE-3), cu excepția unor tulpini identificate la mistreții din Japonia, încadrate în genotipurile 4, 5 și 6 (VHE-4, VHE-5 și VHE-6). Datorită divergenței genetice față de celelalte tulpini VHE alocate în diferite genotipuri, tulpina wbJNN 13, izolată de la un mistreț din Japonia, s-a sugerat a fi încadrată într-un nou genotip [Sato și colab., 2011; Takahashi și colab., 2011; Takahashi și colab., 2014].

În cadrul genotipului 3, subtipul 3a este cel mai reprezentativ la nivel mondial, cele mai multe tulpini VHE de la mistreți fiind încadrate în acest subtip. Studiile efectuate în țările Europene: Germania, Italia, Portugalia, Olanda și Ungaria, au raportat diferite subtipuri la mistreți identificați VHE pozitiv. Subtipurile 3e și 3f sunt distribuite pe scară largă în Europa, iar subtipul 3c pare să fie specific pentru Europa Centrală și în Europa de Sud, în special pentru tulpinile izolate de la mistreții din Germania și Olanda, respectiv Italia. Subtipurile 3h și 3i au fost de asemenea identificate la mistreții din Germania și Italia. În Germania, a fost identificată pentru prima dată o tulpină VHE de la mistreți aparținând subtipului 3b (tabelul 2.2).

Tabelul 2.2/Table 2.2

Încadrarea în subtipuri a tulpinilor VHE identificate la mistreți, în Europa
Classification in HEV subtypes of the wild boar strains, identified in Europe

Țara	Subtipurile VHE-3	Referința
Germania	3i, 3h, 3f, 3e	Adlhoch și colab., 2009
	3i, 3h, 3a, 3c, 3g.	Schielke și colan., 2009
	3a, 3i, 3b	Vina-Rodríguez și colab., 2015
Portugalia	3e	Mesquita și colab., 2014
Olanda	3c	Rutjes și colab., 2010
Italia	3e, 3f	Caruso și colab., 2015
	3f, 3e, 3h, 3c, 3i	Mazzei și colab., 2015
	3c	Di Profio și colab., 2016
Ungaria	3a	Forgach și colab., 2010

2.1.2 Cercetări privind infecția cu VHE la cervide

După prima documentare a prezenței ARN-ului VHE în carnea de vânat de la cerbul Sika (*Cervus nippon*) din Japonia, în anul 2003, studiile ulterioare au fost efectuate pentru a determina prevalența infecției cu VHE la diverse specii de cervide din întreaga lume. Cu toate acestea, prevalența infecției cu VHE în rândul cervidelor nu este pe deplin cunoscută în majoritatea țărilor. Mai mult, în Japonia, seroprevalența anticorpilor anti-VHE pare a fi, în general, scăzută (2% - 35%), iar de la episodul din 2003 și până în prezent ARN-ul VHE nu a mai fost identificat în studiile transversale efectuate pe diferite probe recoltate de la cerbii Sika. Cea mai mare seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE (63%) a fost raportată la cerbii cu coada albă (*Odocoileus virginianus*) din Mexic. În țările Europene, prevalența VHE este în general mai mare decât cele raportate în Japonia și SUA [Boadella, 2015]. În plus, cercetările efectuate

În Olanda și Spania au pus în evidență atât prezența anticorpilor anti-VHE, cât și pe cea a ARN-ului viral la cerbul roșu (*Cervus elaphus*) (tabelul 2.3).

Tabelul 2.3/Table 2.3

Studii privind infecția cu VHE la cervide / Studies on HEV infection in cervids

Țara	Specia	Rata de detecție a anticorpilor anti-VHE	Rata de detecție a ARN-ului VHE	Referință
Japonia	C. nipon	-	1/1	Tei și colab., 2003
	C. nipon	2% (2/117)	-	Sonoda și colab., 2004
	C. nipon	2.6% (25/976)	0/254	Matsuura și colab., 2007
	C. nipon	35% (181/520)	-	Tomiya și colab., 2009
	C. nipon	-	0/78	Ishida și colab., 2012
China	Diverse specii	-	35% (7/20)	Zhang și colab., 2008
USA	C. nipon	0/155	-	Yu și colab., 2007
	O. virginianus	0/788	-	Dong și colab., 2011
Mexic	O. virginianus	-	63%(217/347)	Medrano și colab., 2012
Coreea de Sud	Diverse specii	33.7% (30/89)	-	Song și colab., 2013
Ungaria	C. capreolus	-	34% (11/32)	Reuter și colab., 2009
	C. capreolus	-	22% (9/41)	Forgách și colab., 2010
	Cervus elaphus	-	10% (3/30)	
Olanda	C. elaphus	5% (3/38)	15% (6/39)	Rutjes și colab., 2010
	C. capreolus	0/8	0/8	
Spania	C. capreolus	0/8	0/8	Boadella și colab., 2010
	C. elaphus	10% (101/968)	14% (11/81)	
	C. elaphus	12.85% (9/70)	16.05%(16/81)	Kukielka și colab., 2016
Polonia	Diverse specii	0/239	-	Larska și colab., 2015
Franța	Cervus elaphus	-	3.2% (2/62)	Lhomme și colab., 2015b
Lituania	C. capreolus	1.2% (2/166)	-	Spancerniene și colab., 2016
	C. elaphus	0 (0/108)	-	
Croatia	C. capreolus	-	0 (0/40)	Prpic și colab., 2015
	C. elaphus	-	0 (0/280)	
Germania	C. elaphus	2% (2/100)	1.9 (2/102)	Neumann și colab., 2016
	C. capreolus	6.8% (8/117)	0 (0/119))	
	Dama dama	0 (0/46)	4% (2/46)	
	C. capreolus	0/78	6.4% (5/78)	Anheyer-Behmenburg și colab., 2017
	C. elaphus	0/83	2.4% (2/83)	
Italia	C. elaphus	13.9% (35/251)	11.0% (10/91)	Di Bartolo și colab., 2017

2.1.3 Cercetări privind infecția cu VHE la iepurele sălbatic

Identificarea tulpinilor VHE-3 la iepurii de fermă din China și din SUA și la cei de fermă și sălbatici din Franța, au sugerat faptul că această specie ar putea servi ca rezervoare VHE pentru infecția la om [Geng și colab., 2011; Cossaboom și colab., 2012; Izopet și colab., 2012]. Aceste sugestii au fost susținute de gradul de înrudire genetică dintre anumite tulpini VHE identificate la om cu tulpini VHE identificate la

iepurii sălbatici din Franța și cu cele de la iepurele de companie (*Oryctolagus cuniculus*) din Italia [Izopet și colab., 2012; Caruso și colab., 2015]. Recent, Abravanel și colab., 2017, au încadrat o tulpină VHE izolată de la om în Franța (număr de acces în GenBank: [JQ013793](#)) în subtipul 3ra (subtip specific pentru tulpinile VHE de la iepure), pe baza gradului de similitudine cu o tulpină VHE izolată de la un iepure de fermă din China (număr de acces în GenBank: [FJ906895](#)). Rezultatele studiului publicat de Hammerschmidt și colab., 2017, au atribuit una din tulpinile identificate la iepurele sălbatic din Germania în subtipul 3g a genotipului VHE-3.

Cu toate că, în literatura de specialitate sunt publicate un număr redus de studii cu privire la infecția cu VHE la iepurele sălbatic, acestea au evidențiat rate relativ crescute de pozitivitate pentru ARN-ul VHE [Izopet și colab., 2012; Burt și colab., 2016] (tabelul 2.4). Studiile întreprinse de Burt și colab., 2016, în Olanda, au arătat că secvențele VHE identificate la iepurii sălbatici sunt distincte de cele identificate la om, sugerând că este puțin probabil ca aceștia să fie o sursă de VHE zoonotic.

Tabelul 2.4/Table 2.4

Studii privind infecția cu VHE la iepurele sălbatic în Europa
Studies on HEV infection in wild rabbits in Europe

Țara	Specia	Rata de detecție a anticorpilor anti-VHE	Rata de detecție a ARN-ului VHE	Referința
Franța	-	-	23% (47/205)	Izopet și colab., 2012
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-	5% (1/20)	Lhomme și colab., 2015b
Olanda	-	-	60% (18/30)	Burt și colab., 2016
Germania	<i>O. cuniculus</i>	37.3% (47/126)	17.1% (28/164)	Hammerschmidt și colab., 2017
	<i>Lepus europaeus</i>	2.2% (14/624)	-	

2.2 Cercetări privind infecția cu VHE la șobolan și la alte specii de animale sălbatice

Prima documentare a infecției cu VHE la rozătoare a fost făcută în Rusia (1993) folosind microscopia imunoelectronică (IEM) [Karetnyi și colab., 1993]. Această constatare este susținută de detectarea anticorpilor anti-VHE la numeroase specii de rozătoare din întreaga lume. O serie de studii serologice au raportat prezența anticorpilor anti-VHE la alte câteva specii de animale: câini, vaci, cai și caprine, însemnătatea lor în dinamica infecției cu VHE nefiind clar cunoscută datorită neidentificării virusului la aceste specii. De exemplu, la șobolani, iepuri, manguste, nurci, dihori și la vulpi VHE a fost identificat și caracterizat, tulpinile virale fiind înrudite genetic cu cele identificate la om și la suinele domestice și cele sălbatice [Dremsek și colab., 2011; Reimar și colab., 2014].

2.2.1 Cercetări privind infecția cu VHE la șobolan

Șobolanii au fost evaluați ca posibile rezervoare de VHE pe baza detecției anticorpi anti-VHE la diverse specii: șobolanul norvegian (*Rattus norvegicus*), șobolanul negru (*Rattus rattus*), șobolanul de bumbac (*Sigmodon hispidus*) și șobolanul mai mic (*Bandicota bengalensis*) [Favorov și colab., 2000; Arankalle și colab., 2001; Hirano și colab., 2003]. Ulterior, detecției ARN-ului VHE la șobolani din Germania [Reimar și colab., 2010; Reimar și colab., 2012], SUA [Purcell și colab., 2011], Vietnam [Li și colab., 2011], Japonia [Kanai și colab., 2012], Indonezia [Mulyanto și colab., 2013; Mulyanto și colab., 2014], China [Li și colab., 2013] și Franța [Widén și colab., 2014], arată că infecția cu VHE este distribuită pe scară largă la șobolani sălbatici din întreaga lume (tabelul 2.5).

Tulpini VHE identificate la șobolanul sălbatic (*Rattus norvegicus*) în Hamburg, Germania au o identitate nucleotidică de 59,9% cu tulpinile VHE de origine umană și de 49,9% cu cele de origine aviară [Reimar și colab., 2010]. În anul 2012, aceeași autorii au arătat că infecția cu VHE este prezentă la șobolani capturați în mai multe orașe din nord-estul și sud-vestul Germaniei [Reimar și colab., 2012].

În Japonia, caracterizarea VHE identificat la șobolani capturați din jurul fermelor a semnalat înrudirea genetică a tulpinilor izolate cu cele identificate la porci din fermele respective [Kanai și colab., 2012].

În China, VHE a fost identificat la șobolani capturați din imediata apropiere a gropilor de gunoi și din cea a fermelor de porci. Caracterizarea tulpinilor izolate de la șobolanii din imediata apropiere a fermelor de porci, a indicat că acestea sunt distincte genetic față de cele obținute de la suinele din fermele respective [Li și colab., 2013].

Tabelul 2.5/Table 2.5

Studii privind infecția cu VHE la șobolani în perioada 2000 – 2014

Studies on HEV infection in rats, 2000 - 2014

Țara	Specia	Rata de detecție a anticorpilor anti-VHE	Rata de detecție a ARN-ului VHE	Referința
USA	Diverse specii	38% (303/806)	-	Favorov și colab., 2000
India	<i>Bandicota bengalensis</i>	50%	-	Arankalle și colab., 2001
Japonia	<i>R. norvegicus</i>	31.5% (114/362)		Hirano și colab., 2003
	<i>Rattus rattus</i>	13.3% (12/90)		
	<i>R. norvegicus</i>	28.6% (16/56)	17.9% (10/56)	Kanai și colab., 2012
Germania	<i>R. norvegicus</i>	-	2/3	Reimar și colab., 2010
	<i>R. norvegicus</i>	10.2% (15/147)	24.5% (36/147)	Reimar și colab., 2012
Franța	<i>R. norvegicus</i>	-	15% (12/81)	Widén și colab., 2014
Vietnam	Diverse specii	20.9% (29/139)	1/5 (IgM+)	Li și colab., 2011
Japonia	<i>R. norvegicus</i>	28.6% (16/56)	17.9% (10/56)	Kanai și colab., 2012
China	Diverse specii	23.3% (166/713)	12/59 (IgM+)	Li și colab., 2013
Indonezia	<i>R. rattus</i>	18.1% (21/116)	14.7% (17/116)	Mulyanto și col., 2013
	<i>R. rattus</i>	37.1% (137/369)	26.3% (97/369)	Mulyanto și col., 2014

Cea mai recentă publicație cu privire la identificarea VHE la șobolani în Europa realizată de Ryll și colab., 2017, arată că VHE a fost identificat la 12.4% (63/508) din animalele analizate, în 11 din cel 12 țări luate în studiu (tabelul 2.6). De asemenea, rezultatele studiului au arătat, pentru prima dată, că VHE este prezent la șobolanul negru (*Rattus rattus*) din Europa. Tulpinile izolate au fost încadrate în specia *Orthohepevirus C*, specifică VHE de la șobolani, cu excepția tulpinii KS/16/825 izolată de la un șobolan din Belgia. Aceasta pe baza gradului de similitudine cu 3 tulpini VHE izolate de la iepure în China și cu o tulpină VHE izolată de la om în Franța, a fost încadrată în genotipul 3 (specia *Orohepevirus A*), subtipul 3ra.

Tabelul 2.6/Table 2.6

Rezultatele obținute de către Ryll și colab., 2017 privind detecția ARN-ul VHE la șobolani din 12 țări din Europa

The results obtained by Ryll et al., 2017, regarding the detection of rat HEV RNA in 12 European countries

Țara	Nr. probe testate	Nr. probe pozitive
Germania	156	17 (10.8%)
Ungaria	18	2 (11.1%)
Danemarca	11	3 (27.2%)
Austria	43	7 (16.2%)
Elveția	27	4 (13.7%)
Franța	28	5 (17.8%)
Italia	17	1 (5.8%)
Spania	50	2 (4%)
Grecia	20	2 (10%)
Slovenia	18	0
Grecia	60	8 (13.3%)
Republica Cehă	58	12 (20.6%)
Total	508	63 (12.4%)

2.2.2 Cercetări privind infecția cu VHE la alte specii de animale sălbatice

Infecția cu VHE a fost pusă în evidență la o serie de carnivore sălbatice. Dintre acestea, la speciile de manguste din Japonia au fost detectați atât anticorpi anti-VHE cât și ARN-ul viral. Virusul hepatitei E de la această specie a fost încadrat în genotipul 3 [Li și colab., 2006a; Nakamura și colab., 2006; Nidaira și colab., 2012]. În anul 2012, VHE a fost identificat la dihorul de companie (*Mustela putorius*), în Olanda [Raj și colab., 2012]. De atunci și până în prezent VHE a fost depistat la dihorii de laborator și de companie din SUA și Japonia. Pe baza înruderii genetice cu VHE de la șobolan, tulpinile izolate au fost încadrate în specia *Orthohepevirus C*, dar în genotipul C2, împreună cu cele de la nură. Virusul hepatitei E a fost depistat la nurele de crescătorie din Danemarca, dar nu și la cele sălbatice [Krog și colab., 2013]. În anul 2013, VHE a fost identificat la vulpile testate din Olanda. Analiza filogenetică a arătat că, cel mai probabil, hepevirusul de la vulpe este înrudit cu cele de la dihor și rozătoare [Bodewes și colab., 2013].

CAPITOLUL III

STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITEI E ÎN ROMÂNIA

CHAPTER III

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE REGARDING HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN ROMANIA

În România, situația epidemiologică a infecției cu VHE, atât la oameni cât și la animale nu este pe deplin cunoscută, majoritatea studiilor fiind limitate la anchete serologice și realizate preponderent în estul României.

3.1 Cercetări privind infecția cu VHE la om

Cercetări cu privire la infecția cu VHE la om au fost întreprinse la populația din estul României și la cea din sudul și sud-estul României și au constatat în detecția anticorpilor anti-VHE (tabelul 3.2). Studiile întreprinse la populația din estul României au fost realizate laolaltă cu investigațiile realizate la suinele domestice din aceeași regiune. Seroprevalența anticorpilor anti-VHE la populația din această regiune variază între 5.93% și 17.14% și a fost corelată cu prezența VHE la suinele domestice din județele respective [Savuța și colab., 2008; Aniță și colab., 2010; 2014].

Cercetările efectuate la populația din sudul și din sud-estul României au inclus persoane din 4 categorii de risc, printre care un grup de control (persoane care au solicitat examen medical n=2540), grup de persoane cu risc foarte scăzut (studenți n=44), grup de persoane cu risc scăzut (personal medical n=93) și un grup de persoane cu risc crescut (pacienți cu hemodializă n=174). Rezultatele acestui studiu au evidențiat prezența anticorpilor IgG anti-VHE la persoanele din grupul cu risc foarte scăzut (12.5%) și la cele din grupul cu risc scăzut (13.9%) [Voiculescu și colab., 2010].

În anul 2010, Kaba și colab., au efectuat un studiu cu privire la infecția cu VHE la persoanele fără adăpost din Franța, dintre acestea ARN-ul VHE a fost identificat la o persoană originară din România. Investigațiile serologice au arătat că această persoană a fost concomitent seronegativă pentru anticorpi IgG și IgM anti-VHE, precum și pentru anticorpi anti-VHB și anti-VHC. Caracterizarea tulpinii VHE

identificate a arătat că aceasta este înrudită genetic cu cele anterior detectate la persoanele din Spania și Franța [Kaba și colab., 2010].

Tabelul 3.1/Table 3.1

Studii serologice privind infecția cu VHE la om în România

Serological studies on HEV infection in humans in Romania

Regiunea	Seroprevalența	Referința
Est	5.93% (4/67)	Savuța și colab., 2008
	13.11% (8/61)	Aniță și colab., 2010
	17.14% (12/70)	Aniță și colab., 2014
	12.82% (10/78)	
Sud și sud-est	12.5% (5/40)	Voiculescu și colab., 2010
	13.98% (13/93)	

3.2 Cercetări privind infecția cu VHE la animale

La animale, cercetările au arătat că infecția cu VHE este prezentă la suinele domestice și cele sălbatice din estul României. La suinele domestice, prezența infecției cu VHE a fost pusă în evidență atât prin detectarea anticorpilor IgG-anti VHE, cât și prin cea a ARN-ului viral. Caracterizarea tulpinilor identificate a arătat că acestea aparțin genotipului 3 (VHE-3) [Aniță și colab., 2014]. Ratele de seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE la suinele domestice din estul României variază între 22.66% și 50% (tabelul 3.1) [Savuța și colab., 2007; Aniță și colab., 2008, 2010, 2012].

La mistreți, prezența infecției cu VHE a fost pusă în evidență prin detectarea anticorpilor IgG anti-VHE la animalele din județele Iași, Suceava și Buzău [Aniță și colab., 2009; Aniță, 2010; Botezatu și colab., 2014]. Ratele de seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE la mistreți, raportate în aceste studii variază între 4.44% - 32.05% (tabelul 3.1).

Tabelul 3.2/Table 3.2.

Studii serologice privind infecția cu VHE la suine din județe în estul României

Serological studies on HEV infection in swine in counties of eastern Romania

Județ	Seroprevalența	Referința
SUINE DOMESTICE		
Iași	42,75% (62/145)	Savuța și colab., 2007
	49,27% (34/69)	Aniță și colab., 2008
Botoșani	22,66% (17/75)	Aniță și colab., 2010
Brăila	38,46% (10/26)	Aniță și colab., 2012
Vrancea	50% (45/90)	
MISTREȚI		
Iași	4. 44% (4/90)	Aniță și colab., 2009
Suceava	10% (1/10)	Anță, 2010
Buzău	32.05% (25/79)	Botezatu și colab., 2014

CAPITOLUL IV

STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND HEPEVIRUSURILE CU CARACTER ZOONOTIC ȘI EPIDEMIOLOGIA INFECȚIEI LA OM

CHAPTER IV

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE REGARDING ZOONOTIC HEPEVIRUSES AND THE EPIDEMIOLOGY OF THE INFECTION IN HUMAN POPULATION

Riscul zoonotic al VHE a fost suspionat din anul 1999, ca urmare a identificării și caracterizării acestuia la suinele domestice. Prima dovadă directă, în acest sens, a fost furnizată în anul 2003, în urma unor cazuri de infecție cu VHE la pacienții din Japonia care au consumat carne de vânat de la cerbii Sika [Tei și colab., 2003; Doceul și colab., 2016]. Ulterior, rezultatele studiilor filogenetice ale tulpinilor VHE identificate atât la animale, cât și la om, precum și cele ale studiilor experimentale de transmitere a VHE între speciile receptive, au arătat că VHE poate trece bariera de specie și au sugerat diverse căi de transmitere ale acestui agent patogen.

4.1 Rezervoarele animale și căile de transmitere ale VHE în infecțiile cu caracter zoonotic

Multitudinea de studii realizate, de la prima identificare a VHE la om și până în prezent, sugerează o gamă largă de gazde receptive și diverse căi de transmitere. Dintre acestea, transmiterea VHE de la animale infectate la om poate avea loc ca urmare a contactului direct, a consumului produselor derivate, precum și al alimentelor contaminate de apa cu particule virale excretate de acestea.

Rezervoarele animale ale VHE cu caracter zoonotic

Dintre speciile de animale receptive la infecția cu VHE, doar o parte au fost implicate în infecții zoonotice. Suinele domestice, mistrețul și cerbul sunt singurele specii de animale care au fost direct legate de cazurile de hepatită E zoonotice [Pavio

și colab., 2015]. Acestea au fost confirmate ca urmare a înrudirii genetice dintre secvențele VHE de la pacienți și cele din alimentele consumate de către aceștia. În plus, caracterul zoonotic al VHE de la aceste specii de animale este susținut și de caracterizarea tulpinilor identificate, în cercetările de la nivel mondial, care au arătat că acestea sunt înrudite cu cele de om.

Încadrarea VHE de la iepure în genotipul 3 (VHE-3), dar în subtipul 3ra, și includerea în acest subtip a unei tulpini VHE de la om a dus la suspicionarea acestei specii ca potențial rezervor de VHE [Izopet și colab., 2012; Pavio și colab., 2015]. Încadrarea, recentă, a 5 tulpini VHE izolate de la om în subtipul 3ra subliniază potențialul zoonotic al VHE de la iepure [Abravanel și colab., 2017].

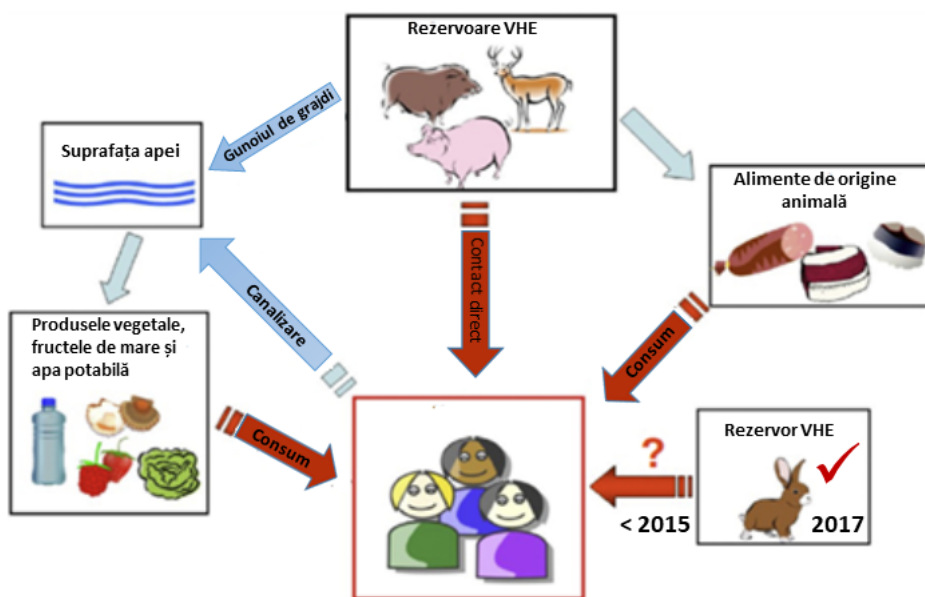


Figura 4.1 Diferite căi de transmitere a VHE cu caracter zoonotic

Figure 4.1 Different routes of transmission of zoonotic HEV

[după Pavio și colab., 2015, cu completări conform descrierilor publicate de Abravanel și colab., 2017]

Consumul produselor derivate de la animalele infectate

Dintre căile de transmitere ale VHE zoonotice, consumul alimentelor derivate de la animalele infectate reprezintă principalul factor de risc pentru sănătatea publică. În unele studii, au fost detectate secvențe VHE identice sau aproape identice la pacienții cu hepatită E și la produsele de origine animală consumate de aceștia: carnea de vânat de mistreți la grătar în Japonia; cârnații cu ficat de porc (figatelli) în Franța și carnea de porc în Spania [Li și colab., 2005; Renou și colab., 2014; Riveiro-Barciela și

colab., 2015]. În alte studii, efectuate în Japonia, Spania, Franța și Australia, cazurile sporadice sau focarele de hepatită E au fost corelate cu consumul cărnii brute sau insuficient preparate termic de la suinele domestice și cele sălbatice, dar fără o dovadă directă că acestea au fost sursa infecției [Doceul și colab., 2016]. Într-un studiu de caz efectuat în Germania, infecția cu VHE a fost asociată cu consumul cărnii și a organelor comestibile de la mistreț [Wichmann și colab., 2008].

Investigații efectuate în lanțurile de producție ale cărnii de porc din Republica Cehă, Spania și Anglia au relevat detecția virusului hepatite E, atât în punctele de procesare, cât și în cele de comercializare [Meng, 2011]. Cele mai multe raportări ale infecției cu VHE ca urmare a consumului de alimente au fost făcute în Japonia. Acestea au fost depistate la aproximativ 14 - 60 de zile de la consumul alimentelor infectate. Într-unul din aceste cazuri nivelul de contaminare al cărnii cu VHE a fost estimat a fi de aproximativ 10^5 copii/g țesut [Tei și colab., 2003]. Cu toate acestea, nu se cunosc date cu privire la doza orală infecțioasă.

Președintele grupului de lucru pentru hepatita E din cadrul Autorității Europene pentru Siguranța Alimentară (EFSA) a declarat că principala sursă de transmitere a VHE în Europa este alimentația.

Consumul alimentelor contaminate prin intermediul apei

Contaminarea surselor de apă de către particulele virale excretate de speciile infectate reprezintă cea mai importantă modalitate de diseminare a acestui agent patogen. Ratele crescute de infecție cu VHE la oameni, în Turcia și în unele țări din Asia de Sud-Est, sunt asociate cu utilizarea apei netratate din râuri în activitățile de zi cu zi [Toole M. și col., 2006; Ceylan A. și col., 2003]. În Olanda, VHE-3 a fost detectat în apa de râu, care probabil provine din apa de canalizare [Rutjes și colab., 2009]. În Slovenia, VHE-3 a fost detectat în apele de suprafață, precum și la 20% din probele de fecale de la suinele din fermele locale [Steyer, 2011]. În Canada, VHE-3 a fost detectat în căpșunile cultivate pe câmp, având o identitate nucleotidică de 99% cu tulpinile VHE identificate la porci locali [Brassard J., 2012].

Apele de coastă pot fi, de asemenea, contaminate cu VHE, iar studiile experimentale au arătat că virusul se poate acumula în țesutul digestiv al crustaceelor [Grodzki și colab., 2014]. Cel mai adesea, fructele de mare sunt consumate crude sau insuficient tratate termic, iar virusul VHE este stabil atât în mediul alcalin cât și acid, rezistă în produsele congelate mai mult de 10 zile și își păstrează capacitatea infectantă până la 70°C. Prezența VHE a fost evidențiată la midii în Galicia, Scoția, Finlanda, Grecia și Spania, la stridii în Coreea, la bivalve în Japonia și la crustacee în China. Consumul crustaceelor a fost cauza unui focar de infecție cu VHE-3 la bordul unei nave de croazieră în Europa [Said și colab 2009; Diez-Valcarce și colab., 2012].

Contactul direct cu animalele infectate

Contactul direct cu animalele infectate al fermierilor și al personalului medical și de îngrijire din fermele de suine s-a dovedit a fi unul din factorii de risc la infecției cu VHE. În SUA, medicii veterinari din fermele de suine au prezentat o seropozitivitate pentru anticorpi anti-VHE (27%) mult mai crescută decât cea înregistrată la donatorii de sânge (16%), supuși testărilor. În Suedia, 13% din crescători de suine s-au dovedit a fi seropozitivi la infecția cu VHE [Meng și colab., 1999; Meng și colab., 2002]. În Republica Moldova, 51% din fermierii de suine au fost pozitivi pentru IgG anti-VHE, în timp ce rata de seropozitivitate la subiecții de control a fost de 25% [Drobeniuc și colab., 2001]. În Olanda, seroprevalența anticorpilor-anti VHE a fost 11% la medicii veterinari din fermele de porci, 6% la cei care nu lucrează cu suinele și 2% la populația generală [Olsen și colab., 2006].

În Franța, contactul frecvent cu un porc, utilizat ca animal de companie, a fost raportat ca fiind, cel mai probabil, modul de transmitere a VHE la un pacient francez cu hepatită E acută [Renou și colab., 2007]. Un caz sporadic de hepatită E acută a fost raportat la un pacient din Japonia, a cărui animal de companie, o pisică, a fost seropozitiv pentru IgG anti-VHE [Kuno și colab., 2003]. Toate aceste cercetări au sugerat că contactul direct cu animalele infectate poate reprezenta un factor de risc pentru sănătatea publică.

4.2 Epidemiologia infecției cu VHE la om în Europa

Progresele recente cu privire la situația epidemiologică a infecției cu VHE la nivel mondial dezvăluie o imagine complexă, modelele epidemiologice din zonele endemice distingându-se clar față de cele din zonele non-endemice [Mirazo și colab., 2014]. Infecțiile cu VHE-1 și VHE-2 au caracter endemic, iar genotipurile zoonotice, VHE-3 și VHE-4, sunt responsabile de apariția cazurilor sporadice și a focarelor în țările dezvoltate. În Europa, alimentația este recunoscută ca principala sursă de transmitere a infecției cu VHE [EFSA, 2017].

În ultimul deceniu, numărul cazurilor autohtone raportate de infecție cu genotipurile 3 și 4 au crescut dramatic, iar prezența animalelor ca surse de infecție a fost argumentată în diferite studii. Mai mult, experții grupului EFSA privind riscurile biologice recomandă statelor membre să crească gradul de conștientizare cu privire la riscurile pentru sănătatea publică asociate consumului alimentelor de origine animală netratate termic [EFSA, 2017]. În Europa, mai mult de 21.000 de cazuri de infecții cu VHE au fost raportate în ultimii 10 ani, cu o creștere totală de 10 ori în această perioadă. Din cele 30 de țări din care au fost colectate aceste date, în 20 de țări hepatita E este o boală notificabilă în cadrul programelor de supraveghere națională, cazurile sunt definite și protocoalele de testare sunt bine stabilite (figura 4.3).

Majoritatea cazurilor (80%) au fost raportate în Franța, Germania și Anglia. Aceste țări dispun de sisteme de supraveghere specifice, monitorizarea infecției cu VHE fiind obligatorie în Germania [ECDC, 2017].

Mai mult de 95% din infecțiile umane au fost autohtone, dobândite local și datorate infecției cu VHE-3, principalele subtipuri fiind 3e, 3f și 3c. Predominanța subtipului VHE-3c și substituirea celor anterior prevalente în unele țări au fost asociate cu importurile cărnii de porc din alte țări Europene. Numărul cazurilor asociate călătoriilor în afara țărilor UE a rămas la un nivel scăzut de-a lungul anilor (1,5%). Prezența infecției cu VHE-4 a fost foarte rar semnalată și doar în Franța, Italia și Germania [EFSA, 2017].

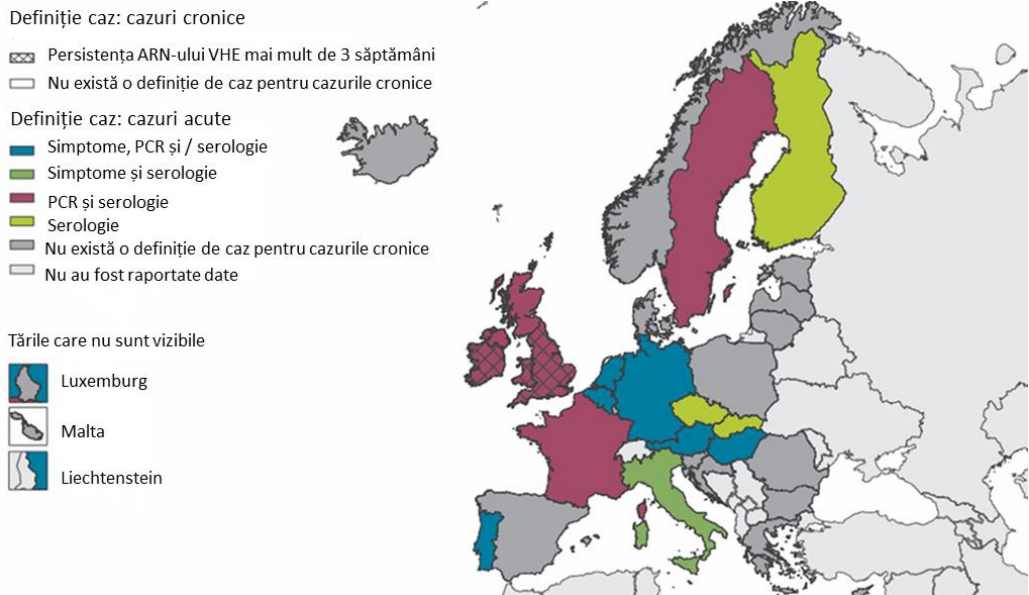


Figura 4.2 Tipul definiției de caz aplicate pentru infecțiile cu VHE în 20 de țări din Uniunea Europeană și Spațiul Economic European, 2015

Figure 4.2 Type of applied case definition for confirmed cases of hepatitis E virus infection in 20 European Union/European Economic Area (EU/EEA) countries, 2015 [Aspinall și colab., 2017]

Studiile serologice arată că prevalența anticorpilor anti-VHE diferă de la o țară la alta și în cadrul aceleiași țări de la un studiu la altul. Țările din centrul Europei au raportat rate crescute de seroprevalență față de țările nordice. Cea mai mare rată de seroprevalență a fost raportată la populația din sudul Franței (86%) și a fost asociată cu consumul tradițional al ficatului brut. Diferența de seroprevalență între și în interiorul țărilor ar putea reflecta diferite expuneri ale populației la virus (în funcție de dinamica epidemiologică a infecției în cadrul rezervoarelor). Variațiile din cadrul strategiilor de eșantionare, populația supusă supravegherii și utilizarea a diferite sisteme de testare

cu sensibilitate și specificitate variate, precum și alți factori, limitează comparabilitatea datelor de seroprevalență în cadrul studiilor [Hartl și colab., 2016].

4.3 Transmiterea experimentală a VHE între speciile receptive

Progresele în studiile de patogenitate au fost mult facilitate de succesul infecției experimentale cu VHE la primatele non-umane, precum și la alte specii de animale cu valoare predictivă în infecția cu VHE. Primatele non-umane (în special cimpanzeii și alte specii de maimuțe) sunt cele mai utilizate animale în studiile privind diferitele aspecte ale infecției cu VHE, mai ales în cele de patogenitate, de evaluare a potențialului zoonotic al diverselor tulpini de VHE și cele de elaborare a unui vaccin. Aceste specii s-au dovedit a fi susceptibile la infecția cu genotipurile VHE 1-4 (figura 4.1). Mai mult, dinamica infecției cu VHE la primatele infectate experimental este similară cu cea de la oameni, cu perioade de incubatie variabile. Cu toate acestea, datorită resurselor limitate, preocupărilor etice și procedurilor experimentale dificile și scumpe, puține date cu privire la patogenitatea VHE au fost acumulate prin utilizarea acestui model experimental [Krawczynski și colab., 2011; Doceul și col., 2016].

Descoperirea primei tulpini a VHE la suine, de către Meng, în 1997, a deschis noi căi de cercetare și modele experimentale. Porcii sunt susceptibili la infecție cu VHE de la om, genotipurilor VHE-3 și VHE-4. Într-un studiu de patogenitate, suinele utilizate ca model experimental pentru infecția cu tulpinile VHE-3 izolate de la om, au prezentat leziuni mult mai severe și persistente decât în cazul infecției cu VHE porcin [Halbur și colab., 2001]. Replicarea extrahepatică a virusului VHE uman a fost, de asemenea, identificată în intestinul subțire, limfonodurile și colonul porcilor infectați experimental [Williams și colab., 2001]. Într-un studiu de infecțiozitate, toți porci inoculați cu tulpina VHE-4 umană (tulpina din Taiwan) au eliminat virusul prin fecale, devenind viremici și apoi seropozitivi IgG anti-VHE [Feagins și colab., 2008]. Cu toate acestea, porcii nu sunt susceptibili la infecția experimentală cu VHE genotipurile strict patogene pentru om, 1 și 2 (figura 1.9) [Doceul și colab., 2016].

Potențialul zoonotic al rozătoarelor în infecția cu VHE, precum și susceptibilitatea acestor specii la infecția cu diverse tulpini VHE, sunt controversate. Inocularea unui grup de iepuri cu genotipurile 1 și 4 umane a avut ca rezultat prezența viremiei, precum și eliminarea virusului prin fecale la 7 din cei 9 iepuri inoculați cu VHE-4 și lipsa acestora la cei inoculați cu VHE-1, deși seroconversia a fost observată la majoritatea iepurilor inoculați [Ma și colab., 2010]. Această specie s-a dovedit a fi susceptibilă la infecția experimentală cu VHE-4 porcin (figura 1.9), iar anticorpi specifici anti-VHE au fost detectați la speciile SPF (specific pathogen free) aflate în același spațiu cu suinele infectate cu acest virus [Johns și colab., 2014; Liu și colab., 2016]. Inocularea șobolanilor Wistar cu o suspensie din fecalele umane cu particule virale VHE-1, a condus la o infecție caracterizată prin viremie, eliminarea virusului prin fecale și modificări histopatologice ale ficatului, splinei și ganglionilor limfatici. Cu toate acestea, în alte cercetări, inocularea VHE-1 și a VHE-2 umane, VHE-3 suin și a VHE-

4 de la mistreț nu a indus infecția la șobolanii Sprague-Dawley și Wistar. Gerbilul mongol s-a dovedit a fi susceptibil la infecția cu VHE-4 suin și VHE-1 uman [Doceul și colab., 2016].

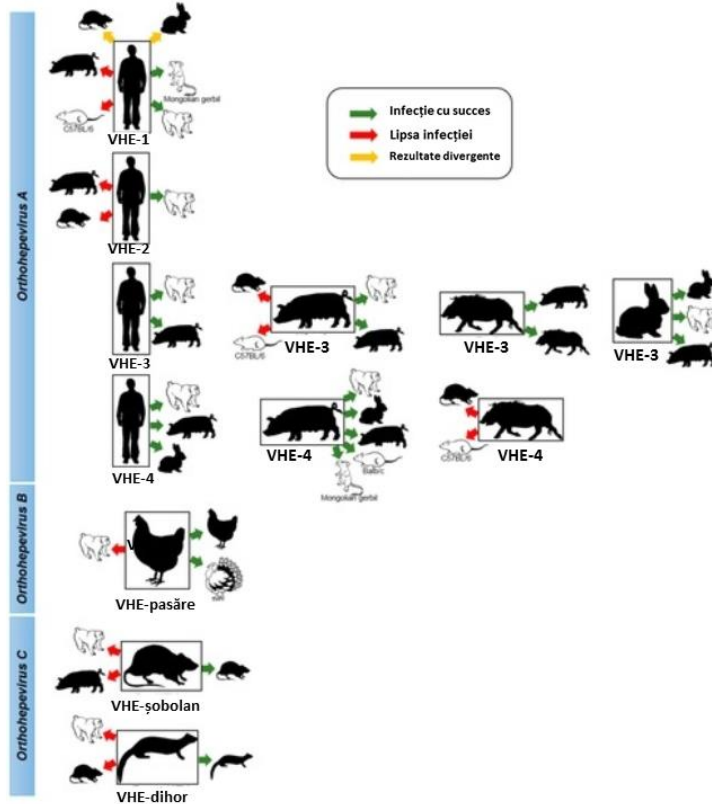


Figura 4.3 Transmiterea experimentală a VHE între speciile receptive

Figure 4.3 Experimental inter-species transmissions of HEV

[după Doceul și colab., 2016].

PARTEA A II-A
CONTRIBUȚII PERSONALE

PART II
PERSONAL CONTRIBUTIONS

CAPITOLUL V

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

CHAPTER V

GOAL AND OBJECTIVES

În ultimii ani, studiile realizate la nivel mondial au arătat că animalele sălbatice au un rol important în infecția cu virusul hepatitei E (VHE). Prima documentare cu privire la caracterul zoonotic al VHE, pe baza dovezilor directe, a fost făcută ca urmare a prezenței infecției la pacienți cu hepatita E care au consumat carne de vânat de cerb contaminată. Studiile ulterioare, bazate, în principal, pe gradul de înrudire genetică dintre tulpinile izolate de la om cu cele izolate de la animale, au arătat că suinele, mistreții și unele specii de cervide sunt importante rezervoare de infecție cu VHE. Studiile recente arată că în plus față de aceste specii, iepurele poate reprezenta un alt rezervor de infecție cu VHE. De asemenea, un potențial rol în transmiterea zoonotică a VHE a fost sugerat pentru șobolani, pe baza gradului de înrudire genetică dintre tulpini izolate de la această specie cu tulpini VHE izolate de la om, dar și de la alte specii de animale.

În România, suinele domestice au fost identificate ca rezervoare de VHE. Infecția cu VHE la om și mistreți a fost documentată în baza dovezilor serologice, într-un număr redus de studii. Pentru a putea evalua caracterul zoonotic al infecției cu VHE în țara noastră, există o necesitate în ceea ce privește identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante la om și animale.

Scopul lucrării, intitulată **“Cercetări epidemiologice și etiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la animalele sălbatice și evaluarea riscului zoonotic al acesteia”**, este de a evalua caracterul zoonotic al tulpinilor VHE circulante în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea datelor epidemiologice și etiologice ale infecției cu VHE în zona de est a țării. În acest sens, obiectivele propuse au constatat în: evidențierea circulației VHE la animale sălbatice din estul României prin evaluarea seroprevalenței anticorpilor specifici anti-VHE la mistreți, identificarea tulpinilor VHE circulante la animalele sălbatice a căror carne poate fi utilizată în cosumul uman, evaluarea rolului șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în aria de studiu, identificarea tulpinilor VHE circulante la populația umană din

estul țării și stabilirea relațiilor filogenetice dintre tulpinile identificate, dintre acestea și cele anterior detectate la suinele domestice din România și alte tulpini VHE din întreaga lume, disponibile în GenBank. Pentru aceasta, au fost realizate succesiv o serie de activități principale, alături de unele cu caracter preliminar sau secundar, destinate atingerii obiectivelor propuse. Aceste activități au uzat de metode serologice, moleculare și de analize bioinformatic.

Activitățile realizate au constat în:

- Detecția anticorpilor IgG anti-VHE în probele de ser recoltate de la mistreți prin utilizarea unui kit comercial.
- Detecția ARN-ului VHE în probele recoltate de la mistreți, cervide și iepuri din zona de studiu. Au fost utilizate metode PCR clasice și în timp real, descrise în literatura de specialitate.
- Detecția ARN-ului VHE în probele recoltate de la șobolani, vulpi și alte specii de animale sălbatice din zona de studiu. Aceste probe au fost supuse analizei prin diverse metode de detecție a VHE, descrise în literatura de specialitate.
- Dezvoltarea a două protocoale PCR pentru detecția VHE de la vulpe și analiza probelor recoltate de la această specie.
- Detecția ARN-ului VHE în probe de fecale colectate de la suine domestice. Această activitate a avut caracter secundar și a urmărit identificarea VHE la animale din fermele în proximitatea cărora au fost capturate rozătoarele sălbatice.
- Testarea serologică a unor grupuri de pacienți din populația umană din estul României. Această activitate a avut caracter preliminar.
- Detecția ARN-ului VHE în probe obținute de la grupurile de pacienți, prin adaptarea unei metode PCR descrisă în literatura de specialitate.
- Caracterizarea tulpinilor VHE identificate și analiza filogenetică a acestora. Aceste activități le-au succedat pe cele de detecție a VHE și au dus la încadrarea tulpinilor izolate și la stabilirea gradului de înrudire cu tulpini disponibile în GenBank.

CAPITOLUL VI

INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU VHE LA MISTREȚI

CHAPTER VI

SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION ON HEPATITIS E INFECTION IN WILD BOARS

Caracterul asimptomatic al infecției cu VHE la animale face ca examenul serologic să fie esențial pentru stabilirea endemicității în efectivele supuse analizei. Pe baza investigațiilor serologice, infecția cu VHE a fost evidențiată la diverse specii de animale, sugerând o gamă largă de gazde receptive la această infecție. Totodată, prezența markerilor serologici la animalele investigate din diferite teritorii a arătat că infecția cu VHE este răspândită la nivel mondial.

Prin utilizarea examenelor serologice a fost semnalată pentru prima dată infecția cu VHE la mistreți, în anul 1999, în Australia. De atunci și până în prezent anchete seroepidemiologice au fost realizate în întreaga lume, cea mai mare seroprevalență a anticorpilor anti - VHE la mistreți fiind înregistrată în Italia (56.2% - 36/64) de către Mazzei și colab., în anul 2015.

În România, rezultatele investigațiilor realizate de către Aniță Adriana în cadrul tezei de doctorat "Cercetări privind hepatita E la suine", în anul 2010, au arătat că infecția cu VHE este prezentă atât la suinele domestice, cât și la cele sălbatice. Investigațiile cu privire la infecția cu VHE la mistreți au constatat în analiza a 110 probe de seruri recoltate de la animale din două județe din estul României, Iași și Vrancea. În urma anchetei serologice a fost înregistrată o seroprevalență a anticorpilor IgG anti VHE de 4.45% (5/110). Ulterior, studiile realizate de Botezatu și colab., în anul 2014, au arătat că infecția cu VHE este prezentă la mistreți din diverse fonduri de vânătoare ale județului Buzău, prin obținerea unei seroprevalențe a anticorpilor IgG anti-VHE de 32.05% (25/79).

Autorii acestor publicații au semnalat necesitatea extinderii investigațiilor privind infecția cu VHE la mistreți atât prin lărgirea ariei de studiu, cât și prin completarea studiilor serologice cu cele de biologie moleculară, caracterizarea virusului fiind esențială pentru stabilirea relațiilor existente între tulpinile virale de la

mistreți cu cele de la alte specii de animale și de la om. Astfel, studiul propus a reprezentat o etapă preliminară în evidențierea circulației VHE la mistreți din județe situate în estul României. Ulterior, aceste studii vor fi completate cu cele de identificare și caracterizare moleculară a tulpinilor VHE circulante atât la mistreți, cât și la alte animale sălbatice din zona de studiu.

6.1 Material și metodă

6.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor

Probele de ser de la 218 mistreți au fost recoltate în perioada sezonelor de vânătoare 2014 și 2015, în șapte județe din estul României: Suceava (n=5), Botoșani (n=1), Iași (n=110), Bacău (n=18), Vrancea (n=16), Buzău (n=30) și Galați (n=38) (figura 6.1). Probele au fost condiționate la - 20°C până la data testării.

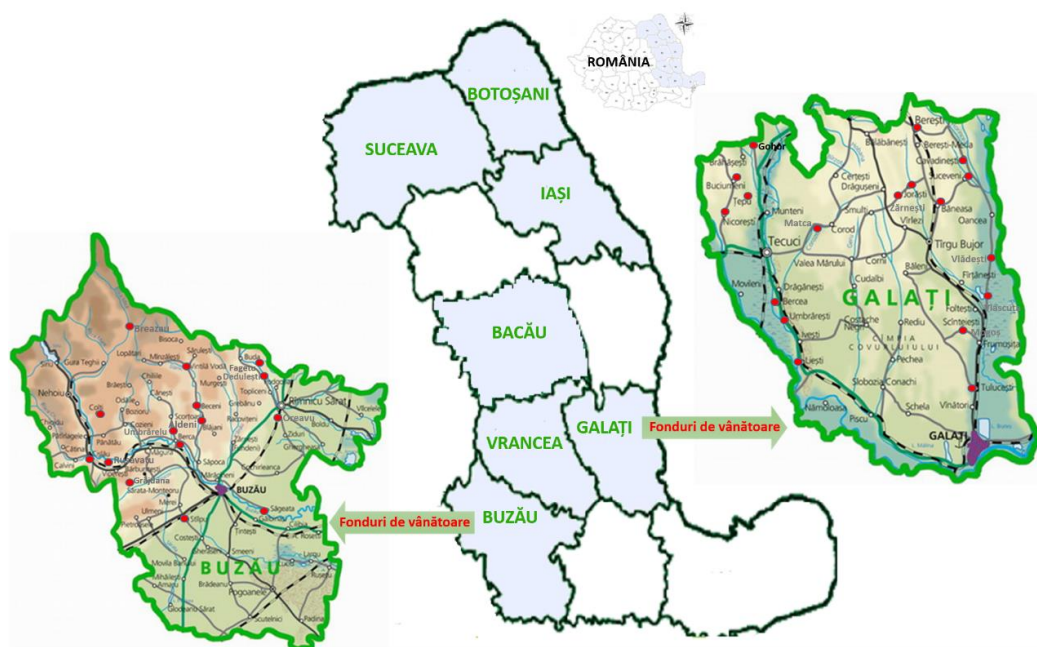


Figura 6.1 Distribuția geografică a județelor și a fondurilor de vânătoare din care au provenit animalele supuse analizei

Figure 6.1 Geographical distribution of counties and hunting funds, from which the analyzed animals originated

Datele cu privire la vârsta animalelor de la care au fost recoltate probele de ser se cunosc pentru mistreții din județul Galați (tabelul 6.1). Distribuția mistreților în fonduri de vânătoare (FV) a fost cunoscută în două județe din cele șapte luate în studiu, respectiv: Galați și Buzău. Punctele de recoltare pentru probele de ser din cele două județe au fost plasate în 33 de fonduri de vânătoare: 18 fonduri de vânătoare în județul Galați și 15 fonduri de vânătoare în județul Buzău (figura 6.1, tabelul 6.1 și tabelul 6.2).

Tabelul 6.1/Table 6.1

Date privind mistreții de la care au fost recoltate probele de ser
din județul Galați
Data regarding wild boars from which the serum samples were harvested,
from Galați County

Nr. și denumirea fondului de vânătoare	Nr. probe/ fond de vânătoare	Nr. probe/categorie de vârstă		
		< 1 an	1 – 2 ani	> 2 ani
FV 19 Țepu	1	-	1	-
FV 21 Buciumeni	3	-	3	-
FV 31 Băneasa	2	-	2	-
FV 29 Cavadinești	1	-	1	-
FV 32 Jorăști	1	-	-	1
FV 33 Zarnești	1	-	1	-
FV 20 Nicorești	1	-	1	-
FV 22 Gohor	1	-	-	1
FV 28 Berești	1	-	1	-
FV 30 Suceveni	5	-	3	2
FV 15 Barcea	4	-	-	4
FV 18 Liești	6	-	5	1
FV 44 Tulucești	6	2	4	-
FV 16 Matca	1	-	1	-
FV 12 Umbrărești	1	-	-	1
FV 37 Vlădești	1	-	1	-
FV 40 Vlascuța	1	-	1	-
FV 39 Mogoș	1	-	1	-
TOTAL	38	2	26	10

Tabelul 6.2/Table 6.2

Numărul de probe recoltate de la mistreți din județul Buzău,
în funcție de fondul de vânătoare
The number of wild boars samples, harvested from Buzău County,
depending on the hunting founds

Nr. și denumire fond de vânătoare	Nr. probe
FV 19 Tăbărăști	1
FV 23 Grăjdana	1
FV 24 Rușavățu	1
FV 26 Umbrărelu	6
FV 27 Berca	4
FV 28 Cislău	1
FV 31 Colți	1
FV 39 Breazau	1
FV 40 Vintilă Vodă	3
FV 41 Beceni	3
FV 42 Aldeni	1
FV 45 Dedulești	1
FV 46 Făgetu	2
FV 54 Săgeata	1
FV 58 Oreavu	3
TOTAL	30

6.1.2 Testarea serologică

Identificarea anticorpilor IgG anti-VHE în probele de ser s-a realizat prin utilizarea metodei ELISA de tip indirectă cu ajutorul kitului comercial: ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța). Acest kit este capabil să detecteze prezența anticorpilor IgG anti-VHE în serul sau plasma oamenilor, suinelor domestice, mistreților și a rumegătoarelor. Faptul că acest kit are la bază o proteină recombinată a capsidei VHE-3, genotip cu capacitate infecțioasă efectivă pentru suine, demonstrează specificitatea și sensibilitatea testului.

Protocolul de lucru s-a realizat conform instrucțiunilor furnizate de producătorul kit-ului. Astfel, soluțiile de control și serurile de testat se diluează în tamponul de diluție Baffer (1:20), iar după depunerea acestora în godeuri, în duplicat, placa se incubează timp de 45 minute la temperatura camerei. După îndepărtarea surplusului de material neatașat, prin spălare, se adaugă conjugatul HRP (anticorpi secundari anti-specii conjugați cu peroxidaza din hrean). Prin legarea conjugatului de anticorpii anti-VHE se formează complexul antigen - anticorp - conjugat HRP. După incubarea plăcii la temperatura de 21°C, timp de 30 de minute și spălarea acesteia se adaugă substratul cromogen (TMB - tetrametilbenzidină) (figura 6.2-I). După 15 minute, reacția este blocată prin adăugarea soluției stop (acid sulfuric) (figura 6.2-II).

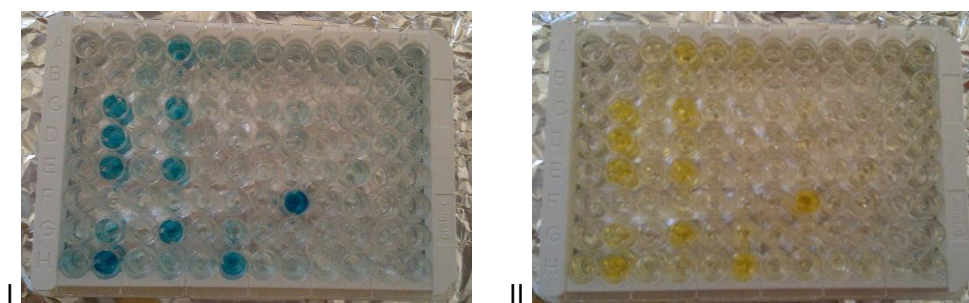


Figura 6.2 Aspecte ale plăcii ELISA din diferite etape de lucru ale testării
(I - după adăugarea substratului cromogen, II – după adăugarea soluției stop)

Figure 6.2 Aspects of the ELISA plate from various stages of testing
(I - after chromogenic substrate addition, II - after stop solution addition)

Citirea rezultatelor s-a realizat prin măsurarea densității optice la o lungime de undă de 450 nm. Conform producătorului, rezultatele sunt interpretate prin calcularea relației procentuale a raportului dintre valorile densității optice a probei (S) și, respectiv, ale controlului pozitiv (P) și se calculează după formula:

$$\frac{S}{P} = \frac{netODs}{ODpc} \times 100,$$

unde: *netODs* reprezintă valoarea netă a densității optice a probei (s), iar *ODpc* valoarea mediei densităților optice a controlului pozitiv (pc);

$OD_{net} = OD_{godeu\ par} - OD_{godeu\ impar}$

Pentru validarea rezultatelor, controlul calitativ al reacției trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- valoarea netă a mediei densităților optice ale controlului pozitiv (*ODpc*) trebuie să fie mai mare decât 0.350 ($Net\ OD_{pc} > 0.350$);
- raportul dintre valorile nete ale mediilor densităților optice a controlului pozitiv și cele ale controlului negativ (*nc*) trebuie să fie mai mare decât trei ($Net\ OD_{pc}/Net\ OD_{nc} > 3$).

Valoarea procentuală a raportului S/P pentru probele pozitive este mai mare sau cel puțin egală cu 70%, iar pentru cele negative mai mică sau cel puțin egală cu 50% (tabelul 6.3).

Tabelul 6.3/Table 6.3

Valorile de referință ale raportului S/P pentru interpretarea rezultatelor
The reference values of the S/P ratio for the results interpretation

Rezultat	Status
$S/P\% \leq 50\%$	Negativ
$60\% < S/P\% < 70\%$	Ambiguu
$S/P\% \geq 70\%$	Pozitiv

6.2 Rezultate și discuții

6.2.1 Rezultate

În acest studiu, probe de ser recoltate de la mistreți din șapte județe, din estul României, au fost supuse examenului serologic ELISA pentru detecția anticorpilor IgG anti - VHE. În urma analizei serologice au fost identificate 26 de probe pozitive din cele 218 analizate. Astfel, a fost identificată o seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE de 11.92% (95% CI, 0.076 – 0.162). Analiza rezultatelor obținute a arătat că anticorpi IgG anti-VHE au fost identificați la mistreți din 5 județe din cele 7 analizate, respectiv: Iași, Bacău, Vrancea, Galați și Buzău (tabelul 6.4).

Tabelul 6.4/Table 6.4

Seroprevalența aparentă a anticorpilor IgG anti-VHE la mistreții analizați
HEV apparent seroprevalence in the analyzed wild boars

Județ	Nr. probe testate	Nr. probe pozitive	Seroprevalență % [95% CI]
Botoșani	1	0	0
Suceava	5	0	0
Iași	110	16	14.54% [7.9 – 21.1]
Bacău	18	2	11.11% [-3.4 – 25.6]
Vrancea	16	1	6.25% [-5.6 – 18.1]
Galați	38	4	10.52% [0.7 – 20.2]
Buzău	30	3	10% [-0.7 – 20.7]
Total	218	26	11.92% [7.6 – 16.2]

Analiza rezultatelor în funcție de categoriile de vârstă ale celor 38 de mistreți din județul Galați, a arătat că anticorpi IgG anti-VHE au fost detectați la cei cu vârsta cuprinsă între unu și doi ani și la cei mai mari de doi ani (tabelul 6.5). Animale pozitive au fost identificate în două din cele 18 fonduri de vânătoare analizate din județul Galați (figura 6.3) și în trei din cele 15 fonduri de vânătoare analizate din județul Buzău (figura 6.4).

Tabelul 6.5/Table 6.5

Seroprevalența anticorpilor IgG anti-VHE la mistreții analizați din județul Galați, în funcție de categoria de vârstă
Seroprevalence of IgG anti-HEV antibodies in tested wild boars, in Galati County, by age category

Categoria de vârstă	Nr. animale testate	Nr. animale pozitive	Seroprevalență % [95% CI]
< 1 an	2	0	0%
1-2 ani	26	1	3.84% [-3.5 – 11.2]
> 2 ani	10	3	30% [15.9 – 58.4]

6.2.2 Discuții

Hepatita E este o boală cu caracter zoonotic, după suinele domestice, mistreții fiind importante rezervoare de VHE. În România, studiile anterioare au arătat că VHE circulă în populațiile de mistreți din estul țării, pe baza identificării anticorpilor IgG anti-VHE la animale din trei județe: Suceava, Iași și Buzău (tabelul 3.1). În acest studiu, au fost întreprinse investigații serologice la mistreți din șapte județe, din estul României: Suceava, Botoșani, Iași, Bacău, Vrancea, Galați și Buzău. Identificarea anticorpilor anti-VHE la mistreți din cinci județe, din cele șapte analizate, s-ar putea datora distribuției neuniforme a numărului de probe în fiecare județ. Mai mult, detecția anticorpilor anti-VHE la mistreți din Iași și Buzău, anterior identificate pozitiv de către Aniță și colab., 2009 și Botezatu și colab., 2014, sugerează persistența infecției cu VHE în populațiile de mistreți din estul României. Această ipoteză este consolidată și de detecția anticorpilor anti-VHE la mistreți din aceleași fonduri de vânatoare ale județului Buzău (FV Vintilă Vodă și FV Berca). Totodată, semnalarea infecției cu VHE în alte județe și fonduri de vânatoare (figura 6.3, figura 6.4) arată o distribuție largă a infecției cu VHE în aria analizată.

Seroprevalența anticorpilor IgG anti-VHE raportă în studiile anterioare variază de la 4.44% (Iași) la 32.05% (Buzău) [Aniță și colab., 2009; Botezatu și colab., 2014]. (tabelul 3.1). În acest studiu, ratele de seroprevalență raportate pentru aceste două județe au fost 14.54% și, respectiv, 10%, iar cea globală de 11.92% (tabelul 6.4). Ratele diferite de seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE raportate în aceste studii se pot datora tehnicilor diferite de diagnostic, a factorilor în legătură cu caracteristicile biologice și ecologice ale populațiilor de mistreți și a celor legați de răspândirea virusului în perioadele analizate. Aceste observații sunt similare cu cele făcute de Larska și colab., 2015, și Weiner și colab., 2016, pentru ratele diferite de seroprevalență obținute în cadrul celor două studii realizate la mistreți din Polonia. Ratele de seroprevalență a anticorpilor anti - VHE înregistrate la mistreții din Polonia sunt mai mari decât cea semnalată în studiul nostru. De asemenea, prevalența înregistrată în studiul de față este mai mică decât cele raportate în alte țări europene: Franța (14%), Germania (14%), Suedia (26,3%) și Spania (42,7%) [de Deus și colab., 2008; Carpentier și colab., 2012; Adlhoch și colab., 2009]. În general, ratele de seroprevalență a anticorpilor anti-VHE la mistreți, raportate în diversele studii realizate în Europa, sunt crescute, sugerând o circulație activă a VHE în cadrul efectivelor analizate.

Analiza rezultatelor în funcție de categoria de vârstă (cunoscută doar pentru animalele din județul Galați) semnalează prezența infecției cu VHE la mistreții cu vârsta cuprinsă între 1 și 2 ani și la cei mai mari de 2 ani. Spre deosebire de porcii domestici, la care literatura de specialitate descrie o prevalență crescută a infecției cu VHE la animale cu vârsta cuprinsă între două și patru luni, la mistreți aceasta a fost raportată atât la tineret, cât și la populația adultă. Aceste rezultate au dus la formularea unor ipoteze cu privire la infecția cu VHE la mistreți, precum cronicizarea infecției și eventual

asocierea acesteia cu o imunitate incompletă [Martelli și colab., 2008; Rutjes și colab., 2010].

6.3 Concluzii parțiale

- În acest studiu au fost întreprinse cercetări cu privire la detecția anticorpilor IgG anti-VHE la **mistreți** din județele din estul României, rezultatele obținute semnalând **prezența infecției** prin seroprevalența detectată (11.92%).
- Coroborarea rezultatelor noastre cu cele obținute în studii anterioare, atrage atenția asupra caracterului persistent și, totodată, a **tendinței de propagare** a infecției cu VHE la populația de **mistreți** din estul României.
- Semnalarea infecției cu VHE la populația de mistreți analizată, prin detecția anticorpilor IgG anti-VHE, reprezintă **premise studiilor ulterioare** de identificare și de caracterizare a tulpinilor VHE circulante.

CAPITOLUL VII

DETECȚIA MOLECULARĂ A VIRUSULUI HEPATITEI E LA MISTREȚI, CERVIDE ȘI IEPURI SĂLBATICI

CHAPTER VII

MOLECULAR DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS IN WILD BOAR, CERVIDS AND WILD RABBIT

Cercetările privind identificarea VHE la animalele sălbatice au contribuit la elucidarea caracterului zoonotic al virusului. Prima dovadă directă în acest sens fiind făcută pe baza identificării VHE la pacienți care au consumat carne de vânat contaminată, de la cerbi Sika, în Japonia [Tei și colab., 2003, Doceul și colab., 2016]. Studiile ulterioare au arătat că mistreții și cervidele sunt importante surse de hepevirusuri zoonotice. Rezultatele studiul publicat în anul curent de către Abravanel și colab., 2017, au arătat că iepurele poate constitui o sursă de infecție cu VHE pentru om, pe baza încadrării a cinci tupini VHE izolate de la om din Franța în suptipul 3ra, specific pentru tulpinile VHE de la iepure.

Încadrarea taxonomică a VHE de la porc, mistreț, cervid, iepure și mangustă în specia *Ortohepevirus A*, împreună cu VHE de la om a avut ca fundament similitudinile ridicate dintre secvențele nucleotidice existente în banca de gene internațională (GenBank). Cu toate acestea, heterogenitatea genetică dintre diversele tulpini de VHE încadrate în specia *Ortohepevirus A*, a dus la repartizarea VHE în diferite subtipuri în cadrul genotipurilor. În cadrul genotipului 3 (cel mai frecvent genotip identificat în Europa), tulpinile VHE izolate de la om și animale, cu excepția celor izolate de la iepure, au fost încadrate în 10 subtipuri și în două clade principale: 3abchij (subtipurile 3a, 3b, 3c, 3h, 3i și 3j) și 3efg (subtipuri 3e, 3f și 3g). Subtipul 3ra a fost desemnat provizoriu pentru a include tulpinile VHE izolate de la iepuri și o tulpină VHE izolată dintr-un caz uman de hepatită E. Cu toate acestea, pentru asignarea izolatelor VHE de la iepure în subtipul 3ra este necesară caracterizarea întregului genom a VHE de la această specie [Smith și colab., 2016; Doceul și colab., 2016].

Deteția VHE a fost semnalată la animalele sălbatice din diferite țări din Europa. La mistreți, ratele de dectecție a VHE raportate de diverși autori variază între 1.5 % [Di Profio și colab., 2016] și 68.2% [Adlhoch și colab., 2009]. Studiile cu privire la infecția

cu VHE la cervide au evidențiat rate scăzute de detecție a virusului comparativ cu cele raportate la mistreți (1.9% - 34%) [Reuter și colab., 2009; Neumann și colab., 2016]. În literatura de specialitate este publicat un număr redus de studii cu privire la identificarea VHE la iepurele sălbatic, iar ratele de detecție a ARN-ului VHE variază între 5% și 60% [Izopet și colab., 2012; Lhomme și colab., 2015b; Burt și colab., 2016; Hammerschmidt și colab., 2017].

Caracterizarea tulpinilor VHE obținute de la aceste animale sălbatice, în Europa, a arătat că acestea aparțin genotipului 3, genotipul 4 fiind identificat doar la suinele domestice și la om. Studiile efectuate au raportat diferite subtipuri de virus în populațiile de mistreți VHE pozitive. Tulpinile VHE izolate de la cerbul comun din Italia, de către Di Bartolo și colab., 2016, au fost încadrate în subtipul 3e, iar cele de la cerbul comun și căprior din Germania, izolate de către Anheyer-Behmenburg și colab., 2017, în subtipurile 3c și 3i. Tulpinile VHE izolate de la iepure au fost încadrate în genotipul 3ra, specific pentru această specie, dar și în subtipul 3g al VHE-3 [Hammerschmidt și colab., 2017].

În România, datele cu privire la infecția cu VHE atât la oameni, cât și la animale sunt prezentate într-un număr redus de studii. Datele disponibile cu privire la infecția cu VHE la om și suinele domestice din aceeași regiune au sugerat potențialul zoonotic al tulpinilor identificate la suine prin încadrarea acestora în genotipul 3 (VHE-3) și prin seroprevalența crescută a anticorpilor IgG anti-VHE înregistrată la om [Aniță și colab., 2014].

Scopul studiului nostru a fost să identificăm și să caracterizăm tulpinile VHE circulante la mistreți, dar și la cervide și iepurii sălbatici din estul României, pentru a evalua potențialul zoonotic al acestora.

7.1 Material și metodă

7.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor

În perioada sezoanelor de vânătoare 2013-2015, specifice fiecărei specii, au fost recoltate 50 de probe de țesut (ficat: n=45 și splină: n=5) de la mistreți, 16 probe de ficat de la cervide (*Capreolus capreolus* și *Cervus elaphus*) și 12 probe de ficat de la iepuri sălbatici. Date cu privire la distribuția numărului de probe în fiecare județ, în funcție de specia analizată sunt expuse în tabelul 7.1. Șase din cele șapte județe anchetate anterior pentru detecția anticorpilor IgG anti-VHE la mistreți au fost incluse în acest studiu. În plus, față de acestea, județul Covasna a fost inclus în analiză prin integrarea în studiu a unei probe de ficat recoltate de la un iepure (figura 7.1).

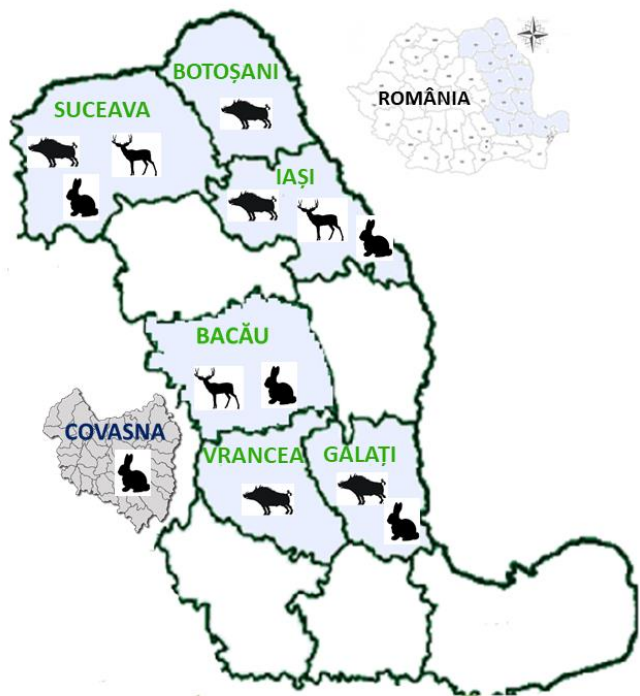


Figura 7.1 Distribuția geografică a județelor incluse în studiu, cu reprezentarea speciilor analizate

Figure 7.1 Geographical distribution of the counties included in the study, with the representation of the analyzed species

Tabelul 7.1/Table 7.1

Distribuția animalelor testate din fiecare județ, în funcție de specia analizată
Distribution of tested animals in each county, by analysed species

Județ	Numărul animalelor din fiecare specie luată în studiu		
			
Suceava	30	9	1
Botoșani	1	-	-
Iași	10	4	4
Bacău	-	3	4
Vrancea	8	-	-
Galați	1	-	2
Covasna	-	-	1
Total	50	16	12

Datele cu privire la distribuția tipurilor de țesut analizate și vârsta mistreților de la care au fost recoltate acestea sunt prezentate în tabelul 7.2. Nu se cunosc datele cu privire la vârsta cervidelor și a iepurilor de la care au fost recoltate probele de ficat. De asemenea, nu se cunosc datele cu privire la distribuția numărului de animale în cele două specii de cervide analizate: *C. capreolus* și *C. elaphus*.

Tabelul 7.2/Table 7.2

Date cu privire la probele recoltate de la mistreți
Data regarding the samples collected from wild boars

Județ	Țesut		Categoria de vârstă			
	Tipul de țesut	Nr. probe	< 1 an	1-2 ani	> 2 ani	Ni
Suceava	ficat	30	1	11	15	3
Botoșani	ficat	1	-	-	1	-
Iași	ficat	10	1	-	-	9
Galați	ficat	1	-	-	-	1
Vrancea	ficat	3	2	-	1	-
	splină	5	-	-	5	-
Total		50	4	11	22	13

*Ni – neidentificat

7.1.2 Extracția acidului nucleic (ARN)

Extracția acidului nucleic (ARN) s-a efectuat cu ajutorul kitului comercial Handbook QIAGEN (referință 52906), conform protocolului de lucru elaborat de Aurélie Lunazzi, verificat și aprobat de Nicole Pavio (UMR 1161 Virologie – Anses LSA, INRA, ENVA). În efectuarea protocolului de extracție, mai întâi, se prepară soluția de liză, prin adăugarea la fiecare 1 ml tampon RLT a 10 μ l β – Mercaptoetanol. Ulterior, în tuburile Lysing Matrix D precântărite se distribuie un fragment de țesut de aproximativ 30 mg pentru fiecare probă de analizat și 600 μ l soluție de liză.

Triturarea probelor s-a realizat cu ajutorul aparatului FastPrep 24, versiunea 3.0. (MP Biomedicals) prin utilizarea programului 1 înregistrat în baza de date, ce constă în 4 etape de omogenizare a câte 40 de secunde fiecare, separate de perioade de incubare la gheață a câte 5 minute. După triturare, pentru obținerea soluției de lucru (supernatant), tuburile cu probele de analizat se centrifughează la viteză maximă (14000rpm) timp de 3 minute.

Pentru precipitarea ARN-ului, 600 μ l din supernatantul obținut se transferă într-un tub de 2 ml peste care se adaugă 600 μ l etanol 50%. Din amestecul format se iau câte 650 μ l soluție și se depun în coloanele RNeasy din tuburile de colectare furnizate de producătorul kit-ului. Tuburile se centrifughează timp de 30 de secunde la 10000rpm. Acest pas se realizează până la epuizarea amestecului, iar supernatantul din tubul colector se elimină după fiecare centrifugare.

Spălarea membranei de siliciu se face prin efectuarea a trei cicluri succesive cu două tampoane de spălare: RW1 și RPE. Centrifugarea tuburilor după primele două

spălări se face conform aceluiași parametri utilizați anterior, iar după ultima spălare aceasta se face la 10000rpm timp de 2 minute. Pentru eliminarea eventualelor reziduuri de reagenți de pe membrana de siliciu se transferă coloana RNeasy într-un nou tub colector și se centrifughează la viteză maximă timp de 1 minut.

Pentru eliberarea ARN-ului de pe membrana de siliciu (eluție) se plasează coloana RNeasy într-un tub Eppendorf de 1.5 ml, după care se depun 40 μ l apă fără nucleaze (RNase free water) direct pe membrană și se centrifughează timp de un minut la 10000rpm. Această etapă se repetă, iar la final se face o alicotă de 20 μ l ARN.

7.1.3 Probele de control utilizate pentru validarea reacțiilor

Au fost luate măsuri de precauție pentru a preveni rezultatele false-pozitive și false-negative ale amplificărilor RT-PCR. Pe lângă separarea spațială a zonelor de lucru în punctele experimentale cruciale (ex: extracția ARN, prepararea mixului PCR), fiecare experiment a inclus mai multe probe de control: probe pozitive (1323, 133) și probe negative (131) pentru extracția ARN; martor negativ și pozitiv pentru fiecare etapă de amplificare: TaqMan - RT-PCR și RT-nested PCR.

7.1.4 Revers transcripție - PCR în timp real (TaqMan - RT-PCR)

Detecția cantitativă a ARN-ului VHE în probele luate în studiu s-a realizat prin amplificarea unui fragment de 70nt a celui de-al treilea cadru deschis de citire (ORF3), conform protocolului de lucru redactat de Ambre Gerent (UMR 1161 Virologie – Anses LSAn, INRA, ENVA), adaptat după metoda descrisă de Jothikumar și colab., 2006 și Barnaud și colab., 2012. Această analiză vizează o regiune înalt conservată din ORF-3 a genomului VHE din diferite genotipuri.

În acest sens, au fost utilizați următorii reactivi:

- mixul de reacție Kit QuantiTEC Probe RT-PCR (200) (Qiagen, 204443);
- amorse (Eurofins MWG): - JVHEV-R (5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'),
- JVHEV-F (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3');
- sonda TaqMan (Life Technologies): FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB;
- ARNt (ARN de transfer) (Sigma, R8508);
- plasmidul pcDNA3.1 ORF 2-3 VHE3f.

Pentru generarea curbei standard, diluțiile seriate de factor 10 ale probei standard (5 - 0,5•10¹²copii/ μ l) au fost efectuate în soluția de ARNt cu o concentrație de 30 μ g/mL. Amplificarea probelor de analizat și a probelor standard (5 - 0,5•10⁶copii/ μ l) s-a realizat, în duplicat, într-un volum final de reacție de 20 μ l. Datele cu privire la cantitatea și concentrația reactivilor utilizați, precum și a programului de amplificare sunt prezentate în tabelul 7.3. Cuantificarea ARN VHE prin tehnica real time PCR s-a realizat cu ajutorul sistemului Light Cycler 480 Software 3.5 (Roche, 03604012001).

Tabelul 7.3/Table 7.3

TaqMan - RT-PCR: reactivi și program de amplificare

TaqMan - RT-PCR: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR în timp real			
- <u>2 μl ARN/proba standard</u>	Etapa	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
- 10 μ l Tampon Qiagen 10x	Revers-transcripție	50°C	20'	1
- 5.86 μ l H ₂ O	Denaturare	95°C	15'	1
- 1.25 μ l TaqMan (5 μ M)	Amplificare	95°C	10"	45
- 0.5 μ l JV HEV R (10 μ M)		58°C	45"	
- 0.19 μ l JV HEV F (10 μ M)	Răcire	40°C	30"	
- 0.2 μ l RT mix Enzyme				

Rezultatele amplificării prin PCR în timp real se obțin la sfârșitul reacției după poziționarea pragului limită de detecție și calcularea automată de către software a valorilor Ct (threshold cycle – ciclul prag). Curba standard este generată pe baza amplificării seriei de diluții 5 - 0,5•10⁶copii/ μ l a probei standard (pcDNA3.1 ORF 2-3 VHE3f). Aceasta redă relația dintre valorile Ct și logaritmul numărului de copii ale probei standard. Cu cât valoarea Ct este mai mare, cu atât titrul ARN VHE este mai mic. Astfel, au fost considerate ca fiind pozitive probele cu valori Ct încadrate între limitele curbei standard. Rezultatele au fost exprimate în număr de copii genomice pe gram de țesut (GE/g)

7.1.5 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică

7.1.5.1 Revers transcripție - nested PCR (RT - nested PCR)

Probele pozitive ARN VHE prin RT-PCR în timp real au fost subiectul analizei RT-nested PCR, cu scopul final de a caracteriza și a analiza filogenetic tulpinile VHE circulante. Această analiză a vizat amplificarea unei regiuni înalt conservate a ORF2 de 348 nt, utilizând două seturi de primeri degenerați [Cooper și colab., 2005] (tabelul 7.4). Toate oligonucleotidele au fost achiziționate de la MWG Biotech AG (Eurofins MWG, Ebersberg, Germania).

Analiza a fost adaptată după metoda descrisă de Cooper și colab., 2005 și realizată așa cum este descrisă de Bouquet și colab., 2011. Amplificarea ARN-ului viral VHE s-a realizat prin utilizarea termociclorului – GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Tabelul 7.4/Table 7.4

Primerii utilizați pentru amplificarea regiunii de interes prin RT- nested PCR

Primers used to amplify the region of interest by RT-nested PCR

[Cooper și colab., 2005]

Reacția	Denumire primer	Secvența	Poziția	Lungime (nt)
PCR 1	3156N	5'-AATTATGCC(T)C AGTAC(T)CGG(A)GTTG-3'	5711 5732	730
	3157N	5'-CCCTTA(G)TCC (T)TGCTGA(C)GCATTCTC-3'	6419 6441	
	3158N	5'-GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA (T)CATGGCT-3'	5996 6017	
PCR 2	3159N	5'-AGCCGACGAAATCAATTCT GTC-3'	6322 6343	348

Revers-transcripția

Pentru transcripția ARN-ului viral în ADNc, într-o primă etapă, produșii de extracție (ARN total) au fost supuși procesului de denaturare în prezența unui primer aleatoriu – random hexamer. Ulterior, pentru sinteza ADNc, complexul nou format (ARN/primer) a fost supus unor cicluri succesive de temperaturi în prezența inhibitorilor de RN-aze (Lifetechnologies, Villebon-sur-Yvette, Franța), a deoxinucleotidelor (Ozyme, St.-Quentin-en-Yvelines, Franța) și a reverstranscriptazei PrimeSript Reverse Trans TaKaRa (Ozyme, St.-Quentin-en-Yvelines, Franța). Acestea au fost efectuate în 12 µl volum final/reacție conform datelor descrise în tabelul 7.5.

Tabelul 7.5/Table 7.5

Revers-transcripția: reactivi și program de amplificare

Reverse-transcription: reagents and amplification program

Etapile de lucru	Reactivi/reacție	Programul termic RT			
		Etapă	Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
Denaturare ARN	- 5 µl ARN total - 2.5 µl random hexamer	Denaturare	70°C	5'	1
		Final	4°C	∞	
Sinteza ANDc	- 7.5 µl ARN/primer - 2.4 µl Tampon 5x (+MgCl ₂) - 1.2 µl dNTP mix (1 mM) - 0.3 µl RN-aze inhibitor 12U - 0.6 µl RT Takara 60U	Hibridizare	25°C	5'	1
		Sintează	42°C	60'	1
		Inactivarea RT	70°C	15'	1
		Final	4°C	∞	

PCR-1

Prima reacție PCR a fost efectuată prin utilizarea primului set de primeri degenerați (externi) prezentați anterior în tabelul 7.4, respectiv 3156N și 3157N. Reacțiile au fost efectuate în 25 µl volum final/reacție, utilizând kitul Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, Franța), conform datelor descrise în tabelul 7.6.

Tabelul 7.6/Table7.6

PCR - 1: reactivi și program de amplificare
 PCR - 1: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
- 2μl ADNc - 18.05 μl H ₂ O qsp - 2.5 μl Tp10X Taq Platinum - 0.75 μl MgCl ₂ (50 mM) - 0.5 μl dNTP (10 mM) - 0.5 μl 3156N (10 μM) - 0.5 μl 3157N (10 μM) - 0.2μl Taq Platinum 1U	Denaturare	94°C	1'	1
	Denaturare	94°C	30"	30
	Hibridizare	52°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Denaturare	94°C	30"	10
	Hibridizare	40°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Elongație	72°C	10'	1
	Final	4°C	∞	

PCR-2

A doua reacție PCR a fost efectuată cu cel de al 2-lea set de primeri degenerați (interni): 3158N și 3159N. Reacțiile au fost efectuate în 50 μl volum final/reacție, conform datelor specificate în tabelul 7.7.

Tabelul 7.7/Table 7.7

PCR - 2: reactivi și program de amplificare
 PCR - 2: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
- 5 μl produs PCR -1 - 35.3 μl H ₂ O qsp - 5 μl Tp10 X Taq Platinum - 1.5 μl MgCl ₂ (50 mM) - 1μl dNTP (10 mM) - 1μl 3158N (10 μM) - 1μl 3157N (10 μM) - 0.2μl Taq Platinum 1U	Denaturare	94°C	1'	1
	Denaturare	94°C	30"	35
	Hibridizare	52°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Elongație	72°C	10'	1
	Final	4°C	∞	

Analiza produșilor de amplificare prin electroforeză în gel de agaroză

Analiza produșilor de amplificare s-a realizat prin utilizarea gelului de agaroză 1% (1 g agaroză: 100 ml soluție TAE 1X). Pentru cuantificarea taliei produșilor PCR s-a utilizat marker-ul de masa moleculară (Mt) - DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche, 11721933001). Migrarea s-a realizat la voltaj constant de 90V, timp de 90 minute. După migrare, gelul de agaroză a fost introdus într-o baie de BET (bromură de etidiu) 1/10000, timp de 15 - 20 minute pe o platformă agitatoare. Vizualizarea produșilor de amplificare s-a realizat cu ajutorul transiluminatorului ChemiDoc XRS (BioRad) în lumină ultravioletă și a fost succedată de fotografierea gelului.

7.1.5.2 Secvențierea nucleotidelor

Secvențierea ampliconilor pozitivi a fost realizată de către MWG Biotech AG (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany) prin utilizarea metodei enzimatice Sanger, care are la bază tehnica de electroforeză capilară de înaltă rezoluție. Secvențierea s-a realizat într-un singur sens cu primerul intern 3158N (sens) (tabelul 7.4).

7.1.5.3 Analiza bioinformatică a secvențelor de nucleotide

Secvențele nucleotidice obținute au fost analizate și editate individual utilizând software-ul BIOEDIT. După editare, secvențele au fost analizate bioinformatic în server-ul BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de pe portalul NCBI (National Center for Biotechnology Information). Pentru calcularea procentajului de similitudine nucleotidică între secvențele obținute s-a utilizat software-ul Geneious R10.

7.1.5.4 Înregistrarea secvențelor de nucleotide în GenBank

Depunerea secvențelor în GenBank s-a realizat utilizând opțiunea BankIt de pe portalul NCBI. Înainte de depunere, secvențele de nucleotide au fost traduse în secvențe proteice. Pentru fiecare depunere au fost incluse datele de identificare ale secvenței: sursa și originea izolatului, țara de proveniență, anul obținerii probei etc.

7.1.5.5 Analiza filogenetică

Secvențele editate au fost aliniate cu secvențele omoloage și cu cele de referință pentru fiecare subtip [Smith și colab., 2016], disponibile în baza de date GenBank. Ca „outgrup” a fost utilizat izolatul uman HUN – E117 din Ungaria, încadrat în HEV-1. Alinierea secvențelor a fost realizată prin utilizarea metodei Muscle. Arborele filogenetic a fost generat cu ajutorul programului MEGA 7 [Kumar și colab., 2016] prin utilizarea metodei Neighbor-Joining („cel mai apropiat vecin”) [Saitou și Nei, 1987] și a modelului matematic de estimare a substituțiilor nucleotidice - distanța p (proporția de aminoacizi prin care două secvențe proteice diferă) [Nei și Kumar, 2000]. Analiza „bootstrap” (testarea fiabilității ramurilor interne) a implicat 1000 de replicări.

7.2 Rezultate

7.2.1 Detecția cantitativă a ARN-ului VHE în probele analizate

În total, 78 de probe provenind de la mistreți, cervide și iepuri sălbatici (tabelul 7.1) din șase județe din estul României, dar și din județul Covasna (centrul României) (figura 7.1) au fost analizate prin metoda TaqMan - RT-PCR pentru detecția ARN-ului VHE. Din analiza rezultatelor obținute, după amplificarea unui segment al regiunii

ORF3 a VHE, au fost considerați pozitivi produși PCR cu valori ale Ct cuprinse între 19.82 – 39.40. Astfel, nouă probe s-au dovedit a fi pozitive, acestea provenind de la mistreți. Încărcătura virală a fost cuprinsă între 7.8×10^3 și 3.14×10^9 GE/g țesut. ARN-ul VHE a fost identificat în șapte din cele 45 de probe de ficat și în două din cele cinci probe de splină analizate. Datele obținute au arătat că în cele două probe de splină pozitive cu valori Ct de 33.91 și 30.15 numărul de copii genomice pe gram de țesut a fost 1.71×10^5 GE/g și, respectiv, 2.19×10^6 GE/g (tabelul 7.8).

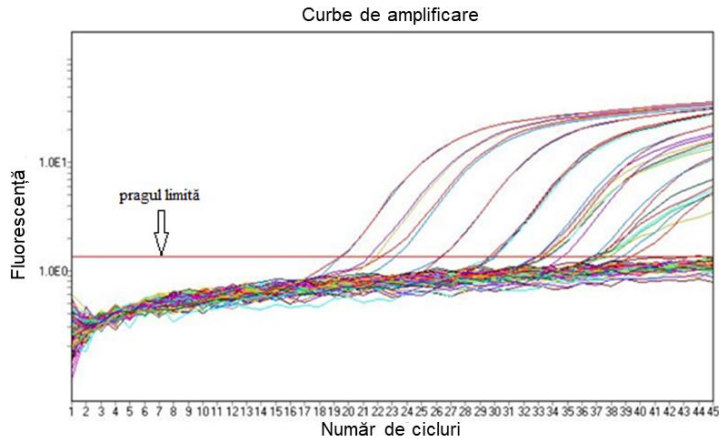


Figura 7.2 Reprezentarea grafică a curbelor de amplificare TaqMan - RT-PCR

Figure 7.2 TaqMan - RT-PCR amplification curves

Tabelul 7.8/Table 7.8

Identificarea probelor pozitive ARN-VHE și rezultatele specifice acestora

Identification of positive RNA-HEV samples and their specific results

Țesut	Identificare probă pozitivă (ID)	Valoare Ct	Încărcătura virală GE/g țesut
Ficat	m8	33.7	1.75×10^5
	m9	39.05	7.80×10^3
	m10	22.28	3.14×10^9
	m20	25.83	2.78×10^8
	m21	23.17	1.37×10^9
	M17	33.22	2.02×10^5
	M18	34.26	1.73×10^5
Splină	M2	33.91	1.71×10^5
	M3	30.15	2.19×10^6

Mistreți pozitivi pentru VHE au provenit din două județe: Vrancea și Suceava, care sunt situate la polurile opuse în aria de studiu – estul României (figura 7.1). Prevalența globală a VHE la mistreții analizați a fost 18%, iar cea pentru fiecare județ identificat pozitiv 25% (2/8) și, respectiv, 23.33% (7/30). ARN-ul VHE a fost detectat la mistreții din categoria de vârstă 1-2 ani (2/11 – 18.18%) și la cei din categoria > 2 ani (7/22 – 31.81%) (tabelul 7.9).

Tabelul 7.9/Table 7.9

Date despre probele testate și prevalența obținută
Data on the tested samples and obtained prevalence of HEV infection

Județ	Țesut		Categoria de vârstă								
			1 - 2 ani		> 2 ani		Ni				
			NpT	NpP	NpT	NpP					
Vrancea	Tipul de țesut	NpT	NpP	NpT	NpP	NpT	NpP	NpT	NpP		
	Splină	5	2	-	-	-	-	5	2	-	-
	Ficat	3	0	2	0	-	-	1	0	-	-
Suceava	Ficat	30	7	1	0	11	2	15	5	3	1
		10	0	1	0	-	-	-	-	9	0
		1	0	-	-	-	-	1	0	-	-
Botoșani		1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	0	-	-	-	-	-	-	1	0
Galați		50	9 (18%)	4	0	11	2 (18.18%)	22	7 (31.81%)	13	1

*Ni - neidentificat;

* NpT - număr probe testate;

* NpP - număr probe pozitive.

7.2.2 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică

7.2.2.1 Detecția ARN-ului VHE prin RT-nested PCR

Probele pozitive prin TaqMan - RT-PCR au fost testate prin metoda RT-nested PCR, amplificând un fragment de 348 nt al ORF2. În urma acestei reacții au fost identificați cinci produși RT-nested PCR pozitivi (M3, m10, m20, m21, M17) (figura 7.3.). Aceștia au fost obținuți pentru una din cele două probe de splină VHE pozitive și pentru patru din cele șapte probe de ficat VHE pozitive.

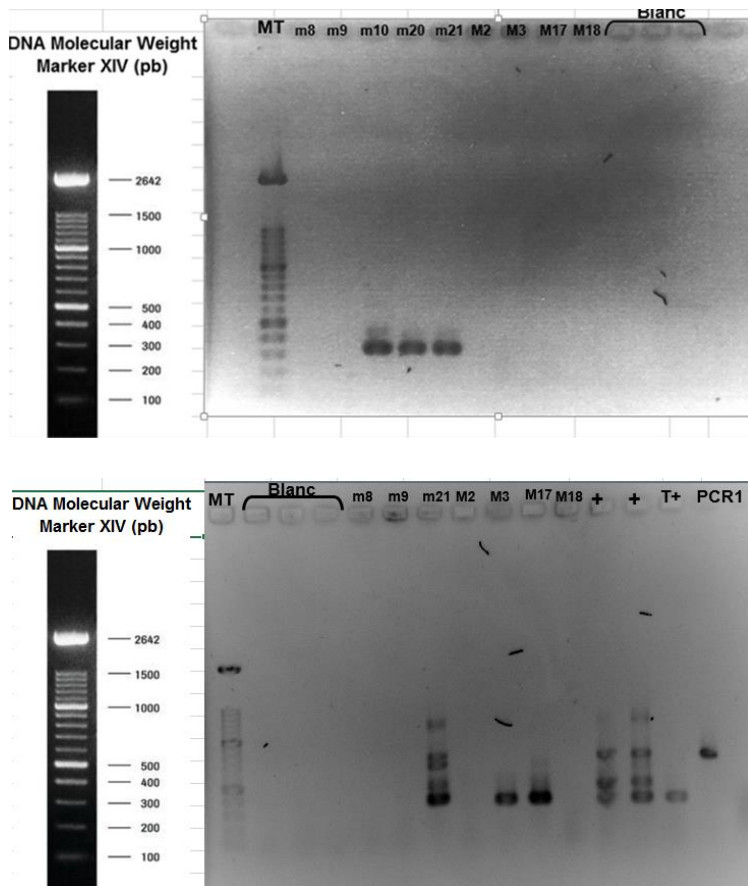


Figura 7.3 Profilele electroforetice ale produșilor RT-nested PCR
Figure 7.3 Electrophoretic profiles of RT-nested PCR products

7.2.2.2 Caracterizarea moleculară și analiza filogenetică a tulpinilor VHE circulante

Cei cinci produși RT-nested PCR au putut fi secvențiați, iar după editarea secvențelor nucleotidice izolatele obținute au fost denumite: m10WbRo, m20WbRo, m21WbRo, M17WbRo și M3WbRo. Similaritatea nucleotidică dintre secvențele obținute de la mistreții din cadrul aceluiași județ (Suceava) a variat de la 99.31% la 100%, iar cea dintre acestea și secvența obținută de la mistrețul din județul Vrancea între 85.22% și 85.56% (tabelul 7.10).

Tabelul 7.10/Table 7.10

Procentele de similaritate nucleotidică dintre secvențele VHE obținute
Nucleotides similarity between the obtained HEV sequences

	m10WbRo	m20WbRo	m21WbRo	M17WbRo	M3WbRo
m10WbRo		99.65%	99.65%	99.31%	85.56%
m20WbRo	99.65%		100%	99.65%	85.22%
m21WbRo	99.65%	100%		99.65%	85.22%
M17WbRo	99.31%	99.65%	99.65%		85.56%
M3WbRo	85.56%	85.22%	85.22%	85.56%	

Analiza bioinformatică a secvențelor în server-ul BLAST, pe baza comparării unui fragment de 291 nt, a indicat că toate izolatele aparțin VHE, genotipul 3. Acestea au fost traduse în proteine și depuse în GenBank. Numerele de acces în GenBank alocate pentru fiecare izolat sunt descrise în tabelul 7.11.

Tabelul 7.11/Table 7.11

Numerele de acces în GenBank pentru izolatele obținute
GenBank access numbers for the obtained isolates

Izolat	Număr de acces în GenBank
m10WbRo	KY797269
m20WbRo	KY797270
m21WbRo	KY797271
M17WbRo	KY797273
M3WbRo	KY797272

Pentru a evidenția relațiile evolutive, arborele filogenetic a fost construit folosind secvențele VHE omoloage și cele de referință pentru fiecare subtip VHE-3 [Smith și colab., 2016], care au fost descărcate de portalul NCBI. Analiza filogenetică a indicat că secvențele VHE obținute de la mistreții din estul României pot fi încadrate în două grupuri monofiletice, în funcție de județul de eșantionare: "3abj" pentru cele obținute de la mistreți din județul Suceava și, respectiv, "3chi" pentru secvența obținută de la un mistreț din județul Vrancea (figura 7.4).

Izolatele obținute de la mistreții din județul Suceva (m10wbRO, m20wbRO, m21wbRO și M17wbRO, numere de acces în GenBank: [KY797269](#), [KY797270](#), [KY797271](#) și, respectiv, [KY797273](#)), pe baza identității nucleotidice cu izolatele publicate în GenBank, au fost încadrate în subtipul 3a (figura 7.4).

Analiza BLAST a arătat că procente de identitate nucleotidică dintre izolatele noastre și cele ale izolatelor omoloage, grupate în subtipul 3a, din baza de date GenBank, au valori cuprinse între 93% - 97%. Acestea s-au dovedit a fi înrudite în proporție de: 97% cu izolatul uman – 9950 din Franța (număr de acces în GenBank [KR812467.1](#)); 95% cu izolatul uman - HEV_NL_2009004863 din Olanda (număr de acces în GenBank [JQ929109.1](#)); 94% cu cele umane HE-JA10 și HE-JAS3 din Japonia (numere de acces GenBank [AB089824](#) și [AB107368](#)); 93% cu izolatul suin – KOR1 din Coreea (număr de acces în GenBank [AF516178](#)). De asemenea, aceste izolate s-au dovedit a fi înrudite genetic în proporție de 94% cu izolatul uman 1559-07-gt3 din Serbia (număr de acces în GenBank [HM641390.1](#)) și cu două izolate umane, HUN-E69 și HUN-E71 din Ungaria (numere de acces în GenBank [EF530663](#) și [EF530664](#)).

Izolatul obținut din proba de splină, recoltată de la un mistreț din județul Vrancea (M3wbRO, număr de acces în GenBank [KY797272](#)), pe baza identității nucleotidice cu tulpinile de referință ale fiecărui subtip din cadrul genotipului 3 (HEV3) [Smith și colab., 2016] a fost atribuită grupului monofiletic "3chi" și pare să aparțină subtipului 3h (figura 7.4). Pentru a confirma acest lucru, ar trebui să se efectueze secvențierea întregului genom. Acest izolat prezintă o identitate nucleotidică de 90% cu izolatul uman 573 din Franța (număr de acces în GenBank [KR027831.1](#)) și de 89% cu două izolate umane, D17 din Franța (număr de acces în GenBank [KJ740430.1](#)) și IC2011 din Spania (număr de acces în GenBank [KU513561.1](#)).

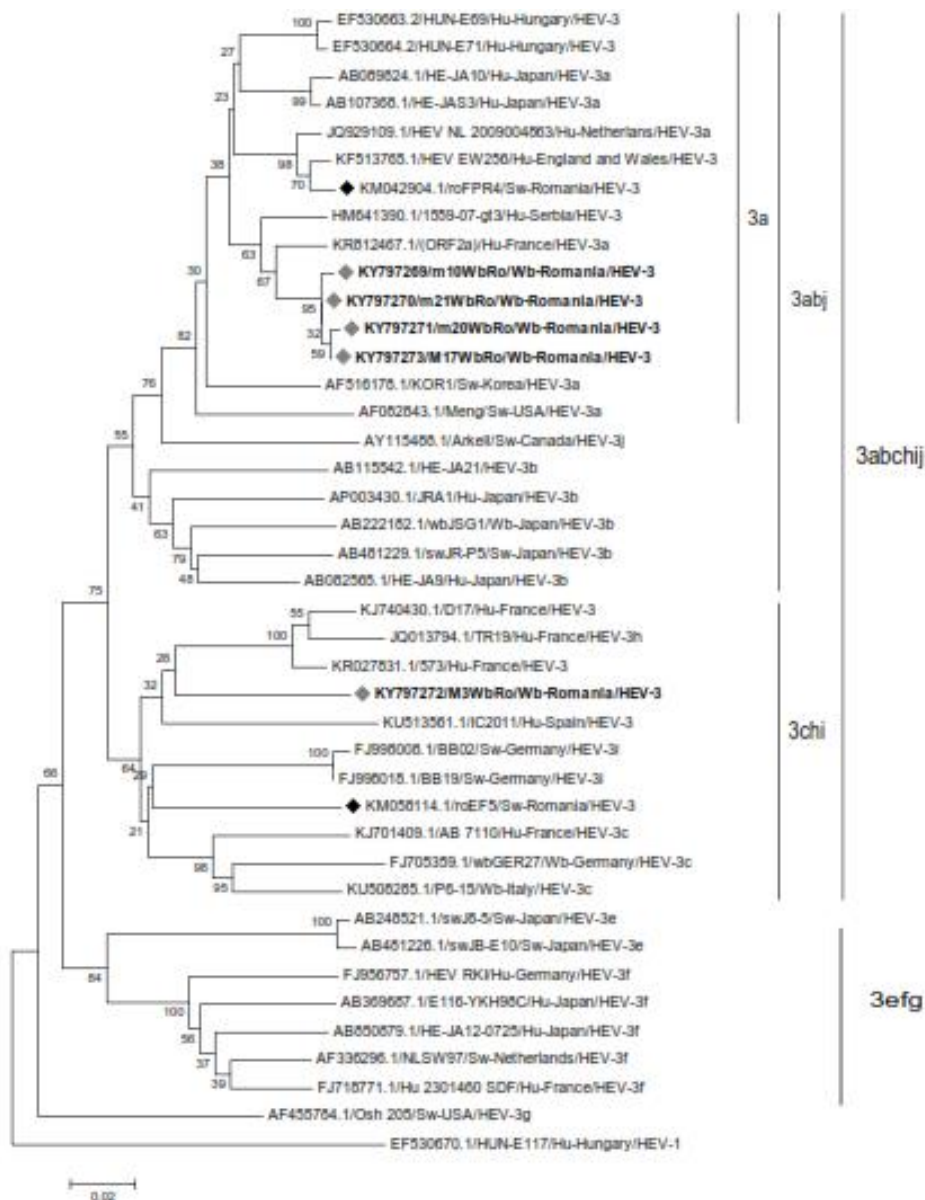


Figura 7.4 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage și de referință pentru fiecare subtip din baza de date GenBank (tulpinile VHE obținute de la mistreți în studiul nostru sunt evidențiate prin caractere aldine și prin romburi gri; romburile negre indică tulpinile VHE carcterizate anterior la suine)

Figure 7.4 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank and with the reference strains of each HEV3 subtype (the wild boar HEV strains obtained in our study are highlighted in boldface and through grey diamonds; the black diamonds indicated the swine HEV strains previously characterized in eastern Romania)

7.3 Discuții

Hepatita E este o zoonoză emergentă iar rezervoarele silvatiche au fost identificate în diferite țări ca un factor de risc pentru infecțiile autohtone cu VHE. În România, studiile anterioare efectuate la mistreți din județe din estul țării au indicat prezența infecției cu VHE pe baza identificării anticorpilor IgG anti-VHE.

În acest studiu, din cele trei specii de animale sălbatice investigate (mistreț, căprior și iepure sălbatic), prezența ARN-ului VHE a fost identificată doar la mistreți. Lipsa sau ratele scăzute de detecție a VHE la cervide este comună pentru o serie de studii care au întreprins cercetări simultane la mistreți și cervide. În Croația, Prpic și colab., 2015, într-un studiu ce a inclus 536 de mistreți și 320 de cervide (*C. capreolus* și *C. elaphus*) au detectat ARN-ul VHE doar la mistreți (12.3% - 66/536). În Germania, Anheyer-Behmenburg și colab., 2017, au detectat ARN-ului VHE la 16.8% (39/232) din mistreți analizați și la 6.4% (5/78) și, respectiv, la 2.4% (2/83) din cele două specii de cervide analizate (*C. capreolus* și *C. elaphus*). Mai mult, rezultatele studiului din Germania au arătat că încărcătura virală a ARN-ului VHE (GE/g) la mistreți este mai mare decât cea de la cervide, iar anticorpi anti-VHE au fost detectați doar în probele recoltate de la mistreți. Pe baza acestor rezultate, autorii au sugerat că circulația VHE la mistreți este primară, iar la cervide secundară/colaterală, invocând infecția de tip "spillover". De asemenea, ancheta serologică realizată de Larska și colab., 2015, în Polonia, a arătat că 44.4% (116/261) din mistreții analizați au fost seropozitivi VHE, în timp ce anticorpi anti-VHE nu au fost detectați în niciuna din cele 239 de probe recoltate de cervide. Pe de altă parte, rezultatele studiilor realizate de Rutjes și colab., 2010, în Olanda, au arătat că rata de detecție a ARN-ului VHE la cerbul comun a fost mai mare decât cea detectată la mistreți (15% vs 8%), iar prezența anticorpilor specifici infecției cu VHE a fost evidențiată în probele recoltate de la ambele specii de animale luate în studiu. De asemenea, rezultatele studiilor întreprinse în Ungaria arată că ratele de detecție a ARN-ului VHE la cervide sunt mai crescute decât cele detectate la mistreți [Reuter și colab., 2009; Forgách și colab., 2010] (tabelul 2.1 și tabelul 2.2). În Spania, ARN-ul VHE a fost detectat la 14% (11/81) din cerbii comuni analizați în anul 2010 și la 16.05% (16/81) din cei analizați în 2016, iar ratele de seropozitivitate au fost de 10% (101/968) și, respectiv, 12.85% (9/70) [Boadella și colab., 2010; Kukielka și colab., 2016]. Caracterizarea tulpinilor VHE, a dus la încadrarea în subtipul 3e a izolatelor din Italia și în subtipurile 3c și 3i a izolatelor din Germania [Di Bartolo și colab., 2016; Anheyer-Behmenburg și colab., 2017].

Într-un studiu similar, efectuat în Franța, ARN-ul VHE a fost detectat la mistreți, cervide și iepuri sălbatici investigați, în proporții de 5.8% (5/86), 3.2% (2/62) și, respectiv, 5% (1/20) [Lhomme și colab., 2015b]. Autorii au sugerat că rata de detecție mai mică a VHE la iepurele sălbatic decât cea anterior (23% - 47/205) detectată de către Izopet și colab., 2012, s-ar putea datora și unei răspândiri mai reduse a VHE de la efectuarea studiilor anterioare. Identificarea subtipului 3g a VHE-3 la un iepure în

Germania, a sugerat posibilitatea infecțiilor încrucișate cu VHE între diferitele specii receptive [Hammerschmidt și colab., 2017].

Deși numărul redus de animale testate reprezintă o limitare a studiului nostru, pe baza datelor exemplificate din literatura de specialitate putem suspiciiona că rezultatele negative obținute pentru probele recoltate la cervide și iepurele sălbatic pot fi rezultatul unui cumul de factori. În plus față de factorii specificați în literatura de specialitate, enunțăm ca posibili factori implicați în dinamica infecției cu VHE la cervide, selectivitatea acestora în alegerea surselor de hrană și apă, precum și particularitățile anatomice – lipsa bilei (fierei). Aceasta din urmă, ar putea influența cursul infecției cu VHE. Conform datelor publicate de Okamoto, 2013, acidul dezoxicolic, secretat de țesutul biliar, este esențial pentru disocierea lipidelor de virioni. Pentru a evalua factorii invocați trebuie întreprinse studii complexe.

Rezultatele au arătat că ARN-ul VHE a fost detectat în nouă din cele 50 de probe testate de la mistreți, corespunzând unei rate de detecție de 18%. Rezultatele anchetei serologice întreprinse în aceeași arie de studiu (figura 7.5) pe parcursul aceluiași sezon de vânătoare au indicat prezența VHE printr-o seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE de 11.92%. După analizarea probelor de mistreți din cinci județe, au fost identificate animale ARN-VHE pozitive numai în județele Vrancea și Suceava (figura 7.5). Cu toate acestea, anchetele serologice anterioare, efectuate pe probe de ser recoltate de la mistreți din județele Iași și Galați au arătat circulația VHE prin ratele de detecție semnalate: 11.11% și, respectiv, 10.52% (tabelul 6.4). Prin urmare, nu putem exclude prezența VHE la populațiile de mistreți din cele trei județe identificate ARN-VHE negative în acest studiu.

Detecția ARN-ului VHE a fost semnalată la animalele din categoria de vârstă 1-2 ani și la cele din categoria > 2 ani (tabelul 7.9). Studiile efectuate în alte țări Europene precum Italia [Martelli și colab., 2008], Germania [Adlhoj și colab., 2009] și Portugalia [Mesquita și colab., 2016] la un număr crescut de eșantioane au semnalat prezența VHE la mistreți din toate categoriile de vârstă. Aceste aspecte au sugerat că ARN-ul VHE la mistreți poate fi detectat pentru o lungă perioadă de timp pe parcursul vieții animalelor, ca o consecință a unui răspuns imun incomplet cu reinfectări ulterioare sau a cronicizării infecției cu VHE la această specie [Adlhoj și colab., 2009; Rutjes și colab., 2010].

Analiza datelor din studiul de față, în funcție de tipul de țesut analizat, a arătat că două din cele nouă probe identificate pozitiv sunt de origine splenică (tabelul 7.9). Cercetările realizate de diverși autori au arătat că VHE poate fi identificat în probe de țesut splenic recoltate de la suinele domestice atât în infecțiile experimentale [Williams și colab., 2001; Lee și colab., 2009], cât și în cele naturale [Choi C. și Chae C., 2003]. De asemenea, în studiul realizat de Anheyer-Behmenburg et al 2017, VHE a fost detectat în țesutul splenic și cel renal al mistreților și al cervidelor investigate. Rezultatele noastre ar putea reflecta sugestiile specificate în literatura de specialitate, care indică faptul că VHE se poate replica și acumula în alte țesuturi decât cel hepatic [Williams și colab., 2001; de Deus și colab., 2007].

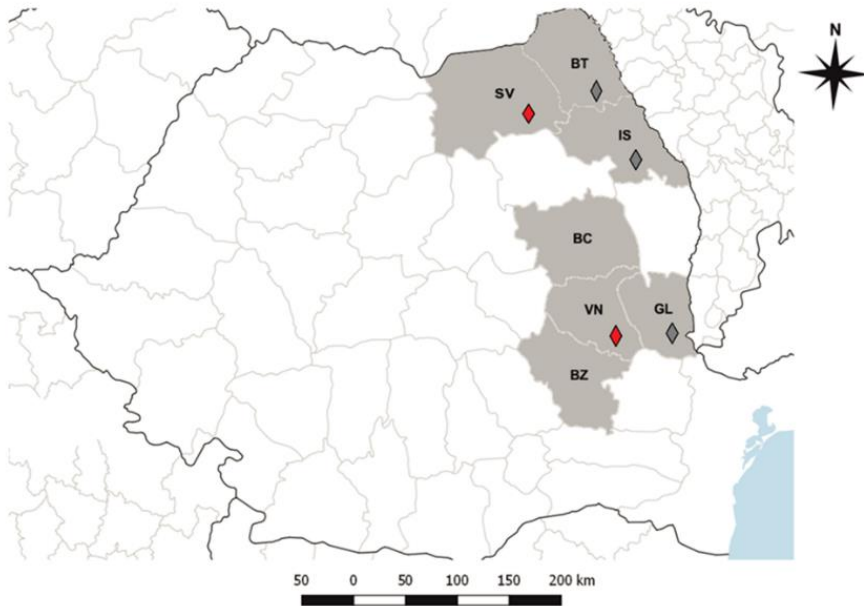


Figura 7.5 Distribuția geografică a județelor în care au fost efectuate cercetări cu privire la infecția cu VHE la mistreți (serologice și virusologice)
 (■ județe anchetate serologic, ◆ județe ARN VHE negative,
 ◆ județe ARN VHE pozitive)

Figure 7.5 Counties searched in previous and the current study for VHE infection in wild boar population in Romania

(■ Counties where studies for HEV infection have been undertaken,
 ◆ Counties where wild boar HEV has been detected in this study, ◆ Counties where negative wild boar HEV has been identified in this study.

Ratele diferite de prevalență a ARN-ului VHE la mistreți din Europa au fost asociate cu tipul de țesut analizat. Într-un studiu efectuat în Germania de către Adlhoch și colab., 2009, s-a observat o diferență semnificativă între ratele de prevalență a VHE în probele de bilă (56.3%), ficat (38.1%) și ser (15.7%). Conform datelor publicate de de Deus și colab., 2007, în țesutul biliar ARN-ul VHE poate fi detectat o perioadă mai lungă de timp, fiind urmat de cel limfatic și hepatic. Prevalența VHE obținută în studiul nostru (18%) este mai mică decât cea raportată, prin testarea eșantioanelor de țesut biliar, în Germania (68.2%) [Adlhoch și colab., 2009] și în Italia (25%) [Martelli și colab., 2009], dar este similară celor obținute, prin testarea altor tipuri de probe (ficat, ser, etc), în studiile efectuate în Spania (19.6%) [de Deus și colab., 2008] și în Estonia (16%) [Ivanova și colab., 2015]. De asemenea, prevalența detectată este mai mare decât cea raportată în studiile efectuate în Ungaria (12.2%, 11%) [Reuter și colab., 2009; Forgach și colab., 2010], în Franța (2.5%, 2.3%) [Kaba și colab., 2010; Jori și colab., 2016] și în Suedia (8.2%) [Widen și colab., 2011], deși în aceste studii au fost analizate un număr

general mai mare de probe. Alți factori au fost sugerați a fi implicați în diferențele de prevalență ale VHE, cum ar fi: stadiul de infecție al animalelor la momentul prelevării probelor, diferitele tehnici de diagnosticare, diferențele ecologice ale populațiilor de mistreți și caracterele fenotipice ale acestora [Adlhoch și colab., 2009; Caruso și colab., 2015; Jori și colab., 2016]. Prin urmare, prevalența detectată relevă o circulație crescută a infecției cu VHE în populația de mistreți din estul României.

Cele cinci tulpini VHE izolate au fost caracterizate. Rezultatele au arătat că diferite subtipuri HEV-3 circulă în cele două județe în care au fost identificate probe pozitive. Studiile efectuate în Germania au raportat că tulpinile VHE izolate de la mistreți au fost încadrate în diferite subtipuri, în funcție de zona geografică de eșantionare [Adlhoch și colab., 2009; Schielke și colab., 2009]. În anul 2014, Aniță și colab., în studiul efectuat cu privire la infecția cu VHE la populația umană și la suinele din estul României, semnalează circulația virusului în fermele de porci și expunerea populației la infecția cu VHE. Pe baza analizei filogenetice a secvenței terminale a ORF2, izolatele VHE de la suinele domestice au fost încadrate în genotipul 3. Faptul că tulpinile VHE izolate de la mistreți din județul Suceava sunt încadrate într-un singur subtip și sunt înrudite genetic cu tulpina roFPR4 de la suine, caracterizată anterior în estul României (numărul de acces în GenBank [KM042904](#)), arată că suinele pot reprezenta o sursă endemică de infecție cu VHE pentru populația umană. Încadrarea tulpinilor izolate de la mistreți din cele două județe, situate la polurile opuse ale zonei analizate, în diferite subtipuri ale VHE - 3 arată că această specie poate reprezenta o sursă de infecție cu diferite subtipuri virale pentru alte animale și pentru om.

De asemenea, analiza filogenetică a relevat că tulpinile VHE identificate la mistreții din România sunt înrudite genetic cu tulpinile VHE umane circulante în Europa. Unele studii, din literatura de specialitate, evidențiază faptul că tulpinile încadrate în genotipurile 3a, 3c, 3h și 3i izolate de mistreți prezintă o identitate nucleotidică ridicată cu tulpinile VHE umane izolate din cazurile autohtone de hepatită E [Schielke și colab., 2008; Rutjes și colab., 2010; Forgach și colab., 2010; Mazzei și colab., 2015]. În Germania, tulpini VHE înalt înrudite genetic au fost izolate de la pacienții cu hepatită E acută și de la suinele din aceeași regiune [Wenzel și colab., 2015]. Într-un studiu efectuat în Suedia, tulpinile VHE izolate de la oameni s-au dovedit a fi înrudite genetic cu cele izolate de la suinele domestice și cele sălbatice din același județ [Widen și colab., 2011]. Studiile serologice privind infecția cu virusul hepatitei E la om în România relevă rate crescute ale anticorpilor IgG anti-VHE la populația din estul țării [Aniță și col., 2014; Vâță și col., 2015]. Aceste rezultate, împreună cu cele obținute în studiul nostru, sugerează o posibilă corelare cu prezența VHE la suinele domestice și cele sălbatice din această zonă. Pentru a confirma această ipoteză, cercetări suplimentare trebuie să se întreprindă pentru a identifica și caracteriza tulpinile VHE umane.

7.4 Concluzii parțiale

- Acesta este **primul studiu** care a avut ca obiectiv **identificarea și caracterizarea** virusului hepatitei E **la animale sălbatice** din **România**.
- Rezultatele obținute prin **analiza moleculară** confirmă **prezența infecției** cu VHE **la mistreți**, semnalată anterior doar prin detecția anticorpilor specifici.
- Explicația rezultatelor negative obținute de la cervide și iepuri sălbatici ar putea fi, pe de o parte, numărul redus de animale testate iar la cervide și alți factori, cum ar fi particularitățile anatomice (lipsa vezicii biliare) și selectivitatea acestora în alegerea surselor de hrană și apă.
- Identificarea a **diferite subtipuri de VHE-3 (3a și probabil 3h)** sugerează posibilitatea prezenței și a altor subtipuri de virus.
- Încadrarea tulpinilor VHE izolate în subtipurile frecvent raportate în cazurile autohtone de hepatită E acută la pacienții din Europa, sugerează că **mistreții** pot reprezenta o **sursă de infecție** cu VHE **pentru populația umană** din România.

CAPITOLUL VIII

STUDII MOLECULARE PENTRU IDENTIFICAREA TULPINILOR VHE CIRCULANTE LA ȘOBOLAN ȘI LA ALTE SPECII DE ANIMALE

CHAPTER VIII

MOLECULAR IDENTIFICATION OF HEPATITIS E VIRUS STRAINS CIRCULATING IN RATS AND OTHER ANIMAL SPECIES

Diferitele practici ale omului au dus la extinderea habitatelor rozătoarelor dăunătoare, prin crearea condițiilor favorabile de existență ale acestora. Dintre speciile de șobolani, *Rattus norvegicus* și *Rattus rattus* sunt considerate a fi specii sinantropice în diferite teritorii din întreaga lume, precum și în România. Datorită rolului în transmiterea a diverși agenți patogeni la oameni și la animale, șobolanii sunt recunoscuți ca rezervoare importante de agenți patogeni zoonotici. Rolul șobolanilor în transmiterea VHE-3 a fost sugerat pe baza gradului de înrudire genetică dintre tulpini izolate de la această specie cu tulpini VHE izolate de la om, dar și de la alte specii de animale. Potențialul zoonotic al VHE de la șobolan, precum și capacitatea acestuia de a traversa bariera de specie sunt controversate. Studiile serologice au sugerat că oamenii ar putea fi infectați cu VHE de la șobolan [Dremsek și colab., 2012; Shimizu și colab., 2016]. De asemenea, VHE de la șobolan s-a dovedit a fi cultivabil pe o linie celulară umană [Jirintai și colab., 2014]. Cu toate acestea, studiile experimentale care au utilizat ca modele experimentale Macacul crabivor (*Cynomolgus macaques*) și suinele, au arătat că acestea nu sunt susceptibile la infecție cu VHE de la șobolan [Doceul și colab., 2016].

Tulpini VHE-3 au fost izolate de la șobolani din Japonia și din SUA [Kanai și colab., 2012; Lack și colab., 2012]. Tulpinile izolate de la șobolanii din Japonia capturați din împrejurimea unei ferme de porci s-au înrudit genetic cu o tulpină VHE-3 izolată de la un porc din ferma respectivă [Kanai și colab., 2012]. Analiza filogenetică a tulpinilor VHE-3 izolate de la șobolani în SUA a arătat că acestea sunt grupate într-o singură

cladă și se disting de cele ale VHE-3 din bazele de gene internaționale, cu excepția unei tulpini VHE suine (număr de acces în GanBank AF082843) [Lack și colab., 2012].

Virusul hepatitei E a fost identificat la șobolani din Germania [Reimar și colab., 2010; 2012], SUA [Purcell și colab., 2011], Vietnam [Li și colab., 2011], Japonia [Kanai și colab., 2012], Indonezia [Mulyanto și colab., 2013; 2014], China [Li și colab., 2013] și Franța [Widén și colab., 2014]. De asemenea, rezultatele studiului publicat recent de către Ryll și colab., 2017, au arătat că VHE este prezent la șobolani din 11 țări ale Europei din cele 12 analizate (Germania, Ungaria, Danemarca, Austria, Elveția, Republica Cehă, Belgia, Franța, Slovenia, Grecia, Italia și Spania), cu excepția Sloveniei. Tulpinile izolate au fost încadrate în genotipul C1 (specia *Orthohepevirus C*), cu excepția tulpinii KS/16/825 izolată de la un șobolan din Belgia. Aceasta pe baza gradului de omologie cu 3 tulpini VHE izolate de la iepure din China și cu o tulpină VHE izolată de la un pacient din Franța, a fost încadrată în subtipul 3ra (genotipul VHE-3, specia *Orohepevirus A*), specific pentru VHE de la iepure [Ryll și colab., 2017].

Virusul hepatitei E a fost identificat la dihorii de companie din Olanda [Raj și colab., 2012], dar și de laborator din SUA și Japonia. Pe baza înrudirii genetice cu VHE de la șobolan, tulpinile izolate au fost încadrate în specia *Orthohepevirus C*, dar în genotipul C2, împreună cu cele de la nură. Virusul hepatitei E a fost depistat la nurele de crescătorie din Danemarca, dar nu și la cele sălbatice [Krog și colab., 2013]. De asemenea VHE fost identificat la vulpile testate din Olanda. Tulpinile izolate au fost încadrate în specia *Orthohepevirus C*, pe baza înrudirii genetice cu hepevirusurile de la dihor și șobolani [Bodewes și colab., 2013].

Prin urmare, obiectivele studiului nostru au constatat în identificarea și caracterizarea tulpinile VHE circulante la șobolani, cu scopul de a evalua rolul acestei specii în epidemiologia infecției cu VHE în aria de studiu. De asemenea, studiul a vizat și identificarea VHE la vulpi și la alte animale sălbatice.

8.1 Material și metodă

8.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor

Pentru realizarea principalului obiectiv al studiului nostru, identificarea și caracterizarea VHE la șobolan, au fost supuse testării 52 de probe de ficat recoltate de la animalele capturate în scopul combaterii dăunătorilor din patru județe: Suceava, Iași, Bacău și Tulcea (figura 8.1). În județele Suceava, Bacău și Tulcea principalele locații de capturare a șobolanilor au fost situate în proximitatea fermelor de porci cu sisteme diferite de creștere (intensiv, semi intensiv și extensiv – de tip gospodăresc). În plus, una din locațiile de capturare din județul Suceava a fost situată în proximitatea unei crescătorii cu diverse specii de animale, amplasate în mediul silvatic (stână). De asemenea, în județul Tulcea au fost capturați șobolani din împrejurimile unor așezări rurale din zona Delta Dunării. În județul Iași, principala locație de capturare a șobolanilor a fost situată în imediata apropiere a ghenelor de gunoi din campusul

universitar USAMV. Din acest județ, a fost supusă analizei și o probă de țesut recoltată de la un șobolan capturat în proximitatea unei ferme de bovine. Datele cu privire la numărul de șobolani capturați în fiecare locație din cele 4 județe sunt prezentate în tabelul 8.1.



Figura 8.1 Distribuția geografică a județelor incluse în studiu, cu reprezentarea speciilor analizate

Figure 8.1 Geographical distribution of the counties included in the study, with the representation of the analyzed species

Nu au fost efectuate studii de genetică moleculară pentru determinarea statutului taxonomic al șobolanilor capturați. Pe baza caracterelor morfologice cei 52 de șobolani au fost identificați ca aparținând speciei *Rattus norvegicus* (șobolanul cenușiu).

De asemenea, au fost incluse în analiză și probe de ficat recoltate de la o serie de animale găsite moarte întâmplător: patru dihori (*Mustela putorius*), unul din județul Iași și trei din județul Tulcea; o nutrie (*Myocastor coypus*) și un bizam (*Ondatra zibethicus*) din județul Tulcea; o cârțiță (*Talpa europaea*) din județul Suceava și un șoarece (*Mus musculus*) din județul Iași (figura 8.1).

Pentru identificarea și caracterizarea VHE la vulpe au fost recoltate probe de ficat de la 9 animale din județul Vrancea. Acestea provin din diferite fonduri de

vânătoare și aparțin categoriei de vârstă - animale adulte (> 2 ani) (datele nu sunt prezentate).

Tabelul 8.1/Table 8.1

Distribuția șobolanilor testați din fiecare județ, în funcție de locația de capturare
Distribution of tested rats per county, depending on the capturing location

LOCAȚIE	Număr șobolani/locație/județ			
	Suceava	Iași	Bacău	Tulcea
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem intensiv	-	-	-	12
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem semi-intensiv	5	-	11	-
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem extensiv	1	-	5	-
Proximitatea unei crescătorii cu diverse specii de animale (stână)	10	-	-	-
Proximitatea unei ferme de bovine	-	1	-	-
Proximitatea ghenelor de gunoi	-	5	-	-
Împrejurimile așezărilor rurale	-	-	-	2
TOTAL	16	6	16	14

În scopul identificării relațiilor filogenetice dintre tulpinile VHE de la șobolani și eventualele tulpini VHE de la suine din fermele în a căror proximitate au fost capturați o parte din șobolanii din județele Bacău și Tulcea, au fost efectuate cercetări cu privire la prezența VHE la animalele din fermele respective. Pentru aceasta au fost colectate probe de fecale, sub formă de mixuri (pools) (n=10), de la animale din două ferme. Acestea au fost colectate de la animale cu diferite vârste (1 zi – 2 ani) și stări fiziologice (animale gestante, animale care au fătat recent, vieri, scrofițe, porci înțărcați, porci la îngrășare), precum și diferite rase/specii (rase pure de carne, porcul de Mangalița, porc alb - hibrid, mistreți-hibridi). Au fost colectate patru probe (pools) de fecale de la animalele unei ferme de suine cu sistem semi-intensiv din județul Bacău și șase probe (pools) de la animalele (rase de carne) unei ferme cu sistem intensiv din județul Tulcea. Toate probele au fost condiționate la temperatura de - 80°C până la momentul testării.

8.1.2 Extracția acidului nucleic (ARN)

Extracția ARN-ului din probele de ficat, recoltate de la animalele sălbatice, s-a realizat conform protocolului de lucru descris în subcapitolul 7.1.2. Pentru extracția ARN-ului din probele de fecale, colectate de la suine, s-a utilizat protocolul de lucru descris de Aniță și colab., 2014.

8.1.3 Probele de control utilizate pentru validarea reacțiilor

Pentru validarea reacțiilor au fost luate măsurile de precauție descrise în subcapitolul 7.1.3. Probele de control utilizate în fiecare etapă de lucru pentru detecția VHE la animalele sălbatice au fost reprezentate de probe negative (131) și, respectiv,

pozitive (1323, 133) de la mistreți, stocate în cadrul unității UMR 1161 Virologie, Alfort, Franța. Pentru detecția VHE la suine a fost folosită ca probă de control o proba VHE pozitivă (roFPR4) stocată în laboratorul de biologie moleculară al Facultății de Medicină Veterinară Iași.

8.1.4 Amplificarea genică

Pentru detecția ARN-ului VHE în probele de analizat au fost utilizate diverse metode și protocoale de lucru. Unul dintre aceste protocoale a fost utilizat ca urmare a abilității sale în detecția VHE de la șobolan (specia *Ortohepevirus C*) [Johne și colab., 2010], iar celelalte pentru capacitatea lor de a detecta genotipurile patogene pentru om, VHE-1 - VHE-4 (specia *Ortohepevirus A*) [Cooper și colab., 2005; Jothikumar și colab., 2006]. Pentru detecția ARN-ului VHE de la vulpi s-a încercat dezvoltarea a două protocoale de lucru. Acestea au avut la bază primeri utilizați de Bodewes și colab., 2013, pentru detecția VHE la vulpi în Olanda.

8.1.4.1 TaqMan – RT-PCR și RT-nested PCR specifice pentru detecția genotipurilor 1-4 (VHE-1 - VHE-4)

TaqMan - RT-PCR

Metoda de detecție cantitativă a VHE descrisă în subcapitolul 7.1.4, a fost utilizată pentru detecția ARN-ului VHE în probele de ficat recoltate de la animalele sălbatice.

RT-nested PCR

Metoda de detecție a VHE descrisă în subcapitolul 7.1.5.1, a fost utilizată pentru detecția ARN-ului VHE în probele de ficat recoltate de la animalele sălbatice, precum și în probele de fecale colectate de la suine.

8.1.4.2 RT-nested PCR pentru detecția hepevirusurilor

Probele de ficat recoltate de la animalele sălbatice au fost analizate pentru detecția ARN-ului VHE prin metoda RT-nested PCR adaptată după descrierile publicate de Johnne și colab., 2010. Această analiză vizează amplificarea unui fragment din regiunea conservată ARN polimeraza-ARN dependentă a ORF1, prin utilizarea a două seturi de primeri degenerați (tabelul 8.2). Această metodă poate fi utilizată pentru identificarea VHE la șobolan și la alte specii [Johne și colab., 2010].

Tabelul 8.2/Table 8.2

Primerii utilizați pentru amplificarea regiunii de interes prin RT-nested PCR

Primers used to amplify the region of interest by RT-nested PCR

[Johne și colab., 2010]

Reacția	Denumire primer	Secvența (5'→3')	Lungime (pb)
PCR 1	HEV-cs	TCGCGCATCACMTTYTTCCARAA	469–472
	HEV-cas	GCCATGTTCCAGACDGTRTTCCA	
PCR 2	HEV-csn	TGTGCTCTGTTTGGCCCNTGGTTYCDG	331–334
	HEV-casn	CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA	

Revers-transcripția

Transcripția ARN-ului viral în ADNc a fost realizată conform protocolului descris în secțiunea specifică din subcapitolul 7.1.5.1.

PCR-1

Prima amplificarea PCR a fost realizată prin utilizarea setului de primeri externi (tabelul 8.2), respectiv HEV-cs și HEV-cas. Reacțiile au fost efectuate în 25 μ l volum final/reacție, utilizând kitul Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, Franța), conform datelor descrise în tabelul tabelul 8.3.

Tabelul 8.3/Table 8.3

PCR - 1: Reactivi și program de amplificare

PCR - 1: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
- 2 μ l ADNc				
- 17.3 μ l H ₂ O qsp	Denaturare	95°C	5'	1
- 2.5 μ l Tp10X Taq Platinum	Denaturare	94°C	30"	40
- 1.5 μ l MgCl ₂ (50mM)	Hibridizare	50°C	30"	
- 0.5 μ l dNTP (10mM)	Elongație	74°C	45"	
- 0.5 μ l HEV-cs (10 μ M)	Elongație	74°C	5'	1
- 0.5 μ l HEV-cas (10 μ M)				
- 0.2 μ l Taq Platinum 1U	Final	4°C	∞	

PCR-2

A doua rundă PCR a fost efectuată cu cel de al 2-lea set de primeri degenerați (interni): HEV-csn și HEV-casn. Reacțiile au fost efectuate în 50 µl volum final/reacție, conform datelor specificate în tabelul 8.4.

Tabelul 8.4/Table 8.4

PCR - 2: reactivi și program de amplificare

PCR - 2: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
- 5 µl produs PCR -1	Denaturare	95°C	5'	1
- 35.3 µl H ₂ O qsp	Denaturare	94°C	30"	35
- 5 µl Tp 10X Taq Platinum	Hibridizare	50°C	30"	
- 1.5 µl MgCl ₂ (50mM)	Elongație	72°C	45"	
- 1 µl dNTP (10mM)	Elongație	72°C	5'	1
- 1 µl HEV-csn (10µM)	Final	4°C	∞	
- 1 µl HEV-casn (10µM)				
- 0.2 µl Taq Platinum 1U				

Analiza produsilor de amplificare prin electroforeză în gel de agaroză

Analiza produsilor de amplificare s-a realizat conform metodei descrise în secțiunea specifică din subcapitolul 7.1.5.1., cu excepția marker-ului de talie. În această analiză s-a utilizat marker-ul de talie ExactLadder® DNA Premix 100 bp plus (Ozyme, OZYC001-100).

8.1.4.3 Dezvoltarea unor protocoale de lucru PCR pentru detecția VHE de la vulpe

Pentru detecția ARN-ului VHE în probele recoltate de la vulpi s-a încercat dezvoltarea a două protocoale de lucru PCR, care au inclus primeri creați de către Bodewes și colab., 2013, pentru amplificarea a două fragmente din regiuni conservate diferite: un fragment al proteinei capsidului (ORF2) cu lungimea de 295 de nucleotide și un fragment al poliproteinei (ORF1) cu lungimea de 362 de nucleotide. Secvențele nucleotidice ale celor două seturi de primeri utilizați în amplificarea fragmentelor de interes au fost obținute prin amabilitatea dl. DVM PhD Bodewes Rogier (Utrecht University, Olanda) în urma unei conversații în mediul online (mail). Acestea sunt prezentate în tabelul 8.5.

Tabelul 8.5/Table 8.5

Primerii utilizați pentru amplificare regiunilor de interes prin cele două protocoale PCR
 Primers used to amplify the regions of interest by the two PCR protocols

[Bodewes și colab., 2013]

Reacția	Denumire primer	Secvența (5'→3')	Lungime (nt)
PCR-ORF2	VD132	CTGGTAATACAAATACGCGGG	295
	VD133	CAGCAGGCTCTCCATTACTAC	
PCR-ORF1	VD134	CCCTTGATGAGACTGTTGAC	362
	VD135	CATCACCCCTTAAACGCGGC	

Pentru stabilirea temperaturilor de hibridizare a primerilor au fost consultate temperaturile de topire (T_m), specificate de furnizorul primerilor - MWG Biotech AG (Eurofins MWG, Ebersberg, Germania). Reacțiile s-au desfășurat în 25 μ l volum final/reacție și au fost realizate prin utilizarea reactivilor și a programului de amplificare din tabelul 8.3, cu excepția primerilor, fiind utilizați cei specifici prezentați în tabelul 8.5. Experimentele au fost efectuate o singură dată. Pentru confirmare, în funcție de profilul electroforetic obținut, ampliconi au fost secvențiați. Analiza produșilor de amplificare prin electroforeză în gel de agaroză s-a realizat conform metodei descrise în secțiunea specifică din subcapitolul 8.1.4.2.

8.1.5 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică

Secvențierea ampliconilor pozitivi a fost realizată de către MWG Biotech AG (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany) prin utilizarea metodei enzimatice Sanger. Secvențierea produșilor PCR a fost realizată pentru fiecare catenă. Pentru secvențierea ampliconilor RT-nested PCR pozitivi s-au utilizat primeri interni specifici.

Analiza bioinformatică și cea filogenetică a secvențelor obținute s-a realizat conform metodelor descrise anterior în subcapitolul 7.1.5.3 și, respectiv, în subcapitolul 7.1.5.5.

8.2 Rezultate

8.2.1 Detecția ARN-ului VHE în probele de ficat recoltate de la animalele sălbatice

În acest studiu, 69 de probe de ficat recoltate de la animale sălbatice (52 de șobolani, 4 dihuri, 1 nutrie, 1 bizam, 1 cârtiță, 1 șoarece și 9 vulpi) au fost analizate, prin diferite metode de biologie moleculară, pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante. Toate probele recoltate de la animalele sălbatice au fost testate prin cele trei metode adaptate din literatura de specialitate. În plus, probele recoltate de la vulpi au fost analizate și prin cele două protocoale de lucru PCR dezvoltate.

TaqMan - RT-PCR specific genotipurilor 1-4

Prin utilizarea metodei TaqMan - RT-PCR, specifică genotipurilor 1-4, cele 69 de probe de ficat recoltate de la animalele sălbatice s-au dovedit a fi negative.

RT-nested PCR specific genotipurilor 1-4

Cele 69 de probe de ficat recoltate de la animalele sălbatice s-au dovedit a fi negative și prin metoda RT-nested PCR specifică genotipurilor 1-4 (profilul electroforetic - figura 8.2.).

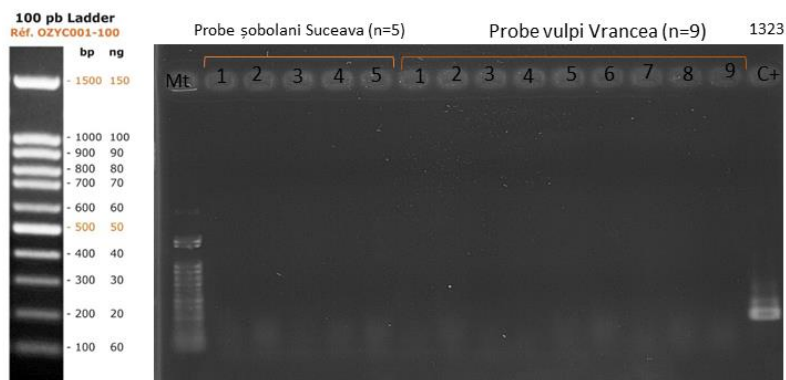


Figura 8.2 Profilul electroforetic al unor produși RT-nested PCR - specific genotipurilor 1-4

Figura 8.2 Electrophoretic profile of some products of RT-nested PCR specific for HEV 1-4 genotypes

RT-nested PCR pentru detectia hepevirusurilor

Prin aplicarea acestei metode, nouă din cele 69 de probe analizate au fost identificate pozitiv. Cele nouă probe pozitive VHE au provenit de la șobolani (profil electroforetic - figura 8.3). Analiza rezultatelor a arătat că VHE este prezent la șobolani din fiecare județ analizat (tabelul 8.6) și din patru locații din cele șapte analizate (tabelul 8.7).

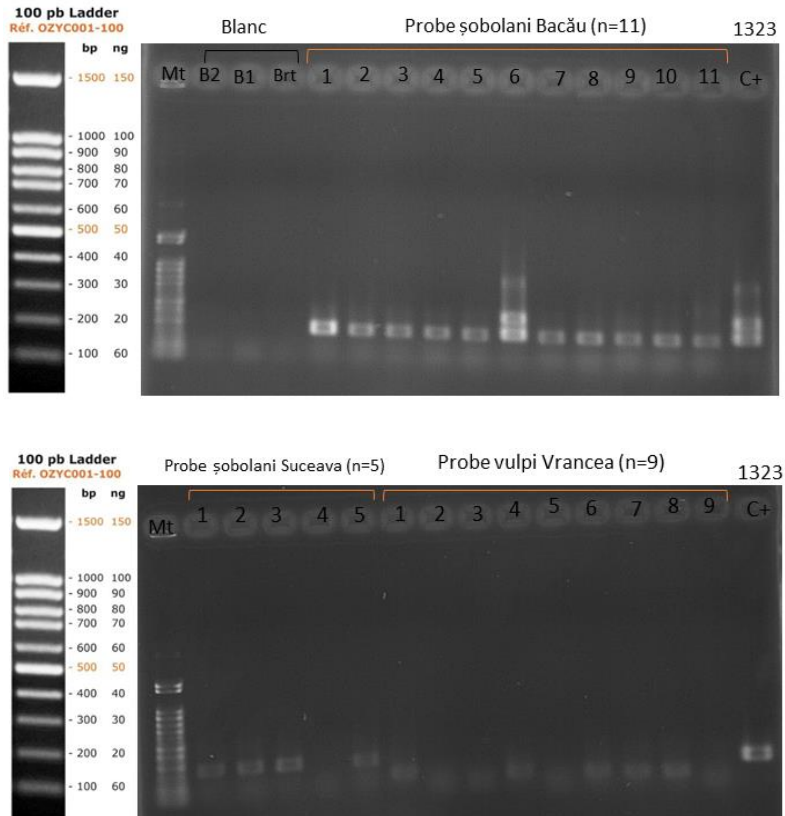


Figura 8.3 Profile electroforetice al unor produși RT-nested PCR pentru detecția hepevirusurilor

Figure 8.3 Electrophoretic profiles of some products of RT-nested PCR for the detection of hepeviruses

Tabelul 8.6/Table 8.6

Rezultatele obținute în funcție de județul din care au provenit șobolani
The obtained results by rat origin county

Județ	Nr. probe testate	Nr. probe pozitive
Suceava	16	3
Iași	6	1
Bacău	16	2
Tulcea	14	3
Total	52	9 (17.30%)

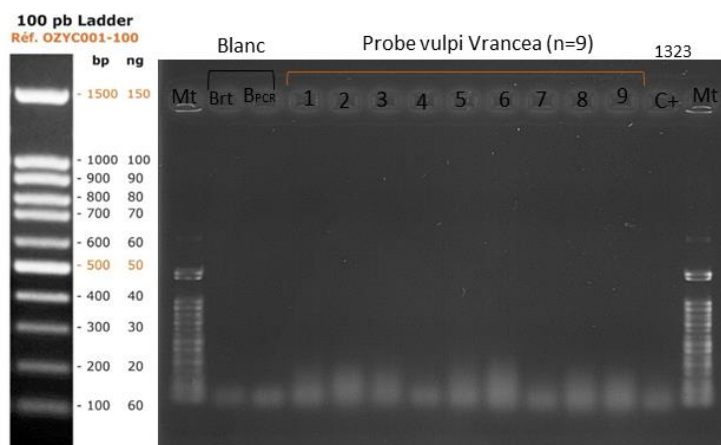
Tabelul 8.7/Table 8.7

Rezultatele obținute în funcție de locația de capturare a șobolanilor
The obtained results by capturing location

LOCAȚIE	Nr. probe testate	Nr. probe pozitive
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem intensiv	12	3
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem semi-intensiv	16	2
Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem extensiv	6	0
Proximitatea unei crescătorii cu mai multe specii de animale (stână)	10	3
Proximitatea unei ferme de bovine	1	1
Proximitatea ghenelor de gunoi	5	0
Imprejurimile așezărilor rurale	2	0

PCR-ORF2 și PCR-ORF1 pentru detecția VHE de la vulpe

Profilul electroforetic al produșilor PCR-ORF2 a arătat că nici una din cele nouă probe analizate nu este pozitivă VHE pentru segmentul de interes amplificat (figura 8.4). De asemenea, proba de ficat de mistreț (1323) utilizată ca probă de control (C+) nu a fost identificată pozitiv prin această metodă.

**Figura 8.4** Profilul electroforetic al produșilor PCR-ORF2**Figure 8.4** The electrophoretic profile of the PCR-ORF2 products

Analiza electroforetică a produșilor de amplificare obținuți din analiza probelor (probe blanc, probe vulpi, probă martor pozitiv) prin PCR-ORF1, a evidențiat prezența unei benzi ADN în poziția așteptată (362bp) pentru una din cele nouă probe de la vulpi (figura 8.5). De asemenea, profilul electroforetic, ilustrat în figura 8.5, a evidențiat prezența unor benzi suplimentare pentru acest produs, ceea ce denotă existența unor amplificări nespecifice. Totodată, au fost vizualizate și prezența unor benzi de slabă intensitate pentru ampliconul probei 1323, utilizată ca probă de control.

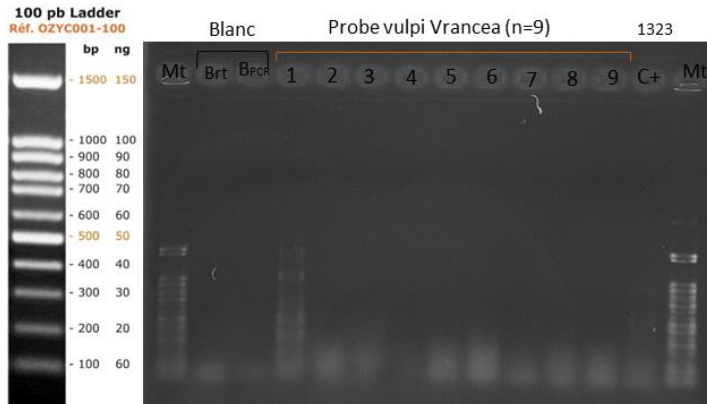


Figura 8.5 Profilul electroforetic al produșilor PCR-ORF1
Figure 8.5 The electrophoretic profile of the PCR-ORF1 products

8.2.2 Detecția ARN-ului VHE în probele de fecale recoltate de la suine

În acest studiu au fost analizate 10 probe (pools) de fecale recoltate de la suine din două ferme, în a căror proximitate au fost capturați o parte din șobolanii analizați. În urma analizei RT-nested PCR nu au fost identificate probe VHE pozitive (figura 8.6).

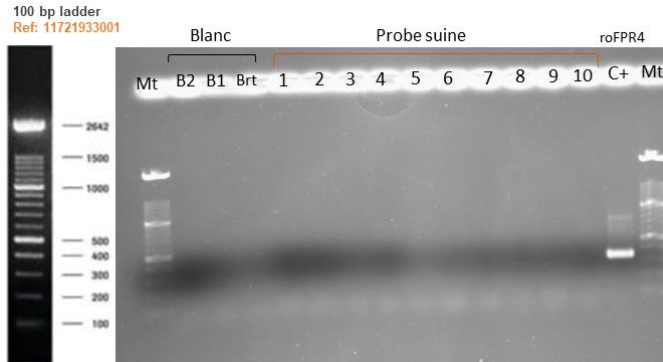


Figura 8.6 Profilul electroforetic al produșilor RT-nested PCR obținuți din probele de la suine

Figure 8.6 The electrophoretic profile of RT-nested PCR products obtained from the swine samples

8.2.3 Caracterizarea moleculară și analiza filogenetică a tulpinilor VHE izolate

În urma reacțiilor de secvențiere ale ampliconului PCR - ORF1 pentru proba VHE pozitivă de la vulpe nu au fost obținute secvențe valide. Ampliconii celor 9 probe ARN-VHE pozitive de la șobolani au putut fi secvențiați iar secvențele obținute au fost

editate manual. Prin suprapunerea secvențelor complementare pentru fiecare produs PCR s-au obținut secvențe cu lungimi diferite, de la 329 de nucleotide la 445 de nucleotide. Datele cu privire la izolatele obținute sunt prezentate în tabelul 8.8.

Tabelul 8.8/Tabele 8.8

Datele de identificare a izolatelor obținute
Identification data for the obtained isolates

Județ	Locație	Izolot
Iași	Proximitatea unei ferme de bovine	SisD
Bacău	Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem semi-intensiv	SbcS-1
		SbcS-6
Suceava	Proximitatea unei crescătorii cu mai multe specii de animale (stână)	Ssv4-1
		Ssv4-2
		Ssv4-8
Tulcea	Proximitatea unei crescătorii de suine în sistem intensiv	StIF-1
		StIF-5
		StIF-7

Procentele de similaritate nucleotidică dintre secvențele nucleotidice ale izolatelor obținute de la șobolani din județe diferite variază între 84.84% și 91.18%, valorile cele mai mari fiind înregistrate între secvența izolatului din județul Iași (SisD) și secvențele izolatelor din județul Tulcea (StIF- 1, StIF-5 și StIF-7) (tabelul 8.9). De asemenea, cea mai mare divergență genetică se observă între secvența aceluiași izolat și cele ale izolatelor din județul Bacău (SbcS-1, SbcS-6).

Tabelul 8.9/Table8.9

Procentele de similaritate nucleotidică dintre secvențele VHE obținute de la șobolani
Nucleotide similarity between the HEV sequences obtained from rats

	SisD	SbcS-1	SbcS-6	Ssv4-1	Ssv4-2	Ssv4-8	StIF-1	StIF-5	StIF-7
SisD		85.23%	84.84%	87.07%	87.73%	88.45%	91.18%	90.88%	90.57%
SbcS-1	85.23%		97.91%	88.62%	88.06%	88.02%	86.82%	86.82%	86.52%
SbcS-6	84.84%	97.91%		87.76%	87.79%	87.61%	86.13%	87.00%	87.83%
Ssv4-1	87.07%	88.62%	87.76%		98.80%	98.80%	88.62%	88.62%	88.32%
Ssv4-2	87.73%	88.06%	87.79%	98.80%		99.40%	88.65%	89.25%	88.95%
Ssv4-8	88.45%	88.02%	87.61%	98.80%	99.40%		89.05%	87.25%	86.74%
StIF-1	91.18%	86.82%	86.13%	88.62%	88.65%	89.05%		99.11%	98.81%
StIF-5	90.88%	86.82%	87.00%	88.62%	89.25%	87.25%	99.11%		99.00%
StIF-7	90.57%	86.52%	87.83%	88.32%	88.95%	86.74%	98.81%	99.00%	

În urma analizei bioinformatică, secvențele obținute au fost recunoscute ca aparținând VHE și încadrate în genotipul specific pentru tulpinile VHE de la șobolani - C1. Această analiză a arătat că identitățile nucleotidice dintre izolatele noastre și cele omoloage din baza de date GenBank au valori cuprinse între 85% și 89%, cu procente de recunoaștere și suprapunere a poziției nucleotidelor de 96% - 98%. Acestea au fost observate față de izolatele obținute de la șobolani din Germania, Danemarca și SUA (figura 8.6). Cel mai mare grad de identitate nucleotidică (89%) a fost observat între izolatele din județul Tulcea și izolatul KS12/1305 din Danemarca.

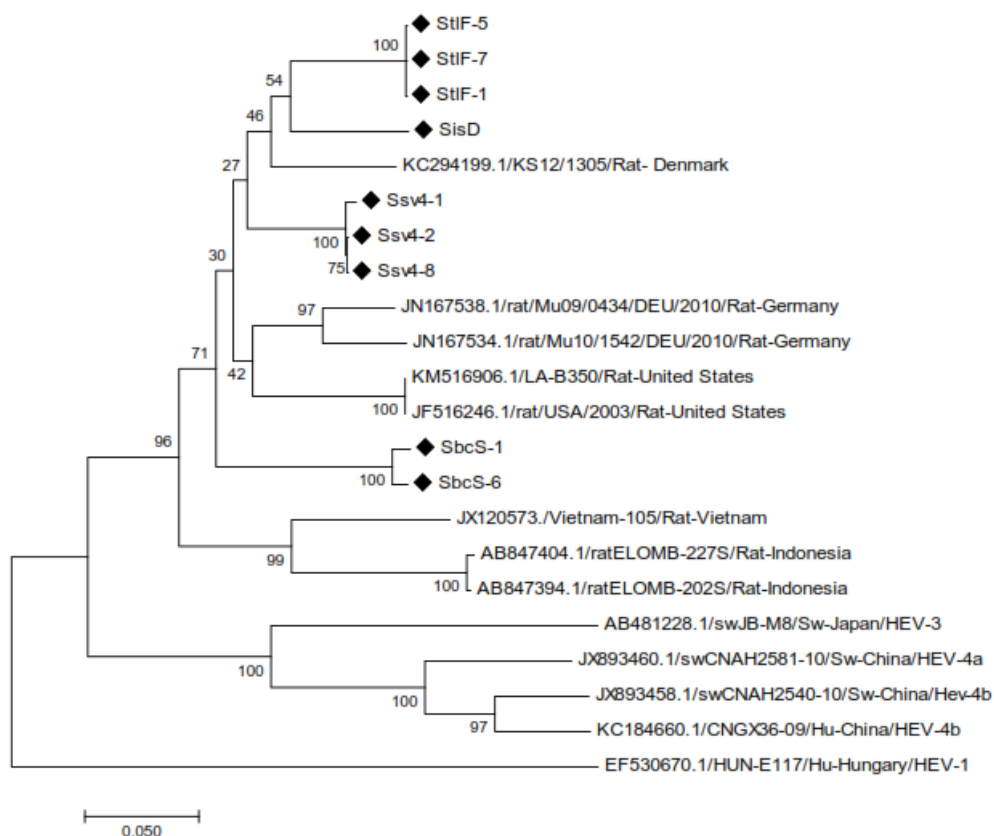


Figura 8.7 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage și de interes din baza de date GenBank (tulpinile VHE obținute de la șobolani în studiul nostru sunt evidențiate prin romburi negre)

Figure 8.7 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank (the rat HEV strains obtained in our study are highlighted through black diamonds)

Izolatul Sbc-6 a prezentat un procent de identitate de 80% cu izolatul uman CNGX36-09 din China (număr de acces în GenBank KC184660) încadrat în subtipul 4b, dar cu un procent de recunoaștere de 28%. De asemenea, analiza BLAST a arătat că acest izolat este înrudit genetic în proporții de 73% și 72% cu două izolate suine din China: izolatul swCNAH2581-10 încadrat în subtipul 4a și izolatul swCNAH2540-10 încadrat în subtipul 4b (numere de acces în GenBank JX893460 și JX893458). Procentul de recunoaștere și suprapunere a poziției nucleotidelor izolatului nostru cu cele ale izolatelor suine din China a fost de 98%.

8.3 Discuții

În acest studiu, au fost aplicate diverse metode de analiză PCR probelor recoltate de la șobolani, vulpi și de la alte specii de animale sălbatice pentru detecția ARN-ului VHE. Rezultatele obținute au arătat ca VHE a fost identificat la șobolani prin utilizarea metodei de detecție a diverse hepevirusuri. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute de Widén și colab., 2014 și Ryll și colab., 2017.

Profilul electroforetic obținut la vizualizarea ampliconilor PCR - ORF2 lipsit de prezența oricărei benzi de ADN, a arătat că niciuna din cele nouă probe de la vulpi nu este pozitivă VHE pentru segmentul de inters. Rezultatele amplificării PCR - ORF1 au arătat că una din cele nouă probe de la vulpi este pozitivă VHE pentru segmentul analizat. Cu toate acestea, prezența benzilor nespecifice de amplificare pentru această probă, dar și pentru proba de control, arată necesitatea optimizării acestui protocol. Totodată, având în vedere absența unor secvențe unitare pentru acest amplicon sunt necesare studii suplimentare pentru a reconfirma prezența VHE la vulpi în România. Studiile realizate de Bodewes și colab., 2013, au arătat că VHE circulă la vulpi în Olanda prin detecția acestor fragmente în două probe analizate. Autorii studiului au emis ipoteza existenței unor fragmentări a ARN-ului VHE în probele analizate pentru limitarea secvențierii izolatelor obținute la 454 de nucleotide. Caracterizarea tulpinilor VHE obținute a dus la încadrarea acestora în specia *Ortohepevirus C*, ca urmare a gradului de înrudire cu tulpini VHE de la șobolani [Bodewes și colab., 2013].

În acest studiu, ARN-ul VHE a fost detectat în nouă din cele 52 de probe recoltate de la șobolani. Prevalența obținută (17.30%) este, în general, similară ratelor de prevalență raportate în țările Europene de către autorii celei mai recente publicații cu privire la detecția VHE la șobolani [Ryll și colab., 2017].

Rezultatele au arătat că VHE este prezent la șobolani din fiecare județ analizat (tabelul 8.6), semnalând o distribuție geografică largă a VHE la această specie în aria de studiu. Mai mult, semnalarea prezenței ARN-ului VHE la șobolani capturați din diferite locații (tabelul 8.7), independent de numărul animalelor analizate, arată că virusul circulă la aceste specii de rozătoare din diverse habitate. Observații similare au fost făcute și în studiile realizate în Germania, în care VHE a fost detectat la șobolani capturați în toate orașele luate în studiu din nord-estul și sud-vestul Germaniei [Johne și colab., 2010, 2012]. Datele cu privire la detecția VHE, din literatura de specialitate

arată că virusul a fost semnalat la șobolani capturați în proximitatea așezărilor urbane și rurale din Germania și alte țări Europene [Ryll și colab., 2017], în proximitatea crescătorilor de suine în Japonia [Kanai și colab., 2012] și în proximitatea așezărilor urbane și rurale, dar și a ghenelor de gunoi și a fermelor de porci din China [Li și colab., 2013].

Analiza filogenetică a celor 9 tulpini VHE obținute a arătat că acestea au fost încadrate în genotipul specific VHE de la șobolan, C1, dar grupate în funcție de județele de eșantionare (figura 8.6). În Germania, analiza filogenetică a secvențelor parțiale și a întregului genom a VHE de la șobolani a demonstrat o grupare clară a tulpinilor izolate în funcție de aria geografică de eșantionare [Reimar și colab., 2012]. În Franța, procentul de omologie crescut dintre tulpinile izolate a fost corelat cu prezența VHE la șobolani capturați dintr-o singură locație [Widén și colab., 2014]. Tulpinile izolate de la șobolani din Franța sunt înrudite genetic cu tulpinile izolate de la șobolani din Germania și Danemarca și divergente față de o tulpină identificată în Vietnam [Widén și colab., 2014]. Analiza filogenetică a arătat că aceste observații sunt valabile și pentru izolatele noastre (figura 8.6).

Heterogenitatea dintre secvențele nucleotidice ale izolatelor obținute de la șobolani capturați din proximitatea fermelor de suine cu diferite sisteme de creștere, pecum și identitatea nucelotidică dintre izolatele de la șobolani din Tulcea cu izolatul SisD obținut de la un șobolan capturat în proximitatea unei ferme de vaci (90.57% - 91.18% - tabelul 8.9), sugerează că infecția cu VHE la șobolani nu este influențată de un anumit tip de habitat.

Studiul retrospectiv publicat de Doceul și colab., 2016, a arătat că tulpinile VHE încadrate în specia *Orthohepevirus C* sunt înrudite cu tulpinile VHE din cadrul celorlalte specii ale genului *Orthohepevirus* în proporții de 51.68% - 60.57% (identitate nucleotidică). Analiza bioinformatică realizată în studiul nostru, pe baza unui fragment al ORF1, arată că izolatul **Sbc-6** prezintă o identitate nucleotidică de 73% și, respectiv, de 72% cu două izolate suine din China încadrate în genotipul 4 (VHE-4). Prin urmare, rezultatele noastre generează noi date cu privire la gradul de înrudire genetică dintre speciile genului *Orthohepevirus*.

În studiul nostru, ARN-ul VHE nu a fost identificat în probele recoltate de la suine. Studiul anterior realizat de Aniță și colab., 2014, a arătat că tulpinile VHE identificate la suinele din România aparțin VHE-3. Studiul realizat de Kanai și colab., 2012, a arătat că tulpinile izolate de la șobolani capturați din proximitatea unei ferme de porci din Japonia sunt înrudite genetic cu tulpina swJB-M8 identificată la un porc din ferma respectivă, încadrată în VHE-3. Pe de altă parte, în studiul realizat de Li și colab., 2013, în China, tulpinile identificate la șobolani capturați atât în proximitatea ghenelor de gunoi, cât și în cea a fermelor de porci nu s-au dovedit a fi înrudite cu tulpinile VHE identificate la alte specii de mamifere. Detecția unei secvențe VHE-3ra într-o probă recoltată de la un șobolan din Belgia a semnalat necesitatea studiilor suplimentare pentru a evalua posibilitatea infecției de tip "spillover" a șobolanilor cu hepevirusurile patogene pentru om și impactul acestora asupra sănătății publice [Ryll

și colab., 2017]. Ținând cont de numărul redus de studii realizate în țara noastră, pentru a putea trage o concluzie reală cu privire la rolul șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE, sugestiile făcute de acești autori ar trebui să reprezinte obiectivele studiilor viitoare.

Probele obținute de la celelalte specii de animale sălbatice nu au fost identificate ARN-VHE pozitiv. Rezultatele studiului realizat de Lhomme și colab., 2015, arată că ARN-ul VHE nu a fost detectat în cele 78 de probe recoltate de la nutrie din Franța. Autorii studiului au sugerat că unul dintre posibili factori implicați în rezultatul obținut ar putea fi nespecificitatea primerilor utilizați în detecția VHE de la aceste rozătoare.

8.4 Concluzii parțiale

- Investigațiile privind detecția virusului hepatitei E la **șobolani, vulpi și alte animale sălbatice** reprezintă **prima semnalare a markerilor moleculari** ai infecției cu VHE la aceste specii **în România**.
- Cercetările noastre cu privire la detecția VHE la unele specii de animale (vulpi, dihuri sălbatici) sunt printre puținele studii realizate la nivel mondial.
- Rezultatele investigațiilor moleculare privind infecția cu virusul hepatitei E **la șobolani** au permis încadrarea tulpinilor izolate în **genotipul C1** (*specia Ortohepevirus C*), genotip cu un **potențial zoonotic redus**.
- Pentru o mai bună evaluare a rolului șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE la om, **recomandăm detecția VHE în elementele de mediu** ale habitatelor ocupate de aceste specii și abordarea de studii experimentale care să analizeze susceptibilitatea șobolanilor sălbatici la infecția cu tulpini VHE de la om.
- Rezultatele obținute prin diverse metode moleculare aplicate probelor recoltate de la animale sălbatice aduc în atenție **necesitatea dezvoltării de teste specifice** pentru identificarea VHE **în funcție de specia analizată**.

CAPITOLUL IX

CERCETĂRI PRIVIND CARACTERUL ZOONOTIC AL INFECȚIEI CU VIRUSUL HEPATITEI E PRIN EVALUAREA ACESTEIA LA POPULAȚIA DIN ESTUL ROMÂNIEI

CHAPTER IX

RESEARCH ON THE ZOONOTIC CHARACTER OF THE HEV INFECTION THROUGH ITS EVALUATION IN THE EASTERN ROMANIA'S HUMAN POPULATION

Infecția cu virusul hepatitei E (VHE) este una dintre principalele cauze ale hepatitei virale acute la nivel mondial. În Europa, infecția cu VHE nu este notificată, aceasta fiind supusă politicilor naționale de supraveghere. În ultimii 10 ani, în statele membre ale Uniunii Europene și în cele ale Spațiului Economic European (EU/SEE, cu excepția Liechtenstein) au fost raportate mai mult de 21.000 de cazuri de hepatită E acută, cu o creștere totală de 10 ori în această perioadă. Creșterea numărului de cazuri de hepatită E a fost asociată cu prezența VHE la animalele din țările respective.

Experții grupului EFSA recomandă statelor membre să crească gradul de conștientizare a riscurilor pentru sănătatea publică asociate consumului alimentelor de origine animală netratate termic [EFSA, 2017]. Din cele 30 de state din care au fost colectate aceste date, 20 dispun de sisteme de supraveghere specifice și protocoale de testare bine stabilite [Adlhoch și colab., 2016; ECDC, 2017; EFSA, 2017]. Printre cele 10 state membre, care nu au un sistem specific de supraveghere pentru infecția cu VHE, se numără și România.

În țara noastră, absența unui program de evaluare și raportare a hepatitei E face ca această boală să fie subdiagnosticată. Mai mult, importanța fiecărei surse de virus cu risc major pentru sănătatea publică din România nu este pe deplin cunoscută. La om studiile sunt limitate, fiind accesibile datele de la un număr redus de anchete seroepidemiologice. Acestea au fost întreprinse la populația din estul României și la cea din sudul și sud-estul țării. Studiile întreprinse la populația din estul României au fost realizate laolaltă cu cele de la suinele domestice din aceeași regiune. Seroprevalența anticorpilor anti-VHE la populația din această regiune variază între

5.93% și 17.14% și a fost corelată cu prezența VHE la suinele domestice [Savuța și colab., 2008; Aniță și colab., 2010; 2014; Porea și colab., 2017].

Rezultatele cercetărilor anterioare au arătat că VHE este prezent la suinele sălbatice din estul țării și că tulpinile identificate au fost frecvent izolate din cazurile autohtone de infecție cu VHE la om în țările Europene. Prin urmare, principalul scop al acestui studiu a fost cel de a identifica și caracteriza tulpinile VHE circulante la populația din estul României pentru a stabili relațiile existente între acestea și cele identificate la animale anterior, și cu alte tulpini VHE din întreaga lume disponibile în GenBank. În acest sens, au fost întreprinse o serie de investigații, realizate într-o ordine succesivă. Analiza a vizat populația cu hepatită acută de cauză necunoscută și a fost concentrată pe subiecți spitalizați în cadrul spitalului cu rol hotărâtor în patologia infecțioasă din arealul de nord-est al României < Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași >. De asemenea, au fost incluși în studiu și pacienți fără afecțiuni hepatice din diferite secții ale unui spital județean situat în arealul de est al României.

9.1 Material și metodă

9.1.1 Eșantionarea și condiționarea probelor

Pentru detecția infecției cu VHE la om, au fost prelevate probe biologice (ser, plasmă sau fecale) din 3 unități sanitare din estul României: Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași, Direcția de Sănătate Publică Iași (DSP Iași) și Direcția de Sănătate Publică Vrancea (DSP Vrancea). Probele provin de la pacienți ai Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași (n=94) și ai Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani (n=40). Probele au fost divizate în două categorii: probe eșantionate de la pacienți cu hepatită acută și probe eșantionate de la pacienți fără afecțiuni hepatice (figura 9.1).

Probele preluate din cadrul Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași au provenit de la pacienți (n=48) cu hepatită acută de cauză necunoscută (pacienți cu simptome clinice de hepatită la care au fost excluse atât cele mai frecvente cauze: virusurile hepatice, consumul de alcool și de medicamente, cât și cele mai puțin frecvente: alte infecții virale și leptospiroza. Dintre aceștia, o singură persoană a călătorit în afara țării pe durata anului în care a fost efectuată eșantionarea. Datele anamnetice au evidențiat că pacienții incluși în studiu sunt consumatori de carne de porc.

În studiu au fost incluse și probe de ser preluate de la o parte din personalul medical al spitalului (n=16), cu vârste cuprinse între 27- 46 de ani. Probele au fost preluate cu consimțământul pacienților în baza Hotărârii numărul 8/18.02.2015 eliberată de Comisia de Etică a Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași, ca urmare a cererii formulate de Centrul Universitar de Cercetări Medicale Veterinare din cadrul USAMV Iași cu privire la realizarea cercetărilor necesare din cadrul prezentei teze de doctorat.

În urma colaborării cu cele două direcții de sănătate publică, au fost preluate probe de ser testate pentru diferite infecții în cadrul laboratoarelor de serologie. Probele preluate de la Direcția de Sănătate Publică Iași (n=46) au fost eșantionate din probele analizate în cadrul laboratorului de serologie pentru infecțiile hepatice virale VHA și VHB și identificate negativ (non-A, non-B).

Probele preluate provin de la pacienți ai Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași, din perioada 2016 - 2017 (mai 2016 – martie 2017). Majoritatea probelor provin de la pacienți spitalizați în anul 2016 (40/46). Includerea în studiu a acestor probe a fost influențată de rezultatele obținute la testarea probelor de la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută, având ca scop tatonarea aspectelor evidențiate de aceste rezultate, precum și creșterea șanselor de detecție a ARN-ului VHE prin analiza unui număr mai mare de probe.

Din cadrul DSP Vrancea au fost preluate 40 de eșantioane din probele analizate în cadrul laboratorului de serologie pentru HIV și identificate negativ. Aceste probe au fost testate pentru infecția HIV în baza Programului Național de Prevenire, Supraveghere și Control al infecției HIV/SIDA (I.3), care monitorizează transmiterea virusului HIV de la mamă la făt și riscul prezenței virusului HIV la bolnavii cu tuberculoză. Probele provin de la pacienți ai Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani: secția obstetrică-ginecologie (sala de nașteri - paciente lehuze) (n=37) și secția TBC (n=3), spitalizați în prima parte a anului 2017. Acești pacienți nu au prezentat simptome caracteristice afecțiunilor hepatice.

Includerea în studiu a acestor probe a fost motivată, în primul rând, de dovada circulației VHE în județul Vrancea prin detecția infecției cu VHE la suine și mistreți [Aniță și colab., 2012; Porea și colab., 2015; Porea și colab., 2017] și de semnalarea anterioară a unor focare de infecție cu VHA în unele localități de pe raza acestui județ. La momentul preluării probelor laboratorul nu avea în analiză probe pentru detecția infecțiilor hepatice virale.

Probele au fost condiționate astfel: probele de ser la temperatura de -20°C, iar cele de plasmă și fecale la temperatura de - 80°C.

Pacienții Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași au fost divizați în funcție de categoria de vârstă și în funcție de unitatea de preluare a probelor (tabelul 9.1).

Pacienții Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani au fost divizați în funcție de secția de eșantionare și de încadrarea așezărilor umane (mediu urban și mediu rural) (tabelul 9.2). Probele preluate din cadrul secției de obstetrică-ginecologie au provenit de la paciente cu vârste cuprinse între 25 și 42 de ani. Cele trei probe preluate din cadrul secției TBC provin de la persoane cu vârsta cuprinsă între 45 și 58 de ani, 2 persoane de sex masculin și o persoană de sex feminin

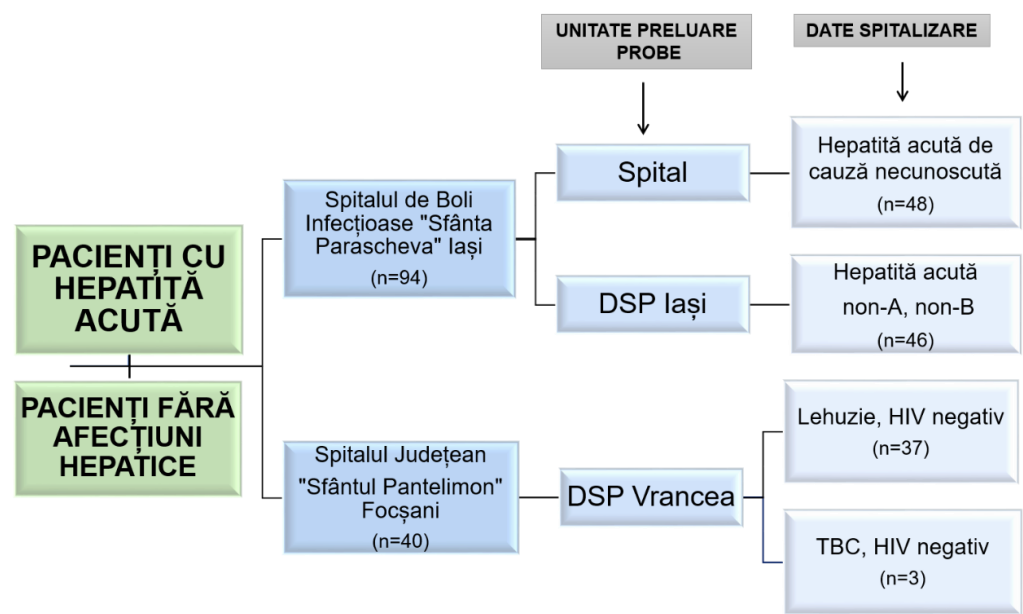


Figura 9.1 Date privind originea probelor preluate
Figure 9.1 Data of tested samples

Tabelul 9.1/Table 9.1

Distribuția pacienților analizați din cadrul Spitalului de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași, în funcție de categoria de vârstă și de unitatea de preluare a probelor

Distribution of tested patient from "Sfanta Parascheva" Infectious Diseases Hospital of Iasi, depending on the age category and the sampling unit

Categoria de vârstă	Unitate preluare probe		Total
	Spital	DSP Iași	
1- 20 ani	8	4	12
21 - 40 ani	17	16	33
41 - 60 ani	15	17	32
> 60 ani	8	9	17
Total	48	46	94

Tabelul 9.2/Table 9.2

Distribuția pacienților testați din cadrul Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani, în funcție de încadrarea așezărilor umane și de secția de spitalizare

Distribution of tested patients from Emergency County Hospital „St. Pantelimon” Focsani, depending on human settlements and the hospitalization section

Secția	Încadrarea așezărilor umane		Total
	Urban	Rural	
Secția obstetrică-ginecologie	14	23	37
Secția TBC	1	2	3
Total	15	25	40

9.1.2 Testarea serologică

Pentru identificarea anticorpilor anti-VHE în probele de ser s-au utilizat kit-urile ELISA HEV Ab și ELISA HEV IgM (Diagnostic Bioprobes, Italia). Protocolul de lucru utilizat pentru fiecare analiză s-a realizat conform instrucțiunilor furnizate de producătorul kit-urilor. Probele de ser preluate din Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași au fost testate pentru prezența anticorpilor totali (Ab), iar ulterior probele pozitive și o parte din cele negative au fost retestate pentru identificarea anticorpilor IgM anti-VHE împreună cu cele preluate din cadrul DSP Iași. Probele prelevate de la personalul spitalului au fost testate pentru detecția anticorpilor totali. Probele de ser preluate din cadrul DSP Vrancea au fost testate pentru detecția anticorpilor totali anti-VHE.

9.1.3 Amplificarea genică – RT-nested PCR

Pentru identificarea ARN-ului VHE au fost testate probele de ser identificate Ab VHE pozitive de la pacienții Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani și probele de ser, plasmă sau fecale de la pacienții Spitalului de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași cu rezultate serologice pozitive, negative sau ambigue. Astfel, au fost testate probe de la pacienții IgM pozitivi, de la pacienți Ab pozitivi și IgM negativi, de la pacienți Ab și IgM negativi și de la pacienți ale căror probe au fost identificate IgM ambigue.

Extracția ARN-ului s-a realizat prin utilizarea kit-ului QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, referință 52904), conform instrucțiunilor producătorului. Pentru detecția ARN-ului VHE s-a utilizat metoda RT-nested PCR cu ajutorul seturilor de primeri degenerați [Cooper și colab., 2005] prezentați în tabelul 7.4 (subcapitolul 7.1.5.1). Pentru desfășurarea reacțiilor au fost dezvoltate protocoale de lucru pentru fiecare etapă de amplificare RT-nested PCR, în funcție de temperatura de hibridizare a primerilor și de datele specificate de producătorul kit-ului PCR utilizat.

Revers-transcripția

Transcripția ARN-ului viral în ADNc s-a realizat cu ajutorul kitului de revers transcripție RevertAid H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, referință K 1632). Reacțiile au fost efectuate în 12 μ l volum final/reacție, prin utilizarea programului de amplificare descris în tabelul 7.5 (subcapitolul 7.1.5.1).

PCR1 și PCR 2

Cele două amplificări din cadrul metodei nested PCR s-au realizat cu primeri specifici fiecărei etape de amplificare, prin utilizarea kit-ului de reacție FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne, referință 01-01-0000S și a kit-ului dNTP Mix (Promega, referință U1515). Reacțiile s-au desfășurat în 25 μ l volum final/reacție și, respectiv, 50 μ l volum final/reacție, conform datelor prezentate în tabelele aferente celor două etape de amplificare (tabelul 9.3 și tabelul 9.4).

Tabelul 9.3/Table 9.3

PCR - 1: reactivi și program de amplificare

PCR -1: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
<u>- 2 μl ADNc</u> - 17.03 μ l H ₂ O PCR grade - 2.5 μ l Tp10X BD - 1.5 μ l MgCl ₂ (25 mM) - 0.5 μ l dNTP (50 mM) - 0.5 μ l 3156N (10 μ M) - 0.5 μ l 3157N (10 μ M) - 0.2 μ l FIREPol® DNA Polymerase	Denaturare	95°C	3'	1
	Denaturare	94°C	30"	30
	Hibridizare	52°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Denaturare	94°C	30"	10
	Hibridizare	40°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Elongație	72°C	10'	1
	Final	4°C	∞	

Tabelul 9.4/Table 9.4

PCR - 2: reactivi și program de amplificare

PCR -2: reagents and amplification program

Reactivi/reacție	Programul de amplificare PCR			
	Etapă	Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
<u>- 5 μl produs PCR -1</u> - 33.8 μ l H ₂ O PCR grade - 5 μ l Tp10X BD - 3 μ l MgCl ₂ (25 mM) - 1 μ l dNTP (50 mM) - 1 μ l 3158N (10 μ M) - 1 μ l 3157N (10 μ M) - 0.2 μ l FIREPol® DNA Polymerase	Denaturare	95°C	3'	1
	Denaturare	94°C	30"	35
	Hibridizare	52°C	30"	
	Elongație	72°C	30"	
	Elongație	72°C	10'	1
	Final	4°C	∞	

Analiza produșilor de amplificare prin electroforeză în gel de agaroză

Analiza produșilor de amplificare s-a realizat conform metodei descrise în secțiunea specifică din subcapitolul 7.1.5.1.

9.1.4. Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică

Secvențierea ampliconilor pozitivi a fost realizată de către BASECLEAR (Olanda), prin utilizarea metodei enzimatică Sanger. Secvențierea produșilor PCR a fost realizată pentru fiecare catenă, prin utilizarea primerilor interni: 3158 și 3159. Analiza bioinformatică și cea filogenetică a secvențelor obținute s-a realizat conform metodelor descrise anterior în subcapitolul 7.1.5.3 și, respectiv, în subcapitolul 7.1.5.5

9.1.5. Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul site-ului web Social Science Statistics (<http://www.socscistatistics.com>), prin utilizarea testului Fisher exact. Alegerea acestui test a fost condiționată de numărul redus de probe și implicit de valoare frecvențelor teoretice, care au fost mai mici decât 5. Aceste asocieri sunt considerate semnificative când valorile lui p (p-value) sunt mai mici decât nivelul de semnificație ales (0.01; 0.05 sau 0.10). Au fost considerat statistic semnificative situațiile în care valorile lui p au fost mai mici decât 0.10 (p-value <0.10). Calcularea valorilor intervalului de încredere (confidență) de 95% a fost efectuată cu ajutorul programului Excel în care a fost predefinită formula de calcul.

9.2 Rezultate

9.2.1 Rezultatele testărilor serologice

Rezultatele analizei serologice a probelor provenite de la personalul medical al Spitalului de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași

În urma analizei serologice efectuate, probele preluate de la personalul spitalului (n=16) au fost identificate Ab VHE negativ.

Rezultatele analizei serologice a probelor provenite de la pacienți cu hepatită acută

Anticorpi totali anti-VHE (Ab VHE) au fost detectați în 14 din cele 48 de probe analizate de la pacienți cu hepatită acută de cauză necunoscută, înregistrându-se o seroprevalență generală de 29.16% (95% IC, 16.31 - 42.03) (tabelul 9.5). Seroprevalența detectată a variat în funcție de categoria de vârstă (figura 9.2), diferențe semnificative fiind observate între primele două categorii și ultima categorie (p = 0.06 și, respectiv, p = 0.08).

Tabelul 9.5/Table 9.5

Seroprevalența anticorpilor totali anti-VHE la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută, în funcție de categoria de vârstă

Seroprevalence of total anti-HEV antibodies in patients with acute hepatitis of unknown cause, by age group

Categoria de vârstă	Seroprevalență	Intervalul de confidență (95%)
1 - 20 ani	12.5% (1/8)	-10.42 - 35.42
21 - 40 ani	23.5% (4/17)	3.37 - 43.69
41 - 60 ani	26.7% (4/15)	4.29 - 49.05
> 60 ani	62.5% (5/8)	28.95 - 96.05
Total	29.2% (14/48)	16.31 - 42.03

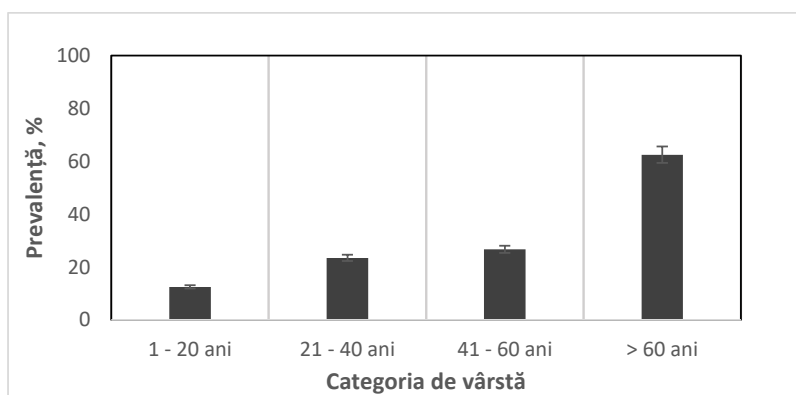


Figura 9.2 Asocierea dintre infecția VHE semnalată și categoria de vârstă

Figure 9.2 HEV infection associated with age category

Din cele 48 de probe de ser testate pentru detecția anticorpilor totali, 44 au fost retestate pentru detecția anticorpilor IgM. Anticorpi IgM anti-VHE au fost detectați în 4 din cele 14 probe Ab pozitive. Dintre acestea, o probă provine de la un pacient din categoria de vârstă 41 - 60 și 3 probe de la pacienți din categoria de vârstă mai mare de 60 de ani (tabelul 9.7). Pentru una din probele Ab negative a fost obținut un rezultat IgM ambiguu ($S/Co = 1.19$).

Din cele 46 de probe preluate din cadrul DSP Iași, 5 probe au fost IgM pozitive (10.86%) iar pentru două probe au fost obținute rezultate ambigue ($S/Co = 1.19$ și, $S/Co =$ respectiv, 1.17) (figura 9.4). Probele IgM pozitive provin de la doi pacienți din prima categorie de vârstă și de la câte un pacient din celelalte 3 categorii de vârstă (tabelul 9.7).

Prin urmare, 9 din cei 90 de pacienți cu hepatită acută testați au fost IgM anti-VHE pozitivi. Pentru două din cele 9 probe identificate IgM pozitive (figura 9.3) valoarea cut-off a densității optice a înregistrat valori mai mari de 10 ori ($S/Co = 12.6$ și, respectiv, 13.4) decât valoarea minimă de referință ($S/Co = 1.2$).

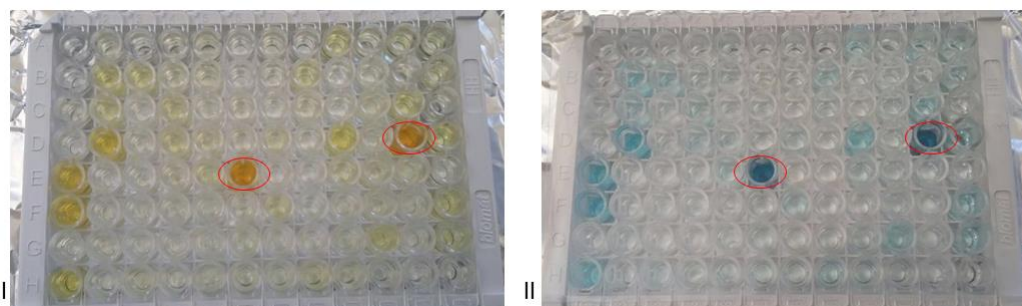


Figura 9.3 Identificarea probelor IgM anti-VHE cu rezultate intens pozitive în diferite etape de lucru ale testării ELISA

(I - după adăugarea substratului cromogen, II – după adăugarea soluției stop)

Figure 9.3 Identification of IgM anti-VHE intense positive samples in different stages of the ELISA testing

(I - after chromogenic substrate addition, II - after stop solution addition)

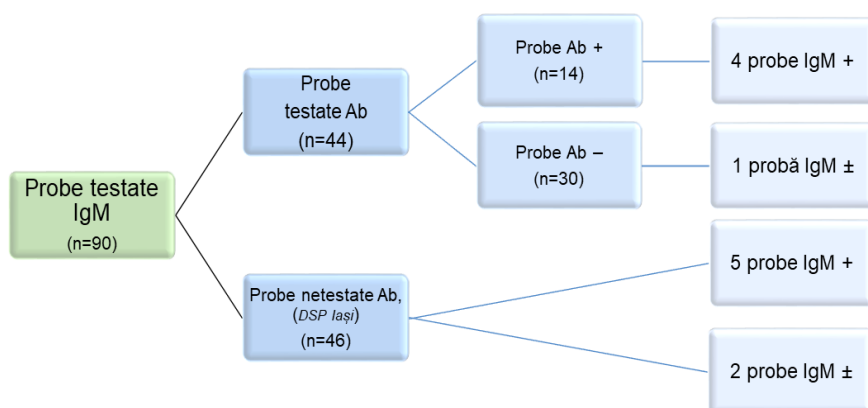


Figura 9.4 Date privind probele testate pentru detecția anticorpilor IgM anti-VHE și rezultatele obținute

Figure 9.4 Data on tested samples for IgM anti-HEV antibodies and obtained results

Rezultatele analizei serologice a probelor provenite de la pacienți fără afecțiuni hepatice (spital Vrancea)

Screening-ul serologic al probelor preluate din cadrul DSP Vrancea a arătat că 13 probe au fost Ab VHE pozitive (32.5%; 95% IC, 17.98 - 47.02). Probele Ab VHE pozitive provin de la persoane dispersate pe toată suprafața județului atât din mediul rural, cât și urban (tabelul 9.6). Nu au fost evidențiate diferențe semnificative între ratele de seroprevalență asociate cu încadrarea așezărilor umane ($p = 0.7$). Prezența anticorpilor anti-VHE a fost detectată în toate cele trei probe provenite de la pacienții

secției TBC și în 10 din cele 37 de probe de la pacientele secției obstetrică-ginecologie (27.02%).

Tabelul 9.6/Table 9.6

Prevalența anticorpilor totali anti-VHE la pacienții fără afecțiuni hepatice, în funcție de încadrarea așezărilor umane

Seroprevalence of total anti-HEV antibodies in patients without liver disease, depending on human settlements

Încadrarea așezărilor umane	Seroprevalența Ab anti-VHE	Intervalul de confidență (95%)
Urban	26.66% (4/15)	4.29 - 49.05
Rural	36% (9/25)	17.18 - 54.82
Total	32.5% (13/40)	17.98 - 47.02

9.2.2 Detecția ARN-ului VHE în probele analizate

Detecția ARN-ului VHE în probele provenite de la pacienți cu hepatită acută

Pentru identificarea ARN-ului VHE au fost incluse în analiză probe de la 16 pacienți, din care: 4 pacienți Ab pozitivi și IgM pozitivi, 5 pacienți IgM pozitivi, 2 pacienți Ab pozitivi, dar IgM negativi; 1 pacient Ab negativ, dar reactiv IgM ambiguu, 2 pacienți reactivi IgM ambiguu și 2 pacienți Ab negativi. Au fost testate diferite tipuri de probe, în funcție de disponibilitatea acestora. ARN-ul VHE a fost detectat la doi pacienți din cei 16 analizați. Identificarea ARN-ului VHE la acești pacienți coincide cu rezultatele analizei serologice de detecție a anticorpilor IgM, care a evidențiat un rezultat intens pozitiv.

La primul pacient, ARN-ul viral a fost detectat în proba de plasmă, dar nu și în cea de fecale. Pentru celălalt pacient, ARN-ul viral a fost detectat în proba de ser, nefiind disponibile spre analiză alte tipuri de probe. Cei doi pacienți identificați ARN VHE pozitivi aparțin grupei de vârstă 41 - 60 ani (tabelul 9.7) și au fost spitalizați în anul 2016. Pacientul a cărui probe au fost preluate direct din spital a fost contactat de către medicul curant cu scopul de a afla originea cărnii consumate și modul de preparare. Datele furnizate au arătat că aceasta a fost aprovizionată din galantarul unui magazin, dar nu a fost obținut un răspuns concret asupra modului de preparare. Pacientul provine din mediul urban și nu deține animale.



Figura 9.5 Profilul electroforetic al unor produși RT-nested PCR

Figure 9.5 Electrophoretic profile of some RT-nested PCR products

Tabelul 9.7/Table 9.7

Date privind probele testate și identificarea celor ARN VHE pozitive

Data on tested samples and identification of positive HEV RNA samples

Nr. pacient analizat	Categoria de vârstă	Rezultate serologice	Tipul de probă analizată	Rezultate PCR
Pacient 1	> 60 ani	Ab + IgM +	ser	negativ
			fecale	negativ
Pacient 2	41 - 60 ani	Ab + IgM +	plasmă	pozitiv
			fecale	negativ
Pacient 3	> 60 ani	Ab + IgM +	ser	negativ
Pacient 4	> 60 ani	Ab + IgM +	ser	negativ
Pacient 5	1 - 20 ani	IgM +	ser	negativ
Pacient 6	1 - 20 ani	IgM +	ser	negativ
Pacient 7	21 - 40 ani	IgM +	ser	negativ
Pacient 8	41 - 60 ani	IgM +	ser	pozitiv
Pacient 9	> 60 ani	IgM +	ser	negativ
Pacient 10	1 - 20 ani	Ab + IgM -	plasmă	negativ
Pacient 11	41 - 60 ani	Ab + IgM -	plasmă	negativ
Pacient 12	41 - 60 ani	Ab - IgM ±	ser	negativ
Pacient 13	21 - 40 ani	IgM ±	ser	negativ
Pacient 14	21 - 40 ani	IgM ±	ser	negativ
Pacient 15	1 - 20 ani	Ab -	ser	negativ
Pacient 16	> 60 ani	Ab -	plasmă	negativ

Detecția ARN-ului VHE în probele provenite de la pacienți fără afecțiuni hepatice

În urma analizei RT-nested PCR, cele 13 probe de ser Ab pozitive au fost identificate ca fiind ARN-VHE negative.

9.2.3 Caracterizarea moleculară și analiza filogenetică a tulpinilor VHE izolate

Cei 2 produși RT-nested PCR au putut fi secvențiați. Fiecare secvență a fost editată manual, iar prin suprapunerea celor complementare, pentru fiecare produs, au fost obținute o secvență de 333 nt pentru primul izolat (pacient 2) și o secvență de 332 nt pentru cel de-al doilea izolat (pacient 8). Izolatele obținute au fost denumite **HuRO-3.30** (333 nt) și, respectiv, **HuRO-11.29** (332 nt).

Analiza bioinformatică a izolatelor obținute a arătat că acestea aparțin VHE, genotipul 3. Pe baza gradului de identitate nucleotidică cu secvențele VHE existente în GenBank, izolatele obținute au fost încadrate în subtipul 3c (grupul monofiletic 3chi) (figura 9.6).

Analiza BLAST a arătat că procentele de identitate nucleotidică dintre izolatele noastre și cele ale izolatelor omoloage, grupate în subtipul 3c, din baza de date GenBank, au valori cuprinse între 95% - 98%. De asemenea, analiza BLAST a arătat că izolatele noastre sunt înrudite cu cele circulante în Europa, atât la om, cât și la animale. Procentul de identitate nucleotidică dintre cele două izolate este de 92%.

Izolatul **HuRO-3.30** a prezentat un procent maxim de identitate nucleotidică de 98% cu izolatul uman NL_Donor_31 din Olanda (număr de acces în GenBank [KR362784](#)). Procentul maxim de identitate nucleotidică (97%) dintre acest izolat (HuRO-3.30) și izolatele 3c din GenBank a fost observat față de izolatul de la mistreț WB/P6-15/ITA (număr de acces în GenBank, [KU508285](#)) din Italia și față de izolatul suin HEV_16_19 din Olanda (număr de acces în GenBank [KY781997](#)). De asemenea, acest izolat prezintă o identitate nucleotidică de 96% cu izolatul caprin HEV/Goat/PB29/ITA din Italia (număr de acces în GenBank [KX470598](#)) și cu izolatele umane RIVM-HEV16-0342 și RIVM-HEV15-1439 din Olanda (numere de acces în GenBank [KY775030](#) și, respectiv, [KY775001](#)). O identitate nucleotidică de 95%, dar cu un procent de recunoaștere de 85%, a fost observată față de izolatul Sew_R_2_8 din canalizare din Anglia (număr de acces în GenBank, [KT230727](#)).

Izolatul **HuRO-11.29** a prezentat un procent maxim de identitate nucleotidică de 98% cu izolatele umane NL_Patient_79 și RIVM-HEV15-1557 din Olanda (numere de acces în GenBank [KR362823](#) și, respectiv, [KY775005](#)), dar și cu alte izolate umane din această țară. Acest izolat a prezentat un procent de identitate nucleotidică de 97% cu izolatul din gunoiul de grajd, HEV_porcine manure_04, din Olanda (număr de acces în GenBank [MF185108](#)) și de 96% cu două izolate de la mistreți: WB/HEV/Ter12 din Italia (număr de acces în GenBank [KX549306](#)) și wbGER27 din Germania (număr de acces în GenBank [FJ705359](#)), acesta din urmă reprezentând secvența de referință pentru subtipul 3c [Smith și colab., 2016].

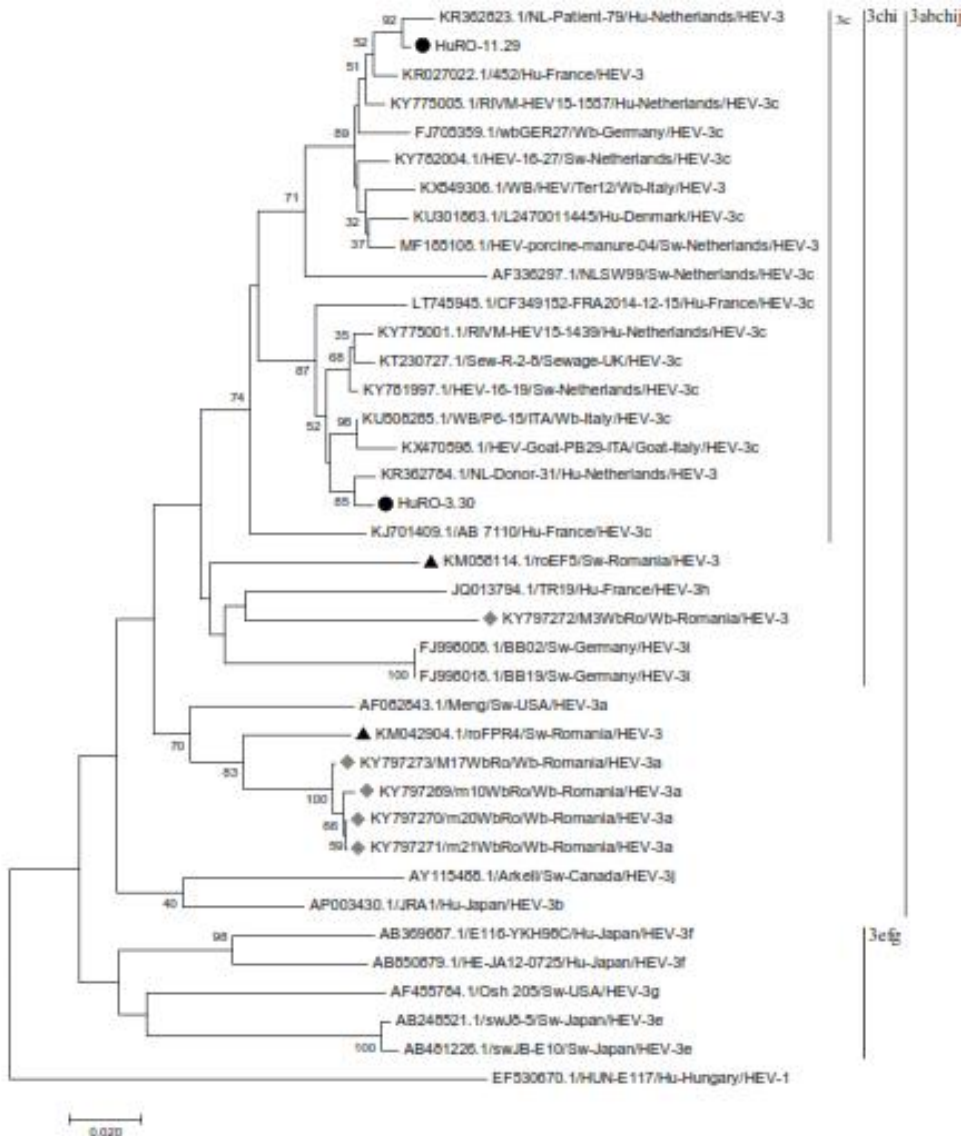


Figura 9.6 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage și de referință pentru fiecare subtip din baza de date GenBank (tulpinile VHE obținute de la om în acest studiu sunt evidențiate prin buline negre, romburile gri indică tulpinile VHE izolate de la mistreți, iar triunghiurile negre tulpinile VHE izolate anterior de la suine)

Figure 9.6 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank and with the reference strains of each HEV3 subtype (the human HEV strains obtained in our study are highlighted by black bulleted; the gray diamonds indicated the wild boar HEV stains; the black triangles indicated the swine HEV strains previously characterized in eastern Romania)

9.3 Discuții

Conform datelor publicate de organizațiile Europene cu rol major în asigurarea stării de sănătate - ECDC și EFSA, infecția cu VHE este endemică în Europa, în ultimii 10 ani aceasta având un trend ascendent. În România, studiile anterioare au arătat că infecția cu VHE este prezentă la populația din estul României, prin ratele de seroprevalență raportate [Savuța și colab., 2008; Aniță și colab., 2010, 2014].

În acest studiu, în scopul identificării și caracterizării tulpinilor VHE circulante, au fost întreprinse o serie de investigații la persoane spitalizate cu sau fără afecțiuni hepatice, precum și la personal medical expus profesional infecțiilor cu virusurile hepatice. Rezultatele analizei preliminare de detecție a anticorpilor Ab anti-VHE la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută, prin eșantionarea probelor din cadrul spitalului (Iași), au arătat că infecția cu VHE ar fi fost cauza afecțiunii hepatice la 29.2% (14/48) din persoanele analizate (tabelul 9.5). Ulterior, analiza serologică de detecție a anticorpilor IgM anti-VHE la o parte din acești pacienți (44/48) și la cei incluși în studiu (n=46), prin eșantionarea probelor de la DSP Iași, a arătat că 10% (9/90) din persoanele analizate au prezentat o infecție acută cu VHE la momentul spitalizării.

În contextul realizării acestui studiu, prin analiza pacienților cu hepatită acută de cauză necunoscută sau la care au fost excluse infecțiile hepatice virale VHA și VHB, rezultatele obținute arată necesitatea implementării unui program național de prevenire, supraveghere și control al hepatitei E în România. Lipsa unui astfel de program face ca infecția cu VHE să fie subdiagnosticată și îngreunează activitatea medicului clinician în stabilirea cauzei afecțiunii hepatice.

Rezultatele studiului anterior cu privire la detecția anticorpilor IgG anti-VHE la pacienți cu hepatită de tip B sau C din estul României au arătat că infecția cu VHE a fost prezentă la 12% (3/25) din persoanele analizate [Aniță și colab., 2010]. Coroborarea acestor rezultate arată că infecția cu VHE poate fi cauza virală a hepatitei acute sau poate coexista cu alte infecții hepatice virale. Infecția cu VHE poate coexista, de asemenea, cu cea HIV în care diferite simptome clinice pot fi observate, de la o hepatită asimptomatică sau acută până la insuficiență hepatică [Debes și colab., 2016]. Rezultatele studiului nostru arată că infecția cu VHE poate coexista cu cea din TBC, în lipsa oricărei simptomatologii hepatice.

Rezultatele analizei serologice de detecție a anticorpilor totali anti-VHE la femeile lehuze arată că infecția cu VHE a fost prezentă la 10 din 37 de paciente luate în studiu. În țările în curs de dezvoltare, infecțiile cu VHE-1 și VHE-2, genotipuri strict patogene pentru om, sunt endemice, iar infecția cu VHE la femeile însărcinate poate duce la o mortalitate ridicată (21%), mai ales dacă aceasta are loc în al 3-lea trimestru de sarcină [Jin și colab., 2016]. În Europa, cel mai frecvent genotip raportat este VHE-3, iar prezența infecției la femeile însărcinate nu este asociată cu o boală gravă [Anty și colab., 2014, EFSA 2017]. Chiar dacă în studiul nostru ARN-ul VHE nu a fost identificat la acești pacienți, în baza datelor extrase din literatura de specialitate putem suspecta că VHE-3 este agentul etiologic al acestor infecții. Mai mult, rezultatele

studiilor anterioare au arătat prezența infecției cu VHE-3 la suinele domestice și sălbatice din județul Vrancea [Aniță și colab., 2012; Porea și colab., 2015; Porea și colab., 2017].

Motivul rezultatelor ARN-VHE negative la acești pacienți nu este cunoscut. Testarea probelor relativ imediat după eșantionaj exclude eventuala degradare a ARN-ului viral. Lipsa retestării acestor pacienți pentru detecția anticorpilor IgM anti-VHE și a limitării detecției ARN-ului la un singur tip de probă (ser) nu ne permite emiterea unei concluzii certe privind dinamica infecției cu VHE. Totuși, prevalența relativ scăzută a IgM anti-VHE sau lipsa de detecție a ARN-ului VHE la femeile însărcinate pare să fie comună mai multor studii [Thoden și colab., 2008; Buti și colab., 2010; Lindemann și colab., 2010]. De asemenea, în studiul realizat de Renou și colab., 2014, probele recoltate postpartum de la o parte din femeile analizate pentru prezența infecției cu VHE pe perioada sarcinii au fost IgG și IgM negative.

În Europa, ratele de seroprevalență raportate diferă de la o țară la altă și în cadrul aceleiași țări de la un studiu la altul. Meta-analiza realizată de Hartl și colab., 2016, a arătat că aceste diferențe se datorează testului folosit, regiunii geografice și grupului analizat, acești factori limitând comparabilitatea ratelor de seroprevalență între studii. Cu toate acestea, analiza datelor existente a arătat că rata de seroprevalență este mai mare la persoanele expuse animalelor și crește odată cu vârsta [Hartl și colab., 2016]. Rezultatele studiului nostru sunt în linie cu cele raportate în literatura de specialitate, cea mai mare seroprevalență fiind înregistrată la persoanele cu vârsta mai mare de 60 de ani (figura 9.2, tabelul 9.5).

Ratele de seroprevalență a anticorpilor totali la pacienții analizați din cele două categorii, pacienți cu hepatită acută și pacienți fără afecțiuni hepatice, nu au variat considerabil (29.2% vs 32.5%). Unele studii au arătat că rata de seroprevalență identificată la donatorii de sânge este mai mare decât cea raportată de centrele naționale la pacienții cu hepatită acută. În Franța, s-a sugerat că discrepanța dintre ratele de seroprevalență observate între aceste două categorii ar putea fi asociată cu numărul crescut de cazuri asimptomatice de infecție cu VHE [Guillois și colab., 2016]. Nu au fost înregistrate diferențe semnificative ale ratelor de seropozitivitate în funcție de încadrarea așezărilor umane, aceste rezultate fiind în linie cu cele raportate în literatura de specialitate [Oncu și colab., 2006; Renou și colab., 2014].

Rezultatele obținute au arătat că personalul medical analizat a fost identificat Ab VHE negativ. Rezultatele studiului anterior realizat de Voiculescu și colab., 2010, la populația umană din sudul și sud-estul României au arătat că infecția cu VHE a fost prezentă la personalul medical analizat printr-o seroprevalență a anticorpilor IgG anti-VHE de 13.98% (13/98). Este cunoscut că principala cale de transmitere a infecției cu VHE este cea fecal-orală, transmiterea secundară prin contactul direct cu o persoană infectată nefiind raportată, nici măcar în context de focar [Hakim și colab., 2017]. Prin urmare, rezultatele studiului nostru par să fie în linie cu cele raportate în literatura de specialitate și sugerează alte modalități de contractare a infecției cu VHE decât

contactul direct cu persoane infectate a personalului medical identificat IgG VHE pozitiv în studiul anterior.

Analiza moleculară a arătat că doi pacienți, din cei 9 IgM pozitivi, au fost ARN-VHE pozitivi. Suprapunerea rezultatelor analizei serologice cu cele ale analizei moleculare arată că aceștia prezentau o infecție recentă la momentul spitalizării. Datele cunoscute pentru pacientul ale cărui probe au fost preluate direct din spital, arată că acesta a consumat carne de porc aprovizionată din galantarul unui magazin. De asemenea, toți pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută analizați sunt consumatori de carne de porc. În Europa, cazurile simptomatice de hepatita E sunt asociate consumului de carne de porc. Cu toate acestea, numărul cazurilor direct legate de consumul alimentelor contaminate a rămas limitat, majoritatea dovezilor fiind bazate pe gradul de înrudire dintre secvențele izolate de la om cu cele izolate de la porci, mistreți și cerbi sau cu cele izolate din produsele de consum provenite de la aceste animale, disponibile în GenBank [EFSA, 2017]. Studiul nostru a avut la bază același principiu, caracterizarea tulpinilor VHE izolate de la om cu scopul de a evalua relațiile existente între acestea și tulpinile identificate anterior la porci și mistreți în estul României și cu alte tulpini VHE disponibile în băncile de date internaționale (GenBank).

Caracterizarea celor două tulpini izolate a arătat că acestea aparțin VHE-3, subtipul 3c. Acesta este cel mai frecvent subtip identificat în Europa, în ultimii ani numărul raportărilor având un trend ascendent în țări precum Olanda, Anglia, Franța, Spania și Italia [EFSA, 2017]. Analiza filogenetică a arătat că izolatele noastre se înrudesc genetic cu tulpinile VHE izolate de la om, porci și mistreți din Olanda, Italia și Germania, dar și cu izolate din gunoiul de grajd de la suine din Olanda sau din apa de canalizare din Anglia. De asemenea, analiza filogenetică a arătat că cea mai mare identitate nucleotidică a fost observată față de izolatele de la om și suine din Olanda. Pentru înlocuirea subtipurilor predominante, VHE-3e, f, g, cu subtipul VHE-3c la om în Anglia, s-a sugerat o asociere cu importurilor de carne de porc din alte țări UE în care acest subtip este prevalent, de exemplu Olanda [EFSA, 2017]. Importurile de carne de porc au crescut considerabil în România, în prima jumătate a anului 2016 fiind importante 83.4 mii de tone, în aceeași perioadă a anului precedent cantitatea importată fiind de 74.6 mii de tone. Printre principalele țări furnizoare, se numără Germania, Spania, Ungaria, Olanda, Italia, Danemarca și Franța [MADR, 2016]. În urma acestor constatări, putem suspiciiona o posibilă asociere a infecțiilor detectate cu consumul cărnii sau a produselor derivate din carnea de porc importată. Dacă această prezumție se adevărește, putem discuta despre o infecție endemică cu VHE-3c în Europa. Pentru a confirma aceste ipoteze, studiile viitoare ar trebui să cuprindă testări ale tuturor elementelor implicate în producția de alimente, de la sursele de apă utilizate pentru adăparea animalelor până la produsul alimentar finit consumat de populație, "de la furcă la furculiță".

Pe de altă parte, studiile anterioare au arătat că diverse subtipuri de VHE-3 circulă la mistreți în estul țării și că tulpinile izolate sunt înrudite cu cele izolate din cazurile autohtone de infecție cu VHE la om în Europa [Porea și colab., 2017]. Analiza

filogenetică a arătat că tulpinile izolate în acest studiu sunt încadrate în grupul monofiletic "3chi", împreună cu tulpini identificate anterior la mistreț și porc, iar tulpinile de la mistreți încadrate în subtipul VHE-3a s-au dovedit a fi înrudite genetic cu o tulpină izolată de la suine [Aniță și colab., 2014; Porea și colab., 2017]. În unele studii au fost identificate mai mult de două subtipuri VHE la specia analizată. De exemplu, în Germania și Italia a fost identificate diverse subtipuri la mistreții analizați în cadrul unui singur studiu [Adlhoch și colab., 2009; Schielke și colab., 2009; Vina-Rodriguez și colab., 2015; Mazzei și colab., 2015]. În Anglia, tulpinile VHE-3 izolate de la om au fost grupate în două clade diferite, 1 (subtipurile 3e și 3f) și 2 (subtipurile 3c, 3h și 3i), autorii studiului demonstrând prezența unor infecții indigene [Ijaz și colab., 2014]. În baza acestor remarci, putem supiciona că diverse subtipuri ale VHE circulă în populația umană și la animalele din estul României. Pentru a confirma și această ipoteză, studii viitoare trebuie întreprinse, care să cuprindă un număr mare de probe analizate și care să asigure o dovadă directă a infecției zoonotice cu VHE.

9.4. Concluzii parțiale

- Din informațiile raportate până în prezent în România, acesta este **primul studiu** care confirmă, utilizând metode serologice și de biologie moleculară, cazuri de **hepatită E acută la om în țara noastră**.
- În cadrul investigațiilor noastre au fost semnalate atât **forme clinice** acute cât și asimptomatice de hepatită E **la om**, datele obținute fiind **asemănătoare** celor descrise și în **alte țări europene**.
- Rezultatele obținute privind infecția cu VHE la om, sugerează **necesitatea implementării unui program național** de prevenire, supraveghere și control a hepatitei E în România.
- Rezultatele obținute în urma caracterizării celor **două tulpini** VHE izolate **de la om** au arătat că acestea aparțin **VHE-3c**, cel mai prevalent subtip identificat în Europa.
- Investigațiile efectuate de către noi în vederea detecției VHE la om și rezultatele obținute reprezintă **premisele unor studii mai complexe** care să explice dinamica infecției cu virusul hepatitei E în România, prin implicarea de specialiști din domenii diferite sub egida noului concept medical global "O singură sănătate" ("One Health").

CAPITOLUL X

CONCLUZII FINALE

Analiza generală a rezultatelor obținute în urma cercetărilor efectuate cu privire la infecția cu VHE la animalele sălbatice și la populația umană în zona de est a României a condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Cercetările efectuate au evaluat rolul de **rezervor de VHE** și potențialul **risc zoonotic** al unor specii de animale sălbatice (mistreți, cervide, iepuri, șobolani, dihuri și vulpi) din regiunea de est a României.
2. Rezultatele cercetărilor realizate au adus **noi date privind dinamica infecției** cu virusul hepatitei E în populațiile susceptibile (umană și animală) din România.
3. Semnalarea infecției cu VHE (serologic și/sau molecular) **la mistreți** în 6 județe din cele 7 luate în studiu și prevalența ARN-ului VHE detectată (18%) relevă o **circulație crescută** a VHE în cadrul acestei specii.
4. Coroborarea rezultatelor noastre cu cele obținute în studii anterioare, atrage atenția asupra **caracterului persistent** și, totodată, **a tendinței de propagare** a infecției cu VHE la populația de **mistreți** din estul României.
5. Încadrarea filogenetică a celor **5 tulpini de VHE** izolate de către noi de la **mistreți** în subtipurile frecvent izolate din cazurile de infecție autohtonă cu VHE în țări din Europa (3a și 3h) și **gradul de înrudire** dintre acestea și o tulpină VHE identificată anterior la suine în aceeași zonă de studiu, sugerează că prezența infecției cu VHE la mistreți poate reprezenta un **factor de risc** pentru **sănătatea publică** din România.
6. Investigațiile cu privire la infecția cu VHE la **cervide și iepuri** s-au soldat cu **rezultate negative**. Aceste rezultate nu exclud posibilitatea circulației VHE în populația de cervide și iepuri din estul României, prezentul studiu fiind realizat pe un eșantion relativ redus
7. Coroborarea rezultatelor cercetărilor noastre referitoare la detecția VHE **la cervide** cu cele din literatura de specialitate, a dus la enunțarea unor **posibili factori** care ar putea fi implicați în dinamica infecției cu VHE la această specie:

- selectivitatea acestora în alegerea surselor de hrană și apă precum și particularitățile anatomice (lipsa vezicii biliare).
8. Implicarea factorilor enunțați reprezintă obiective pentru noi cercetări, care pot contribui atât la evaluarea rolului acestor animale în ciclul epidemiologic al infecției cu VHE, cât și la îmbunătățirea datelor referitoare la patogeneză.
 9. Rezultatele investigațiilor moleculare privind infecția cu virusul hepatitei E la **șobolani** au relevat încadrarea celor **9 tulpini** izolate în **genotipul C1** (specia *Orthohepevirus C*), genotip cu un **potențial zoonotic suspectat**.
 10. Analiza bioinformatică a tulpinilor VHE izolate de la **șobolani** a adus noi date cu privire la gradul de înrudire genetică dintre speciile genului *Orthohepevirus*, prin **identitatea nucleotidică** semnalată față de izolate **VHE-4 de la om și suine în China**.
 11. Rezultatele obținute în urma aplicării diverselor metode moleculare pentru analiza probelor recoltate de la animale sălbatice aduc în **atenție necesitatea dezvoltării de teste specifice** privind identificarea VHE în funcție de specia analizată.
 12. Elaborarea celor **două protocoale** de detecție moleculară a VHE la vulpi și analizele efectuate au avut ca rezultat identificarea **unei probe pozitive** din 9 testate (11.11%).
 13. Analizele moleculare de **detecție a VHE la animalele sălbatice** sunt **o noutate pentru România**, rezultatele obținute oferind date importante privind dinamica infecției cu VHE în populațiile studiate.
 14. Caracterul de **noutate** al acestei lucrări este subliniat de semnalarea cazurilor de **hepatită E acută** precum și de **detecția VHE** și caracterizarea tulpinilor izolate de la **populația umană** din țara noastră.
 15. Includerea în studiu și testarea pacienților cu hepatită acută de cauză necunoscută au condus la estimarea unei **prevalențe** a infecției cu VHE de **29.2%** (14/48) dintre persoanele analizate.
 16. Identificarea infecției cu VHE atât la pacienții cu hepatită acută, cât și la cei fără afecțiuni hepatice, corespunde literaturii de specialitate și sugerează **necesitatea implementării unui program național** de prevenire, supraveghere și control a hepatitei E în România.
 17. Caracterizarea celor **două tulpini de VHE izolate de la om** relevă apartenența lor la **subtipul 3c**, fiind înrudite genetic cu tulpini VHE izolate de la animale și de la om în Europa.
 18. Raportarea rezultatelor obținute privind încadrarea **tulpinilor VHE izolate de la om**, la datele specificate de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA), sugerează că infecția semnalată ar putea fi asociată cu **importurile de carne de porc** din țări ale UE.
 19. Analiza comparativă a rezultatelor investigațiilor moleculare privind **detecția VHE la animale și om** în regiunea de est a României cu cele existente în literatura de specialitate, susține și **ipoteza unor infecții autohtone**.

20. Investigațiile efectuate în vederea detecției VHE și corelarea datelor privind infecția cu virusul hepatitei E la animale și la om reprezintă premisele unor studii mai complexe, care să explice dinamica infecției cu virusul hepatitei E în România, prin implicarea de specialiști din domenii complementare, sub egida noului concept medical global **“O singură sănătate”** (“One Health”).

CHAPTER X

FINAL CONCLUSIONS

The general analysis of the results obtained following the investigations carried out on HEV infection, in wild animals and the human population, in the eastern part of Romania, led to the following conclusions:

- 1 The conducted investigations evaluated the role of HEV reservoir and the potential zoonotic risk of some wildlife species (wild boars, cervids, rabbits, rats, ferrets and foxes), in the eastern region of Romania.
- 2 The results of the investigations revealed new data on the dynamics of hepatitis E virus infection, in susceptible populations (human and animal), in Romania.
- 3 Reporting HEV infection (serological and/or molecular) in wild boars, in 6 of the 7 studied counties and the prevalence of detected HEV RNA (18%) reveals an increased HEV circulation, within the members of this species.
- 4 The corroboration of our results with those obtained in previous studies draws attention to the persistence and, at the same time, to the spread of HEV infection in the wild boar population in eastern Romania.
- 5 The phylogenetic classification of the five isolated HEV strains from wild boars, in the highly isolated subtypes of HEV autochthonous infection in European countries (3a and 3h) and the degree of relatedness between them and a previously identified HEV strains, in pigs, in the same study area, suggests that the presence of HEV infection in wild boars may be a risk factor for public health in Romania.
- 6 The investigations concerning HEV infection in cervids and rabbits led to negative results. This does not exclude the possibility of HEV circulation in the population of cervids and rabbits in eastern Romania, considering the fact that the present study being performed on a relatively low sample
- 7 The corroboration of the results of our research, on the detection of HEV in cervids, with those in the literature, suggests possible factors that might be involved in the dynamics of HEV infection in this species: their selectivity in food choice and water sources as well as the anatomical peculiarities (lack of the gallbladder).
- 8 The involvement of the stated factors represent objectives for a new research, which can contribute to both the evaluation of the role of these animals in the

epidemiological cycle of HEV infection and to the improvement of pathogenesis data.

- 9 The results of the molecular investigations on hepatitis E virus infection in rats revealed the classification of the nine isolated strains in C1 genotype (Ortohepevirus C species), a genotype with suspected zoonotic potential.
- 10 Bioinformatics analysis of isolated rat HEV strains has yielded new data on the degree of genetic relatedness between the Orthohepevirus genus species by the signaled nt identity to human and swine HEV-4 isolates in China.
- 11 The results obtained following the application of various molecular methods for the analysis of samples, collected from wild animals, highlight the need to develop specific assays for the identification of HEV by species.
- 12 The elaboration of the two molecular protocols (PCR) for HEV detection in foxes and the analyzes performed resulted in the identification of a positive sample of the 9 tested (11.11%).
- 13 Molecular analysis of HEV detection in wild animals is a novelty for Romania, the obtained results providing important data on the dynamics of HEV infection in the studied populations.
- 14 The novelty of this theses is underlined by the signaling of the acute hepatitis E cases, as well as the detection of HEV and the characterization of the isolates from the human population, from our country.
- 15 Inclusion in the study and testing of patients with unknown acute hepatitis resulted in an estimated HEV infection prevalence of 29.2% (14/48), among the analyzed subjects.
- 16 The identification of VHE infection, in both patients with acute hepatitis and without hepatic conditions, corresponds to the literature and suggests the need to implement a national program for prevention, surveillance and control of hepatitis E in Romania.
- 17 Characterization of the two human HEV isolates reveals their belonging to subtype 3c, being genetically related to european isolates of human and animal HEV.
- 18 The comparison of the obtained results regarding the classification of human HEV isolates to the data specified by the European Food Safety Authority (EFSA) suggests that the reported infection could be associated with imports of pork from EU countries.
- 19 The comparative analysis of the molecular investigations results on the detection of HEV in animals and humans, in the eastern region of Romania, with those in the literature also supports a native infections hypothesis .
- 20 The performed investigations for the detection of HEV and the correlation of data on hepatitis E virus infection, in animals and humans, are the premises of more complex studies, that can explain the dynamics of hepatitis E virus infection in Romania, through the involvement of specialists in complementary areas, under the aegis of the new global medical concept "One Health".

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Abravanel F., Lhomme S, El Costa H., Schvartz B., Peron J.-M., Kamar N., Izopet J., 2017 - Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerging Infectious Diseases*, 23 (7): 1191-1193.
2. Adlhoch C., 2016 - Hepatitis e virus surveillance in Sweden. *Health & Medicine*, SlideShare.
3. Adlhoch C., Avellon A., Baylis S.A., Ciccaglione A.R., Couturier E., de Sousa R., Epstein J., Ethelberg S., Faber M., Fehér Á., Ijaz S., Lange H., Mand'áková Z., Mellou K., Mozalevskis A., Rimhanen-Finne R., Rizzi V., Said B., Sundqvist L., Thornton L., Tosti M.E., van Pelt W., Aspinall E., Domanovic D., Severi E., Takkinen T., Dalton H.R., 2016 - Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *Journal of Clinical Virology* 82: 9–16.
4. Adlhoch C., Wolf A., Meisel H., Kaiser M., Ellerbrok H., Pauli G., 2009 - High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Veterinary microbiology*, 139: 270-8.
5. Aggarwal R. and Jameel S., 2011 - Hepatitis E. *Hepatology*, 54: 2218–2226.
6. Aggarwal R., 2011 - Clinical presentation of hepatitis E. *Virus research*, 161:15-22.
7. Aggarwal R., 2013 - Diagnosis of hepatitis E. *Gastroenterol. Hepatol.* 10: 24–33.
8. Aggarwal R., Kini D., Sofat S., Naik S.R., Krawczynski K., 2000 - Duration of viremia and faecal viral excretion in acute hepatitis. *Lancet*, 356: 1081–1082.
9. Anheyer-Behmenburg H.E., Szabo K., Schotte U., Binder A., Klein G., Johne R., 2017 - Hepatitis E virus in wild boars and spillover infection in red and roe deer, Germany, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23: 130–133.
10. Anita A., Gorgan L., Anita D., Oslobanu L., Pavio N., Savuta G., 2014 - Evidence of hepatitis E infection in swine and humans in the East Region of Romania. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 29: 232-7.
11. Aniță A, Duca E., Aniță D., Savuța G., 2012 - Presence of anti-hepatitis E virus antibodies in swine and human population in Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 69(1/2):466-467.

12. Aniță A. și Savuța G., 2012 - Serological evidence of HEV infection among farm pigs in east of Romania. *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași*, 55(3/4): 742-744.
13. Aniță A., 2007 - Hepatitis E - a new zoonosis present also in Romania. *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași*, 51(10): 593-598.
14. Aniță A., 2010 - Cercetări privind hepatita E la suine. Teză de doctorat. Iași
15. Aniță A., Aniță D., Ludu L., Savuța G., 2010 - Seroepidemiological investigation of human and swine hepatitis in Botoșani county. *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 67(2): 19-22.
16. Aniță A., Aniță D., Savuța G., 2010 - Researches regarding the seroprevalence of swine hepatitis E virus infection in the east of Romania. *Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Romania, Lucrări Științifice - Medicină Veterinară*, 53, 12(2): 219-221.
17. Aniță A., Aniță D., Tănase O., Ludu L., Savuța G., 2009 - Serological evidence of hepatitis E virus infection in different swine categories from Iași County. *Journal Scientific papers – Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iași*, 52:817–9.
18. Aniță A., Ludu L., Aniță D., Savuța G., 2011 - Investigation on hepatitis E infection in pig farms. *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Iași*, 54(2): 199-202.
19. Aniță Adriana, și Savuța G., 2012 - New possibilities of detection of swine hepatitis E infection. *Facultatea de Medicină Veterinară, Timișoara, Romania, Lucrări Științifice - Universitatea de Științe Agricole a Banatului Timișoara*, 45(3): 5-9.
20. Anty R., Ollier L., Peron J.M., Nicand E., Cannavo I., Bongain A., Giordanengo V. and Tran A., 2012. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *Journal of Clinical Virology*, 54: 76–78.
21. Aprea G., Amoroso M. G., Di Bartolo I., D'Alessio N., Di Sabatino D., Boni A., Cioffi B., D'Angelantonio D., Scattolini S., De Sabato L., Cotturone G., Pomilio F., Migliorati G., Galiero G. and Fusco G., 2017 - Molecular detection and phylogenetic analysis of hepatitis E virus strains circulating in wild boars in south-central Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12661.
22. Arankalle V.A., Joshi M.V., Kulkarni A.M., Gandhe S.S., Chobe L.P., Rautmare S.S., Mishra A.C., Padbidri V.S., 2001 - Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral. Hepat.*, 8: 223–227.
23. Aspinall E.J., Couturier E., Faber M., Said B., Ijaz S., Tavoschi L., Takkinen J., Adlhoch C., country experts, 2017 - Hepatitis E virus infection in Europe:

- surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro Surveill.* 29: 22 (26).
24. Baechlein C., Schielke A., Johne R., Ulrich R.G., Baumgaertner W., Grummer B., 2010 - Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet. Microbiol.*, 144: 187–191.
25. Balayan M.S., Usmanov R.K., Zamyatina N.A., Djumalieva D.I., Karas F.R., 1990 - Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol.*, 32: 58-59.
26. Barnaud E., Rogee S., Garry P., Rose N., Pavio N., 2012 - Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and environmental microbiology*, 78: 5153-9.
27. Barnaud E., Rogee S., Garry P., Rose N., Pavio N., 2012 - Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and environmental microbiology*, 78: 5153-9.
28. Berto A., Grierson S., Hakze-van der Honing R., et al., 2013 - Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis.*, 19(2): 264–266.
29. Boadella M., 2015 - Hepatitis E in wild ungulates: A review. *Small Ruminant Research*, 128: 64-71.
30. Boadella M., Casas M., Martín M., Vicente J., Segalés J., de la Fuente J., Gortázar C., 2010 - Increasing contact with hepatitis E virus in red deer. Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 16: 1994–1996.
31. Boadella M., Ruiz-Fons J.F., Vicente J., Martín M., Segalés J., Gortazar C., 2012 - Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transb. Emerg. Dis.*, 59: 395–404.
32. Bodewes R., van der Giessen J., Haagmans B.L., Osterhaus A.D., Smits S.L., 2013 - Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.*, 87:7758-7764.
33. Botezatu C., Tănase O., Anița A., Rîmbu C., Carp-Cărare M., 2014 - Studies regarding antibodies prevalence to selected viral pathogens from wild boars. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară USAMVB Timisoara*, 47: 20–8.
34. Bouquet J., Tesse S., Lunazzi A., Eloit M., Rose N., Nicand E., Pavio N., 2011 - Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerging infectious diseases*, 17: 2018-25.
35. Brassard J., Gagné M.J., Gagnéux M., Côté C., 2012 - Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 3763–3766.
36. Burt S.A., Veltman J. van der Poel W.H.M., 2016 - Hepatitis E Virus in Farmed Rabbits, Wild Rabbits and Petting Farm Rabbits in the Netherlands. *Food Environ Virol*, 8:227–229.

37. Buti M., Dominguez A., Plans P., Jardi R., Rodriguez-Frias F., Girones R., et al., 2010 - Infrequent detection of hepatitis E virus RNA in pregnant women with hepatitis E virus antibodies in Spain. *Liver. Int.*, 1549–51.
38. Cao D, Meng X.-J., 2012 - Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg. Microbes Infect.* 1: e17.
39. Carpentier A., Chaussade H., Rigaud E., Rodriguez J., Berthault C., Boue F., Tognon M., Touze A., Garcia-Bonnet N., Choutet P., Coursaget P., 2012 - High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *Journal of clinical microbiology*, 50: 2888-93.
40. Caruso C., Modesto P., Bertolini S., Peletto S., Acutis P.L., Dondo A., Robetto S., Mignone W., Orusa R., Ru G., Masoero L., 2015 - Serological and virological survey of hepatitis E virus in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f. *Archives of virology*, 160: 153-60.
41. Caruso C., Modesto P., Prato R., Scaglione F. E., De Marco L., Bollo E., et al., 2015 - Hepatitis E virus: First description in a pet house rabbit. A new transmission route for humans. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62: 229–232.
42. Ceylan A., Ertem M., Ilcin E., Ozekinci T., 2003 - A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol. Infect.*, 131: 753–756.
43. Chandler J.D., Riddell M.A., Li F., Love R.J., and Anderson D.A., 1999 – Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol.*, 68: 95–105.
44. Chandra V., Taneja S., Kalia M., Jameel S., 2008 - Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J. Biosci.* 33 (4) 451–464.
45. Chingwaru W., Vidmar J., 2016 - A novel porcine cell culture based protocol for the propagation of hepatitis E virus, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(8): 596-602.
46. Choi C., Chae C., 2003 - Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *Journal of hepatology*, 38: 827-32.
47. Clayson E.T., Innis B.L., Myint K.S., Narupiti S., Vaughn D.W., Giri S., Ranabhat P., Shrestha M.P., 1995 - Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53: 228-232.
48. Cooper K., Huang F.F., Batista L., Rayo C.D., Bezanilla J.C., Toth T.E., Meng X.-J., 2005 - Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *Journal of clinical microbiology*, 43: 1684-8.
49. Cossaboom C., Córdoba L., Dryman B., Meng X.-J., 2012 - Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 2047–2049.

50. Cossaboom C.M., Cordoba L., Sanford B.J., Pineyro P., Kenney S.P., Dryman B.A., et al., 2012 - 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.*, 93: 1687–95.
51. de Deus N., Peralta B., Pina S., Allepuz A., Mateu E., Vidal D., Ruiz-Fons F., Martin M., Gortazar C., Segales J., 2008 - Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Veterinary microbiology*, 129: 163-70.
52. de Deus N., Seminati C., Pina S., Mateu E., Martin M., Segales J., 2007 - Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Veterinary microbiology*, 119:105-14.
53. Debes J.D., Pisano M.B., Lotto M. and Re V., 2016 - Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. *Journal of Clinical Virology*, 80: 102–106.
54. Di Bartolo, Ponterio E., Angeloni G., Morandi F., Ostanello F., Nicoloso S., Ruggeri F.M., 2017 - Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64: 137–143.
55. Di Profio F., Melegari I., Sarchese V., Robetto S., Marruchella G., Bona M.C., Orusa R., Martella V., Marsilio F., Di Martino B., 2016 - Detection and genetic characterization of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 subtype c in wild boars in Italy. *Archives of virology*, 161: 2829-34.
56. Diez-Valcarce M., Kokkinos P., Söderberg K., Bouwknecht M., Willems K., de Roda-Husman A.M., von Bonsdorff C.H., Bellou M., Hernández M., Maunula L. et al., 2012 - Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ. Virol.*, 4: 73–80.
57. Doceul V., Bagdassarian E., Demange A., Pavio N., 2016 - Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses*, 8, 270.
58. Dong C., Meng J., Dai X., Liang J.H., Feagins A.R., Meng X.-J., Belfiore N.M., Bradford C., Corn J.L., Cray C., Glass G.E., Gordon M.L., Hesse R.A., Montgomery D.L., Nicholson W.L., Pilny A.A., Ramamoorthy S., Shaver D.D., Drobeniuc J., Purdy M.A., Fields H.A., Kamili S., Teo C.G., 2011 - Restricted enzooticity of hepatitis E virus genotypes 1 to 4 in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 4164–4172.
59. Dremsek P., Wenzel J.J., Johne R., Ziller M., Hofmann J., Groschup M.H., Werdermann, S., Mohn U., Dorn S., Motz M., Mertens M., Jilg W., Ulrich R.G., 2012 - Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol.*, 201: 189-200.
60. Drexler J.F., Seelen A., Corman V.M., Tateno A.F., Cottontail V., Zerbinati R.M., Gloza-Rausch F., Klose S.M., Adu-Sarkodie Y., Oppong S.K., Kalko

- E.K.V., Osterman A., Rasche A., Adam A., Müller M.A., Ulrich R.G., Leroy, E.M., Lukashev, A.N., Drosten, C., 2012 - Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.*, 86: 9134–9147.
61. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. Hepatitis E in the EU/EEA, 2005–2015. Stockholm, June 2017. doi.org/10.2900/059144.
62. EFSA Panel on Biological Hazards, Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernandez Escamez PS, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Di Bartolo I, John R, Pavo N, Rutjes S, van der Poel W, Vasickova P, Hempen M, Messens W, Rizzi V, Latronico F and Girones R, 2017 - Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15(7): 4886-89.
63. Favorov M.O., Kosoy M.Y., Tsarev S.A., Childs J.E., Margolis H.S., 2000 - Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.*, 181: 449–455.
64. Feagins A.R., Opriessnig T., Huang Y.W., Halbur P.G., Meng X.-J., 2008 - Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 80: 1379–1386.
65. Forgách P., Nowotny N., Erdélyi K., Boncz A., Zentai J., Szucs G., Reuter G., Bakonyi T., 2010 - Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet. Microbiol.*, 143: 106–116.
66. Galiana C., Fernandez-Barredo S., Garcia A., Gomez M.T., Perez-Gracia M.T., 2008 - Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78: 1012-5.
67. Geng Y., Zhao C., Song A., Wang J., Zhang X., Harrison T., Zhou Y., Wang W., Wang Y., 2011 - The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infect. Genet. Evol.*, 11: 476–482.
68. Graff J., Nguyen H., Yu C., Elkins W.R., Claire M.S., Purcell R.H., and Emerson S.U., 2005 - The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. *Journal of Virology*, 79(11): 6680–6689.
69. Grodzki M., Schaeffer J., Piquet J.-C., Le Saux J.-C., Chevé J., Ollivier J., Le Pendu J., Le Guyader F.S., 2014 - Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80: 4269–4276.
70. Guillois Y., Abravanel F., Miura T., Pavo N., Vaillant V., Lhomme S., Le Guyader F.S., Rose N., Le Saux J.C., King L.A. and Izopet Couturier E., 2016 - High proportion of asymptomatic infections in an outbreak of hepatitis E associated with a spit-roasted piglet, France, 2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62: 351–357.

71. Guu T.S.Y., Liu Z., Ye Q., Mata D.A., Li K., Yin C., Zhang J., and Tao Y.J., 2009 - Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12992–12997.
72. Hakim M.S., Wang W., Bramer W.M., Geng J., Huang F., Man R.A., Peppelenbosch M.P and Pan Q., 2017 - The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 37: 19–31.
73. Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., Emerson S.U., Toth T.E., Meng X.J., 2001 - Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 918–923.
74. Hammerschmidt F., Schwaiger K., Dahnert L., Vina-Rodriguez A., Hoper D., Gareis M., Groschup M.H., Eiden M., 2017 - Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany. *Zoonoses Public Health*, 1–11 DOI:10.1111/zph.12355.
75. Hartl J., Otto B., Madden RG, Webb G., Woolson K.L., Kriston L., Vettorazzi E., Lohse A.W., Dalton H.R. and Pischke S., 2016. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses*, 8: 211.
76. Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., Kadosaka T., Goto I., Masuzawa T., Nakamura M., Taira K., Kuroki T., Tanikawa T., Watanabe H., Abe K., 2003 - Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatology*, 37: 1–5.
77. Ijaz S., Arnold E., Banks M., et al., 2005 - Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J. Infect. Dis.*, 192(7): 1166–1172.
78. Ijaz S., Said B., Boxall E., Smit E., Morgan D. and Tedder R.S., 2014 - Indigenous hepatitis E in England and Wales from 2003 to 2012: evidence of an emerging novel phylotype of viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 209: 1212–1218.
79. Ishida S., Yoshizumi S., Ikeda T., Miyoshi M., Goto A., Matsubayashi K., Ikeda H., 2012 - Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.*, 157: 2363–2368.
80. Ivanova A., Tefanova V., Reshetnjak I., Kuznetsova T., Geller J., Lundkvist A., Janson M., Neare K., Velstrom K., Jokelainen P., Lassen B., Hutt P., Saar T., Viltrop A., Golovljova I., 2015 - Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food and environmental virology*, 7: 403-12.
81. Izopet J., Dubois M., Bertagnoli S., Lhomme S., Marchandeau S., Boucher S., Kamar N., Abravanel F., Guerin J.L., 2012 - Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 18: 1274–1281.

82. Jameel S., - 1999 Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus; Expert Rev. Mol. Med., 1–16.
83. Jirintai S., Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo J.B., Takahashi M., Kobayashi T., Nagashima S., Nishizawa T., Okamoto H., 2014 - Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. Virus. Res. 185: 92-102.
84. John R., Dremsek P., Reetz J., Heckel G., Hess M., Ulrich R.G., 2014 - Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. Infect. Genet. Evol., 27: 212–229.
85. Jori F., Laval M., Maestrini O., Casabianca F., Charrier F., Pavio N., 2016 - Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. Viruses, 8.
86. Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X.J., Hill V.R., 2006 - A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. Journal of virological methods, 131: 65-71.
87. Kaba M., Davoust B., Marie J.L., Colson P., 2010 - Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. Vet. J., 186: 259-61.
88. Kabrane-Lazizi Y., Meng, X.-J., Purcell R.H., and Emerson S.U., 1999b - Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. J. Virol. 73 :8848–8850.
89. Kaci S., Nockler K., John R., 2008 - Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. Veterinary microbiology, 128: 380-5.
90. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., Dalton H.R., 2012 - Hepatitis E. Lancet, 379: 2477–2488.
91. Kanai Y., Miyasaka S., Uyama S., Kawami S., Kato-Mori Y., Tsujikawa M., Yunoki M., Nishiyama S., Ikuta K., Hagiwara K., 2012 - Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. BMC Research Notes, 5: 4.
92. Karenyi I. V., Dzhumaliev D. I., Usmanov R. K., Titova I. P., Litvak I. I., Balaian M. S. 1993 - The possible involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 4:52–56.
93. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes G.R., Bradley D.W., 1992 - Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 8259-8263.
94. Krawczynski K., Meng X.-J., Rybczynska J., 2011 - Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. Virus Res., 161: 78– 83.
95. Krog J.S., Breum S.O., Jensen T.H., Larsen L.E., 2013 - Hepatitis e virus variant in farmed mink, Denmark. Emerg. Infect. Dis., 19: 2028-2030.
96. Kukiela D., Rodriguez-Prieto V., Vicente J. and Sanchez-Vizcaino J.M., 2016 - Constant hepatitis E virus (HEV) circulation in wild boar and red deer in Spain:

- an increasing concern source of HEV zoonotic transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63: 360–368.
97. Kumar R.M., Uduman S., Rana S., Kochiyil J.K., Usmani A., Thomas L., 2001 - Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 100: 9-15.
 98. Kumar S., Subhadra S., Singh B., Panda B., 2013 - Hepatitis E virus: The current scenario. *Int. J. Infect. Dis.*, 17: e228–e233.
 99. Kuno A., Ido K., Isoda N., Satoh Y., Ono K., Satoh S., Inamori H., Sugano K., Kanai N., Nishizawa T., Okamoto H., 2003 - Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatol. Res.*, 26: 237–242.
 100. La Rosa G., Muscillo M., Vennarucci V.S., Garbuglia A.R., La Scala P., Capobianchi M.R., 2011 - Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *The Journal of general virology*, 92: 1617-26.
 101. Lapa D, Capobianchi M.R. and Garbuglia A.R., 2015 – Epidemiology of hepatitis E virus in European countries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (10): 25711–25743.
 102. Larska M., Krzysiak M.K., Jablonski, A., Kesik, J., Bednarski M., Rola J., 2015 - Hepatitis E Virus Antibody Prevalence in Wildlife in Poland. *Zoonoses Public Health*, 62: 105–110.
 103. Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Chae C., 2009 - Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet. J.*, 179:417-21.
 104. Legrand-Abravanel F., Thevenet I., Mansuy J.M., Saune K., Vischi F., Peron J.M., Kamar N., Rostaing L., Izopet J., 2009 - Good performance of immunoglobulin m assays in diagnosing genotype 3 hepatitis e virus infections. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 16: 772-774.
 105. Lhomme S., Top S., Bertagnoli S., Dubois M., Guerin J.L., Izopet J., 2015b - Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus, Southwestern France. *Emerging infectious diseases*, 21:1224-6.
 106. Li T.C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S., Takeda N., Miyamura T., 2005 - Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.*, 11:1958–1960.
 107. Li T.C., Saito M., Ogura G., Ishibashi O., Miyamura T., Takeda N., 2006a. - Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 932-936.
 108. Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S.P., Arikawa J., Koma T., Kataoka M., Ami Y., Suzuki Y., Mai le T.Q., Hoa N.T., Yamashiro T., Hasebe F., Takeda N., Wakita T., 2011 - Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis e virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol*, 92: 2830-2837.

109. Li W., Guan D., Su J., Takeda N., Wakita T., Li T.C., Ke C.W., 2013 - High prevalence of rat hepatitis e virus in wild rats in China. *Vet Microbiol*, 165: 275-280.
110. Lindemann M.L., Gabilondo G., Romero B., de la Maza O.M., Perez-Gracia M.T., 2010 - Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain. *J. Med. Virol.*, 82: 1666–8.
111. Liu L., Wang L., Xia J., Zhang Y., Zeng H., Liu P., Zou Q., Wang L., Zhuang H., 2016 - Mix-breeding with HEV-infected swine induced inapparent HEV infection in SPF rabbits. *J. Med. Virol.*, 88: 681–685.
112. Lu L., Li C., Hagedorn C.H., 2006 - Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5–36.
113. Ma H., Zheng L., Liu Y., Zhao C., Harrison T.J., Ma Y., Sun S., Zhang J., Wang Y., 2010 - Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoS ONE*, 5: e9160.
114. Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Delogu M., Ostanello F., 2008 - Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Veterinary microbiology*, 126: 74-81.
115. Martinelli N., Pavoni E., Filogari D., Ferrari N., Chiari M., Canelli E., Lombardi G., 2015 - Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy. *Transboundary and emerging diseases*, 62: 217-22.
116. Matsuura Y., Suzuki M., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I., Yokoyama M., Igota H., Yamauchi K., Ishida S., Fukui D., Bando G., Kosuge M., Tsunemitsu H., Koshimoto C., Sakae K., Chikahira M., Ogawa S., Miyamura T., Takeda N., Li T.C., 2007 - Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch. Virol.*, 152: 1375–1381.
117. Mazzei M., Nardini R., Verin R., Forzan M., Poli A., Tolari F., 2015 - Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Central Italy. *New microbes and new infections*, 7: 41-7.
118. Medrano C., Boadella M., Barrios H., Cantú A., García Z., de la Fuente J., Gortazar C., 2012 - Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004–2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 18: 1372–1374.
119. Meng X.-J., 2009 - Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk, *Vet. Microbiol.*, 140: 256–265.
120. Meng X.-J., 2011 - From Barnyard to Food Table: the Omnipresence of Hepatitis E virus and Risk for Zoonotic Infection and Food Safety. *Virus Res.*, 161(1): 23–30.
121. Meng X.-J., Dai X., Chang J.C., Lopareva E., Pillot J., Fields H.A., Khudyakov Y.E., 2001 - Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288: 203–211.

122. Meng X.-J., Dea S., Engle R.E., Friendship R., Lyoo Y.S., Sirinarumitr T., Urairong K., Wang D., Wong D., Yoo D., et al., 199 - Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.*, 59: 297–302.
123. Meng X.-J., Lindsay D.S., Sriranganathan N., 2009 - Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 364(1530): 2697–2707.
124. Meng X.-J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U., 1997 - A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94; 9860–9865.
125. Meng X.-J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K., Toth T. E., Engle R. E., Emerson S. U., and Purcell R. H., 2002 -Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 117–122.
126. Mesquita J.R., Oliveira R.M., Coelho C., Vieira-Pinto M., Nascimento M.S., 2016 - Hepatitis E Virus in Sylvatic and Captive Wild Boar from Portugal. *Transboundary and emerging diseases*, 63: 574-8.
127. Michitaka K., Takahashi K., Furukawa S., Inoue G., Hiasa Y., Horiike N., Onji M., Abe N., Mishiro S., 2007 - Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol. Res.*, 37: 214–20.
128. Mirazo S., Ramos N., Mainardi V., Geron S., Arbiza J., 2014 - Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat. Med.*, 6: 45-59.
129. Montagnaro S., De Martinis C., Sasso S., Ciarcia R., Damiano S., Auletta L., Iovane V., Zottola T. and Pagnini U., 2015 - Viral and antibody prevalence of hepatitis E in European wild boars (*Sus scrofa*) and hunters at zoonotic risk in the Latium region. *Journal of Comparative Pathology*, 153: 1–8.
130. Mori Y. and Matsuura Y., 2011 - Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Research* 161: 59–64.
131. Mulyanto, Depamede S. N., Sriasih M., Takahashi M., Nagashima S., Jirintai S., Nishizawa T., Okamoto, H., 2013 - Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol*, 158: 87–96.
132. Mulyanto, Suparyatmoc J.B., Andayani I.G.A.S., Khalid, Takahashid M., Ohnishid M., Jirintaid S, Nagashimad S., Nishizawad T., Okamotod H., 2014 - Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Research* 179: 102–112.
133. Nakamura M., Takahashi K., Taira K., Taira M., Ohno A., Sakugawa H., Arai M., Mishiro S., 2006 - Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.*, 34: 137-140.

134. Nidaira M., Takahashi K., Ogura G., et al., - 2012 - Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 1665-1668.
135. Okamoto H., 2013 - Culture systems for hepatitis E virus. *J. Gastroenterol* 48: 147–158.
136. Oliveira-Filho E.F., König M., Thiel H.-J., 2013 - Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.*, 165: 148–154.
137. Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A., Weiland O., 2006 - Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand. J. Infect. Dis.*, 38: 55–58.
138. Oncu S., Oncu S., Okyay P., Ertug S., Sakarya S., 2006 - Prevalence and risk factors for HEV infection in pregnant women. *Med. Sci. Monit.* 12: 36 –39.
139. Pavio N., Meng X.-J. and Doceul V., 2015 - Zoonotic origin of hepatitis E. *Current Opinion in Virology*, 10: 34–41.
140. Pavio N., Meng X.-J., Renou C., 2010 - Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary research*, 41: 46.
141. Pelosi E., Clarke I., 2008 - Hepatitis E: a complex and global disease. *Emerging Helth Threats Journal*, 1: e8.
142. Pérez-Gracia M.T., Suay B., Mateos-Lindemann M.L., 2014 - Hepatitis E: an emerging disease. *Infect. Genet. Evol.*, 22: 40-59.
143. Perianu T. 2012 - *Tratat de boli infecțioase ale animalelor: viroze și boli prionice*. Iași: Universitas XXI..
144. Porea D, Anita A, Demange A, et al., 2017 - Molecular detection of hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania. *Transbound. Emerg. Dis.*, 00: 1–7.
145. Porea Daniela, Anita Adriana, Paslaru Anca, Savuta Gheorghe, 2015 - Serological evidence of wild boar hepatitis E infection in three counties from eastern Romania. *Lucrări Științifice –Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara*, 48 (3): 174 – 178
146. Porea Daniela, Anita Adriana, Paslaru Anca, Savuta Gheorghe, 2016 - Wild boar hepatitis E seroprevalence in hunting funds from Buzău and Galați counties. *Buletin USAMV Cluj-Napoca*, 73 (1): 44 - 48.
147. Prpic J., Cerni S., Skoric D., Keros T., Brnic D., Cvetnic Z. and Jemersic L, 2015 - Distribution and molecular characterization of hepatitis E virus in domestic animals and wildlife in Croatia. *Food and Environmental Virology*, 7: 195–205.
148. Purcell R.H., Engle R.E., Rood M.P., Kabrane-Lazizi Y., Nguyen H.T., Govindarajan S., St Claire M., Emerson S.U., 2011 - Hepatitis e virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis.*, 17: 2216-2222.
149. Raj V.S., Smits S.L., Pas S.D., Provacia L.B., Moorman-Roest H., Osterhaus A.D., et al., 2012 - Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 18: 1369–1370.

150. Ratra R., Kar-Roy A., Lal S.K., 2009 - ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with the Bbeta chain of fibrinogen resulting in decreased fibrinogen secretion from HuH-7 cells. *J. Gen. Virol.* 90: 1359 –1370.
151. Răpuncean G. și Răpuncean S., 2014 - *Virusologie veterinară specială*. Cluj Napoca: Coloroma
152. Reimar J., Dremsek P., Reetz J., Heckel G., Hess M., Ulrich RG., 2014 - Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol.*, 27:212-229.
153. Renou C., Cadranel J.-F., Bourlière M., Halfon P., Ouzan D., Rifflet H., Carencio P., Harafa A., Bertrand J.J., Boutrouille A. et al., 2007 - Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1094–1096.
154. Renou C., Roque-Alfonso A., Pavo N., 2014 - Foodborne transmission of HEV from raw pork liver sausage in France. *Emerg. Infect. Dis.*, 20 (11): 1945–1947.
155. Reuter G., Fodor D., Forgach P., Katai A., Szucs G., 2009 - Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 44: 277-81.
156. Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Fry K. E. and Bradley D. W., 1990 - Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247: 1335-1339.
157. Riveiro-Barciela M., Mínguez B., Gironés R., Rodríguez-Frías F., Quer J., Buti M., 2015 - Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.*, 49: 165–168.
158. Rogée S., Talbot N., Caperna T., Bouquet J., Barnaud E., Pavo N., 2013 - New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *Journal of General Virology*, 94: 549–558.
159. Rutjes S.A., Lodder W., Lodder-Verschoor F., van den Berg H., Vennema H., Duizer E., Koopmans M., de Roda Husman A., 2009 - Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 15: 381–387.
160. Rutjes S.A., Lodder-Verschoor F., Lodder W.J., van der Giessen J., Reesink H., Bouwknegt M., de Roda Husman A.M., 2010 - Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *Journal of virological methods*, 168: 197-206.
161. Ryll R., Bernstein S., Heuser E., Schlegel M., Dremsek P., Zumpe M., Wolf S., Pépin M., Bajomi D., Muller G., Heiberg A-C., Spahr C., Lang J., Groschup M.H., Ansorge H., Freise J., Guenther S., Baert K., Ruiz-Fonsisco .F, Pikula J., Knap N., Tsakmakidis, Dovas C., Zanet S., Imholt C., Heckel G., Reimar J., Rainer G., 2017 - Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*R.rattus*) from 11 European countries. *Veterinary Microbiology*, 208: 58-68.

162. Said B., Ijaz S., Kafatos G., Booth L., Thomas H.L., Walsh A., Ramsay M.E., Morgan D., 2009 - The Hepatitis E Incident Investigation Team. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.*, 15: 1738–1744.
163. Sakano C., Morita Y., Shiono M., Yokota Y., Mokudai T., Sato-Motoi Y., Noda A., Nobusawa T., Sakaniwa H., Nagai A., Kabeya H., Maruyama S., Yamamoto S., Sato H., Kimura H., 2009 - Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Wild Boars (*Sus scrofa leucomystax*) and Pigs in Gunma Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 71: 21–25.
164. Salines M., Barnaud E., Andraud M., Eono F., Renson P., Bourry O., Pavio N., Rose N., 2015 - Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Res.*, 46 (1): 55.
165. Sato Y., Sato H., Naka K., Furuya S., Tsukiji H., Kitagawa K., Sonoda Y., Usui T., Sakamoto H., Yoshino S., Shimizu Y., Takahashi M., Nagashima S., Jirintai Nishizawa T., Okamoto H., 2011 - A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch. Virol.*, 156: 1345–1358.
166. Savic B., Milicevic V., Bojkovski J., Kureljusic B., Ivetic V., Pavlovic I., 2010 - Detection rates of the swine torque teno viruses (TTVs), porcine circovirus type 2 (PCV2) and hepatitis E virus (HEV) in the livers of pigs with hepatitis. *Vet Res Commun*, 34: 641-648.
167. Savuța G., Aniță A., Aniță D., Ludu L., Duca E., Pavio N., 2008 - Seroepidemiological researches regarding swine and human hepatitis E in Romania. *Lucrări Științifice - Universitatea de Științe Agricole a Banatului Timișoara, Medicină Veterinară*, 41: 309-313.
168. Savuța G., Aniță A., Aniță D., Ludu L., Pavio N., 2007 - Preliminary epidemiological investigations regarding hepatitis E virus infection in swine from the north-east of Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 64(1/2): 356-358.
169. Schielke A., Sachs K., Lierz M., Appel B., Jansen A., Johne R., 2009 - Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virology journal*, 6: 58.
170. Shimizu K., Hamaguchi S., Ngo C.C., Tian-Cheng L.I., Yoshimatsu K., Yasuda S.P., Fujita H., Pham T.T., Le M.Q., Dang A.D., Nguyen T.Q., Yoshida L.M., Ariyoshi K., Arikawa J., 2016 - Serological evidence of infection with rodent-borne hepatitis E virus HEV-C1 or antigenically related virus in humans. *J. Vet. Med. Sci.*, 78(11): 1677-1681.
171. Shrestha M.P., Scott R.M., Joshi D.M., Mammen M.P., Jr. Thapa G.B., Thapa N., et al., 2007 - Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 356: 895-903.
172. Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., Koenig M., Jameel S., Harrison T.J., Meng X.-J., Okamoto H., Van der Poel W.

- H., Purdy M.A., 2016 - Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *The Journal of general virology*, 97: 537-42.
173. Smith D.B., Simmonds P., Jameel S., Emerson S.U., Harrison T.J., Meng X.-J., Okamoto H., Van der Poel W.H., Purdy M.A., 2014 - Consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae*. *The Journal of general virology*, 95: 2223-32.
 174. Song Y., Kim B., Park W., Park B., Lee S., Shin J., Lee N., Lee J., Park S., Song C., Seo K., Choi I., Fox R., Deer R., 2013 - Seroprevalence of hepatitis E virus in zoo animal species in Korea. *Korean J. Vet. Res.*, 53: 65–68.
 175. Sonoda H., Abe M., Sugimoto T., Sato Y., Bando M., Fukui E., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H., 2004 - Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 42: 5371-4.
 176. Spancerniene U., Buitkuvienė J., Grigas J., Pamparienė I., Salomskas A., Cepulienė R., Zymantiene J., Stankevicius A., 2016 - Seroprevalence of hepatitis E virus in Lithuanian domestic pigs and wildlife. *Acta Vet. Brno*, 85: 319-327.
 177. Sridhar S., Lau S.K., Woo P.C., 2015 - Hepatitis E: A disease of reemerging importance. *J. Formos. Med. Assoc.*, 114: 681–90.
 178. Surjit M, Shahid J. and Sunil K. Lal., 2007 - Cytoplasmic Localization of the ORF2, Protein of Hepatitis E Virus Is Dependent on Its Ability To Undergo, Retrotranslocation from the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.*, 81(7): 3339-45.
 179. Takahashi M., Nishizawa T., Nagashima S., Jirintai S., Kawakami M., Sonoda Y., Suzuki T., Yamamoto S., Shigemoto K., Ashida K., Sato Y., Okamoto H., 2014 - Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.*, 180: 59–69.
 180. Takahashi M., Nishizawa T., Sato H., Sato Y., Jirintai, Nagashima S., Okamoto H., 2011 - Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.*, 92: 902–908.
 181. Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S., 2003 - Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.*, 362 (9381):371-373.
 182. Thiry D., Mauroy A., Saegerman C., Licoppe A., Fett T., Thomas I., Brochier B., Thiry E., Linden A., 2015 - Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transboundary and emerging diseases*, doi:10.1111/tbed.12435.
 183. Thoden J., Venhoff N., Miehle N., Klar M., Huzly D., Panther E., et al., 2008 - Hepatitis E and jaundice in an HIV-positive pregnant woman. *Aids*, 22: 909–10.
 184. Tomiyama D., Inoue E., Osawa Y., Okazaki K., 2009 - Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis*, in Hokkaido, Japan. *J. Vir. Hep.*, 16: 524–528.

185. Toole M., Claridge F., Anderson D., Zhuang H., Morgan C., Otto B., Stewart T., 2006 - Hepatitis E virus infection as a marker for contaminated community drinking water sources in Tibetan villages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74: 250–254.
186. Vasickova P., Psikal I., Kralik P., Widen F., Hubalek Z., Pavlik I., 2007 – Hepatitis E virus: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(9): 365–384.
187. Vasickova P., Psikal I., Widen F., Smitalova R., Bendova J., Pavlik I., Kralik P., 2009 - Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res. Vet. Sci.* 87: 143-148.
188. Vina-Rodriguez A., Schlosser J., Becher D., Kaden V., Groschup M.H., Eiden, M., 2015 - Hepatitis E virus genotype 3 diversity: Phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. *Viruses*, 7: 2704–2726.
189. Voiculescu M., Iliescu L., Ionescu C., Micu L., Ismail G., Zilişteanu D., Radasan A., Micu G., Petrache I, 2010 - A Cross-Sectional Epidemiological Study of HBV, HCV, HDV and HEV Prevalence in the SubCarpathian and South-Eastern Regions of Romania. *J. Gastrointestin Liver Dis.*, 19 (1): 43-48.
190. Wichmann O., Schimanski S., Koch J., Kohler M., Rothe C., Plentz A., Jilg W., Stark K., 2008 - Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *The Journal of infectious diseases*, 198:1732-41.
191. Wichmann O., Schimanski S., Koch J., Kohler M., Rothe C., Plentz A., Jilg W., Stark K., 2008 - Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.*,198: 1732–1741.
192. Widén F., Ayral F., Artois M., Olofson A.F., Lin J., 2014 - PCR detection and analyzis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virology Journal*, 11: 90.
193. Widen F., Sundqvist L., Matyi-Toth A., Metreveli G., Belak S., Hallgren G., Norder H., 2011 - Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiology and infection*, 139: 361-71.
194. Williams T.P., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J., 2001 - Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3040–3046.
195. Wiratsudakul A., Sariya L., Prompiram P., Tantawet S., Surarungchai D., Sedwisai P., Sangkachai N., Suksai P., Ratanakorn P., 2012 – Detection and phylogenetic characterization of hepatitis e virus genotype 3 in a captive wild boar in Thailand. *J. Zoo Wildl. Med.*, 43: 640–644.
196. Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tsang A.K.L., Joseph M., Wong E.Y.M., Tang Y., Sivakumar S., Xie J., Bai R., Wernery R., Wernery U., Yuen K.-Y., 2014 - New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.*, 20: 1044–1048.
197. Yu C., Zimmerman C., Stone R., Engle R.E., Elkins W., Nardone G.A., Emerson S.U., Purcell, R.H., 2007 - Using improved technology for filter paper-based

- blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J. Virol. Methods*, 142: 143–150.
198. Yugo D.M. and Meng X.-J, 2013 - Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10: 4507-4533.
199. Zafrullah M., Ozdener M.H., Kumar R., Panda S.K., and Jameel S., 1999 - Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J. Virol.* 73: 4074–4082.
200. Zafrullah M., Ozdener M.H., Panda S.K., Jameel S., 1997 - The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of virology*, 71: 9045-53.
201. Zhang W., Shen Q., Mou J., Yang Z.B., Yuan C.L., Cui L., Zhu J.G., Hua X.G., Xu C.M., Hu J., 2008 - Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds. *Epidemiol. Infect.*, 136: 1020–1026.
202. Zhu F.C., Zhang J., Zhang X.F., Zhou C., Wang Z.Z., Huang S.J., et al., 2010 - Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 376: 895-902.

ANEXA 1 ABREVIERI

ANNEX 1 ABBREVIATIONS

- Ab - antibody (anticorpi totali)
- ADN - acid dezoxiribonucleic
- ADNc - acid dezoxiribonucleic complementar
- ADNS - Animal Disease Notification System (Sistemul de Notificare a Bolilor Animalelor)
- ARN - acid ribonucleic
- ARNm - acid ribonucleic mesager
- ARNt - acid ribonucleic de transfer
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- bp – base pairs (perechi de baze)
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor)
- CRE - CRE - cis-reactive element (element cis-reactiv)
- Ct - threshold cycle (ciclul prag)
- DSP - Direcția de Sănătate Publică
- EFSA - European Food Safety Authority (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară)
- ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (testul imunoenzimatic)
- GE - genomic copy (copii genomice)
- Hel - helicaza
- HIV - Human Immunodeficiency Virus (virusul imunodeficienței umane)
- HVR - regiunea hipervarabilă
- IEM - microscopia imunoelectronică
- IgA - imunoglobulina A
- IgG - imunoglobulina G
- IgM - imunoglobulina M
- JR – jonțiune
- MADR - Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale
- mM - milimolar

- MT - metiltransferază
- N - azot
- NCBI - National Center for Biotechnology Information
- NGS - Next generation sequencing (secvențiere de ultimă generație)
- OD - densitatea optică
- ORF - open reading frame (cadru deschis de citire)
- pcDNA – plasmid (proba standard)
- PCP - proteaza cisteinică asemănătoare papeinei
- PCR - Polymerase chain reaction (reacția de polimerizare în lanț)
- PCV2 - circovirusul porcine tip 2
- PolyA - polyadenylic acid
- pORF - proteină codificată de cadrul deschis de citire
- PRRSV - virusul sindromului respirator și de reproducție la porcine
- RdRp - ARN polimeraza-ARN dependentă
- RT-PCR - Reverse transcription-polymerase chain reaction (revers transcripție PCR)
- SEE - Spațiul Economic European
- SPF - specific pathogen free (liber de patogeni specifici)
- TTVs - virusurile Torque Teno
- UE- Uniunea Europeană
- UTR - regiune necodantă
- VHA - virusul hepatitei A
- VHB - virusul hepatitei B
- VHC - virusul hepatitei C
- VHE - virusul hepatitei E
- X - domeniul X (domain X)
- Y - domeniul Y
- μ l - microlitri
- μ M - micromolar

ANEXA 2 LISTA TABELELOR

ANNEX 2 LIST OF TABLES

	pag
Tabelul 2.1 Studii privind infecția cu VHE la mistreți / Table 2.1 Studies on HEV infection in wild boars	53
Tabelul 2.2 Încadrarea în subtipuri a tulpinilor VHE identificate la mistreți, în Europa / Table 2.2 Classification in HEV subtypes of the wild boar strains, identified in Europe	54
Tabelul 2.3 Studii privind infecția cu VHE la cervide / Table 2.3 Studies on HEV infection in cervids	55
Tabelul 2.4 Studii privind infecția cu VHE la iepurele sălbatic, în Europa / Table 2.4 Studies on HEV infection in wild rabbits, in Europe	56
Tabelul 2.5 Studii privind infecția cu VHE la șobolani în perioada 2000 – 2014 / Table 2.5 Studies on HEV infection in rats, 2000 - 2014	57
Tabelul 2.6 Rezultatele obținute de către Ryll și colab., 2017 privind detecția ARN-ul VHE la șobolani din 12 țări din Europa / Table 2.6 The results obtained by Ryll et al., 2017, regarding the detection of rat HEV RNA in 12 European countries	58
Tabelul 3.1 Studii serologice privind infecția cu VHE la om în România / Table 3.1 Serological studies on HEV infection in humans in Romania	60
Tabelul 3.2 Studii serologice privind infecția cu VHE la suine din județe în estul României / Table 3.2 Serological studies on HEV infection in swine in counties of eastern Romania	60
Tabelul 6.1 Date privind mistreții de la care au fost recoltate probele de ser din județul Galați / Table 6.1 Data regarding wild boars from which the serum samples were harvested, from Galați County	73
Tabelul 6.2 Numărul de probe recoltate de la mistreți din județul Buzău, în funcție de fondul de vânătoare Table 6.2 The number of wild boars samples, harvested from Buzău County, depending on the hunting founds	74
Tabelul 6.3 Valorile de referință ale raportului S/P pentru interpretarea rezultatelor / Table 6.3 The reference values of the S/P ratio for the interpretation of ELISA results	75

Tabelul 6.4 Seroprevalența aparentă a anticorpilor IgG anti-VHE la mistreții analizați / Table 6.4 HEV apparent seroprevalence in the analyzed wild boars	76
Tabelul 6.5 Seroprevalența anticorpilor IgG anti-VHE la mistreții analizați din județul Galați, în funcție de categoria de vârstă / Table 6.5 Seroprevalence of IgG anti-HEV antibodies in tested wild boars, in Galati County, by age category	76
Tabelul 7.1 Distribuția animalelor testate din fiecare județ, în funcție de specia analizată / Table 7.1 Distribution of tested animals in each county, by analysed species	82
Tabelul 7.2 Date cu privire la probele recoltate de la mistreți / Table 7.2 Data regarding the samples collected from wild boars	83
Tabelul 7.3 TaqMan - RT-PCR: reactivi și program de amplificare / Table 7.3 TaqMan - RT-PCR: reagents and amplification program	85
Tabelul 7.4 Primerii utilizați pentru amplificarea regiunii de interes prin RT-nested PCR / Table 7.4 Primers used to amplify the region of interest by RT-nested PCR	86
Tabelul 7.5 Revers-transcripția: reactivi și program de amplificare / Table 7.5 Reverse-transcription: reagents and amplification program	86
Tabelul 7.6 PCR - 1: reactivi și program de amplificare / Table 7.6 PCR - 1: reagents and amplification program	87
Tabelul 7.7 PCR - 2: reactivi și program de amplificare / Table 7.7 PCR - 2: reagents and amplification program	87
Tabelul 7.8 Identificarea probelor pozitive ARN-VHE și rezultatele specifice acestora / Table 7.8 Identification of positive RNA-HEV samples and their specific results	89
Tabelul 7.9 Date despre probele testate și prevalența obținută / Table 7.9 Data on the tested samples and obtained prevalence of HEV infection	90
Tabelul 7.10 Procentele de similaritate nucleotidică dintre secvențele VHE obținute / Table 7.10 Nucleotides similarity between the obtained HEV sequences	92
Tabelul 7.11 Numerele de acces în GenBank pentru izolatele obținute / Table 7.11 GenBank access numbers for the obtained isolates	92
Tabelul 8.1 Distribuția șobolanilor testați din fiecare județ, în funcție de locația de captură / Table 8.1 Distribution of tested rats per county, depending on the capturing location	103
Tabelul 8.2 Primerii utilizați pentru amplificarea regiunii de interes prin RT-nested PCR / Table 8.2 Primers used to amplify the region of interest by RT-nested PCR	105
Tabelul 8.3 PCR - 1: Reactivi și program de amplificare / Table 8.3 PCR - 1: reagents and amplification program	105

Tabelul 8.4 PCR - 2: reactivi și program de amplificare / Table 8.4 PCR - 2: reagents and amplification program	106
Tabelul 8.5 Primerii utilizați pentru amplificare regiunilor de interes prin cele două protocoale PCR / Table 8.5 Primers used to amplify the regions of interest by the two PCR protocols	107
Tabelul 8.6 Rezultatele obținute în funcție de județul din care au provenit șobolanii / Table 8.6 The obtained results by rat origin county	109
Tabelul 8.7 Rezultatele obținute în funcție de locația de capturare a șobolanilor / Tabelul 8.7 The obtained results by capturing location	110
Tabelul 8.8 Datele de identificare a izolatelor obținute / Table 8.8 Identification data for the obtained isolates	112
Tabelul 8.9 Procentele de similaritate nucleotidică dintre secvențele VHE obținute de la șobolani / Table 8.9 Nucleotide similarity between the HEV sequences obtained from rats	112
Tabelul 9.1 Distribuția pacienților testați din cadrul Spitalului de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași, în funcție de categoria de vârstă și de unitatea de preluare / Table 9.1 Distribution of tested patients from "Sfanta Parascheva" Infectious Diseases Hospital of Iasi, depending on the age category and the sampling unit	120
Tabelul 9.2 Distribuția pacienților testați din cadrul Spitalului Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani, în funcție de încadrarea așezărilor umane și de secția de spitalizare / Table 9.2 Distribution of tested patients from Emergency County Hospital „St. Pantelimon” Focsani, depending on human settlements and the hospitalization section	121
Tabelul 9.3 PCR - 1: reactivi și program de amplificare / Table 9.3 PCR - 1: reagents and amplification program	122
Tabelul 9.4 PCR - 2: reactivi și program de amplificare / Table 9.4 PCR - 2: reagents and amplification program	122
Tabelul 9.5 Seroprevalența anticorpilor totali anti-VHE la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută, în funcție de categoria de vârstă / Table 9.5 Seroprevalence of total anti-HEV antibodies in patients with acute hepatitis of unknown cause, by age group	124
Tabelul 9.6 Prevalența anticorpilor totali anti-VHE la pacienții fără afecțiuni hepatice, în funcție de încadrarea așezărilor umane / Table 9.6 Seroprevalence of total anti-HEV antibodies in patients without liver disease depending on human settlements	126
Tabelul 9.7 Date privind probele testate și identificarea celor ARN VHE pozitive / Table 9.7 Data on tested samples and identification of positive HEV RNA samples	127

ANEXA 3 LISTA FIGURILOR

ANNEX 3 LIST OF FIGURES

	pag
Figura 1.1 Încadrarea taxonomică a VHE / Figure 1.1 Taxonomy of HEV	35
Figura 1.2 Reprezentarea filogenetică a tulpinilor de referință a membrilor familiei Hepeviridae / Figure 1.2 Phylogenetic tree of representative members of the Hepeviridae family	36
Figura 1.3 Reprezentarea schematică a organizării genomului VHE / Figure 1.3 A schematic diagram of the organization of the HEV genome	38
Figura 1.4 Reprezentarea schematică a ciclul de replicare al VHE / Figure 1.4 Proposed replication cycle of HEV	40
Figura 1.5 Căi de transmitere a VHE / Figure 1.5 Transmission routes of HEV	42
Figura 1.6 Distribuția geografică a cazurilor de hepatită E la om / Figure 1.6 Geographical distribution of human cases of Hepatitis E	43
Figura 1.7 Dinamica infecției cu VHE la om / Figure 1.7 Dynamics of human HEV infection	45
Figura 1.8 Dinamica infecției cu VHE la suine / Figure 1.8 Dynamics of swine HEV infection	46
Figura 2.1 Distribuția geografică a VHE la animalele terestre / Figure 2.1 Geographical distribution of hepatitis E virus in terrestrial animals.	52
Figura 4.1 Diferite căi de transmitere a VHE cu caracter zoonotic / Figure 4.1 Different routes of transmission of zoonotic HEV	62
Figura 4.2 Tipul definiției de caz aplicate pentru infecțiile cu VHE în 20 de țări din Uniunea Europeană și Spațiul Economic European, 2015 / Figure 4.2 Type of applied case definition for confirmed cases of hepatitis E virus infection in 20 European Union/European Economic Area (EU/EEA) countries, 2015	65
Figura 4.3 Transmiterea experimentală a VHE între speciile receptive / Figure 4.3 Experimental inter-species transmissions of HEV	67

Figura 6.1 Distribuția geografică a județelor și a fondurilor de vânătoare din care au provenit animalele supuse analizei / Figure 6.1 Geographical distribution of counties and hunting funds, from which the analyzed animals originated	72
Figura 6.2 Aspecte ale plăcii ELISA din diferite etape de lucru ale testării / Figure 6.2 Aspects of the ELISA plate from various stages of testing	75
Figura 6.3 Fondurile de vânătoare în care au fost identificați mistreții IgG anti-VHE pozitivi din județul Galați / Figure 6.3 The hunting funds, from Galați County, in which positive anti-HEV IgG wild boars were identified	77
Figura 6.4 Fondurile de vânătoare în care au fost identificați mistreții IgG anti-VHE pozitivi din județul Buzău / Figure 6.4 The hunting funds, from Buzău County, in which positive anti-HEV IgG wild boars were identified	77
Figura 7.1 Distribuția geografică a județelor incluse în studiu, cu reprezentarea speciilor analizate / Figure 7.1. Geographical distribution of the counties included in the study, with the representation of the analyzed species	82
Figura 7.2 Reprezentarea grafică a curbelor de amplificare TaqMan - RT-PCR / Figure 7.2 TaqMan - RT-PCR amplification curves	89
Figura 7.3 Profilele electroforetice ale produșilor RT-nested PCR / Figure 7.3 Electrophoretic profiles of RT-nested PCR products	91
Figura 7.4 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage și de referință pentru fiecare subtip din baza de date GenBank / Figure 7.4 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank and with the reference strains of each HEV3 subtype	94
Figura 7.5 Distribuția geografică a județelor în care au fost efectuate cercetări cu privire la infecția cu VHE la mistreți / Figure 7.5 Counties searched in previous and the current study for VHE infection in wild boar population in Romania	97
Figura 8.1 Distribuția geografică a județelor incluse în studiu, cu reprezentarea speciilor analizate / Figure 8.1. Geographical distribution of the counties included in the study, with the representation of the analyzed species	102
Figura 8.2 Profilul electroforetic al unor produși RT-nested PCR - specific genotipurilor 1-4/ Figure 8.2 Electrophoretic profile of some products of RT-nested PCR specific for HEV 1-4 genotypes	108
Figura 8.3 Profile electroforetice ale unor produși RT-nested PCR pentru detecția hepevirusurilor / Figure 8.3 Electrophoretic profile of some products of RT-nested PCR for hepeviruses	109
Figura 8.4 Profilul electroforetic al produșilor PCR-ORF2 / Figure 8.4 The electrophoretic profile of the PCR-ORF2 products	110

Figura 8.5 Profilul electroforetic al produşilor PCR-ORF1 / Figure 8.5 The electrophoretic profile of the PCR-ORF1 products	111
Figura 8.6 Profilul electroforetic al produşilor RT-nested PCR obţinuţi din probe de la suine / Figure 8.6 The electrophoretic profile of RT-nested PCR products obtained from the swine samples	111
Figura 8.7 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvenţelor obţinute cu cele omoloage şi de interes din baza de date GenBank / Figure 8.7 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank	113
Figura 9.1 Date privind originea probelor preluate / Figure 9.1 Data of tested samples	120
Figura 9.2 Asocierea dintre infecţia VHE semnalată şi categoria de vârstă / Figure 9.2 HEV infection associated with age category	124
Figura 9.3 Identificarea probelor IgM anti-VHE cu rezultate intens pozitive în diferite etape de lucru ale testării ELISA / Figure 9.3 Identification of IgM anti-VHE intense positive samples in different stages of the ELISA testing	125
Figura 9.4 Date privind probele testate pentru detecţia anticorpilor IgM anti-VHE şi rezultatele obţinute / Figure 9.4 Data on tested samples for IgM anti-HEV antibodies and obtained results	125
Figura 9.5 Profilul electroforetic al unor produş RT-nested PCR / Figure 9.5 Electrophoretic profile of some RT-nested PCR products	127
Figura 9.6 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvenţelor obţinute cu cele omoloage şi de referinţă pentru fiecare subtip din baza de date GenBank / Figure 9.6 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank and with the reference strains of each HEV3 subtype	129

ANEXA 4 LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4 SCIENTTIFIC PAPERS

În calitate de prim autor:

1. **Porea D.**, Anita A., Demange A., Raileanu C., Oslobanu Ludu L., Anita D., Savuta G., Pavio N., 2017 - Molecular detection of hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania. *Transbound Emerg Dis.* 00:1-7, doi: 10.1111/tbed.12736. IF 3.585
2. **Porea D.**, Anita A., Paslaru A., Savuta G., 2016 - Wild boar hepatitis E seroprevalence in hunting funds from Buzău and Galați counties. *Buletin USAMV Cluj-Napoca*, 73 (1): 44 - 48.
3. **Porea D.**, Anita A., Paslaru A., Savuta Ghe., 2015 - Serological evidence of wild boar hepatitis E infection in three counties from eastern Romania. *Lucrări Științifice –Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara*, 48 (3): 174 – 178.

În calitate de coautor:

1. Camp J. V., Haider R., **Porea D.**, Oslobanu L. E., Forgách P., Nowotny R., 2018 - Serological surveillance for Tahyna virus (California encephalitis orthobunyavirus, Peribunyaviridae) neutralizing antibodies in wild ungulates in Austria, Hungary, and Romania. *Zoonoses and Public Health*, in press. IF 2.323
2. Raileanu C., Moutailler S., Pavel I., **Porea D.**, Mihalca A. D., Savuta G. and VayssierTaussat M. , 2017 – Borrelia Diversity and Co-infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:36. doi: 10.3389/fcimb.2017.00036. IF 5.2
3. Aniță A., **Porea D.**, Văță A., Aniță D., Oșlobanu L., Savuța G., 2016 - Hepatitis E: A One Health Approach in North-Eastern Romania. *One Health International Journal*, 2: 90-94.
4. Paslaru A., **Porea D.**, Savuta G., Oslobanu L., 2016 – West Nile Virus serosurveillance in wild boars from the East of Romania. *Buletin USAMV Cluj Napoca*, 73 (1): 148 - 148.

5. Anita A., **Porea D.**, Anita D., Savuta G., 2015 - Serological study of selected viral pathogens in wild boar from Eastern Romania. *Lucrari Stiintifice - Medicina Veterinara, USAMV Iași*, 58 (3): 423 – 427.
6. Paslaru A., Oslobanu L., **Porea D.**, Savuta G., 2015 - Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their relevance as disease vectors in the east of Romania. *Lucrări Științifice –Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara* , 48 (3): 140 -146.
7. Raileanu C., **Porea D.** and Savuța G.,2015 - Prevalence of Ixodid ticks on animals in eastern Romania. *Lucrari Stiintifice - Medicina Veterinara, USAMV Iași*, 58 (3): 569-574.
8. Raileanu C., Anită A., **Porea D.** and Savuța G., 2015 - Serologic evidance of Crimean – Congo hemorrhagic fever infection in small ruminants in southern Romania. *Journees Scientifiques, AEEMA*.
9. Raileanu C., Anită A., **Porea D.** and Savuța G., 2015 - Serological survey of Lyme disease in dogs from Eastern Romania. *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara* , 48 (3): 179 – 184.
10. Cozma A., Carp Cărare M., Carp Cărare C., **Porea D.**, Guguianu E., Rîmbu C., Mareș M., 2015 - The Prevalence of ESBL-Producing Strainsof *E. coli* and *K. pneumoniae*, Isolated from Pets Treated with Antibiotics - Preliminary Remarks. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 72(2).