

pt.: "Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) w żywności pochodzenia zwierzęcego"

Streszczenie

Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) jest hepatowirusem wywołującym infekcje u człowieka i wielu gatunków zwierząt. HEV należy do *Orthohepevirusów* w obrębie rodziny *Hepeviridae*, która obejmuje ssacze i ptasie szczepy wirusa. Zachorowania człowieka powodują szczepy HEV należące do genotypu 1 – 4, przy czym szczepy gt 3, 4 i 7 są zoonotyczne. Wśród zwierząt gospodarskich najczęściej zakażeń HEV obserwuje się u świń i królików, natomiast dziki i jelenie uważane są za sylwatyyczny rezerwuuar wirusa. Do zakażenia człowieka HEV dochodzi drogą pokarmową za pośrednictwem zanieczyszczonej żywności i wody. Żywność pochodzenia zwierzęcego stanowi główne źródło zakażenia ze względu na obecność wirusa w tkankach bezobjawowo zakażonych zwierząt skierowanych do uboju. Infekcje HEV u zwierząt nie prowadzą do śmierci i związanych z tym strat w hodowlach, ale zakażenia u ludzi, a w szczególności u kobiet ciężarnych mogą powodować poważne skutki zdrowotne.

Celem badań była molekularna i serologiczna ocena występowania zakażeń HEV u królików rzeźnych, a także wykrywanie wirusa we krwi i wątrobie wieprzowej stanowiącej surowiec do produkcji wędlin podrobowych. Ważnym elementem pracy była adaptacja zestawu ELISA przeznaczonego do diagnostyki HEV u człowieka, który zastosowano do wykrywania przeciwciał anti-HEV w surowicy królików, jak również identyfikacja zoonotycznych szczepów wirusa u zwierząt gospodarskich włączanych w łańcuch żywienia człowieka. Ponadto próbki krwi świńskiej i wątrób wieprzowych analizowano pod kątem obecności adenowirusa świń (pAdV), jako wirusowego wskaźnika zanieczyszczenia żywności enterowirusami. Do badań użyto łącznie 1210 próbek, na które składały się pary krwi i wątrób króliczych (n=482), a także pulowane próbki krwi świńskiej (n=146) i wątrób wieprzowych (n=100). Króliki pochodziły z hodowli drobnotowarowych znajdujących się w województwie podkarpackim i wielkopolskim oraz z hodowli wielkotowarowych z województwa mazowieckiego. Natomiast świnię utrzymywane były w gospodarstwach znajdujących się na terenie województw środkowej i wschodniej Polski. Ponadto u świń

oceniano zależność pomiędzy wielkością obsady zwierząt na fermach, sposobem żywienia i utrzymania, a częstością występowania zakażeń HEV. Wątroby wieprzowe zostały zakupione w lokalnych sklepach mięsnych, natomiast próbki krwi świńskiej, wątroby i krew królików pobierano w trakcie uboju zwierząt.

Izolację kwasów nukleinowych z próbek krwi oraz wątrób królików i świni przeprowadzono metodą kolumnkową z wykorzystaniem zestawu QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Detekcję HEV RNA w próbkach żywności wykonano metodą duplex real-time RT-qPCR, natomiast jednostopniowym real-time RTPCR wykrywano materiał genetyczny kaliciwirusa kotów (FCV) stanowiący kontrolę procesu analizy próbki. Do identyfikacji DNA pAdV w żywności również stosowano real-time PCR. Identyfikację genotypu i podtypu wykrytych szczepów HEV świni i królika przeprowadzono w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych fragmentu ORF2 lub ORF 2/3 w genomie HEV.

Wyniki optymalizacji koncentracji białka A używanego jako koniugatu w zaadaptowanym zestawie ELISA do wykrywania przeciwciał anti-HEV w surowicach królików poddano analizie statystycznej z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji oraz analizy wariancji dla doświadczenia dwuczynnikowego z interakcją (ANOVA). Różnice w prewalencji HEV u królików pochodzących z ferm drobno- i wielkotowarowych oraz w próbkach wątrób i krwi wieprzowej oceniano testem *t*-Studenta. Istnienie korelacji pomiędzy wynikami badań królików otrzymanymi metodą ELISA i PCR oceniano testem niezależności chi-kwadrat (χ^2). Do oceny różnic w częstości występowania HEV i pAdV w wątrobach i krwi świń pochodzących z małych, średnich i dużych gospodarstw zastosowano metodę analizy wariancji z wyznaczeniem przedziałów ufności.

Przeprowadzono adaptację komercyjnie dostępnego zestawu ELISA przeznaczonego do wykrywania swoistych przeciwciał anti-HEV w surowicy człowieka do identyfikacji zakażeń HEV u królików. W badaniach jako koniugatu użyto białka A wykazującego reaktywność z przeciwciałami klasy IgG człowieka i królika. Jego optymalną koncentrację ustalono na podstawie badania szeregu rozcieńczeń wobec panelu króliczych surowic kontrolnych i surowic załączonych do zestawu. Następnie przy użyciu zmodyfikowanego zestawu ELISA badaniu poddano 482 próbki surowic króliczych. Obecność przeciwciał anti-HEV IgG stwierdzono w 6% (29/482) badanych próbek surowic, natomiast wirusowe RNA w 14,9% (72/482) wątrób króliczych pozyskanych od zwierząt utrzymywanych jedynie na fermach drobnotowarowych. Analizując wyniki badań serologicznych (ELISA) i molekularnych (PCR) nie

zaobserwowano istotnych różnic w częstości występowania HEV u królików pochodzących z ferm drobno- i wielkotowarowych ($t = 2,675$, $p = 0,015 < 0,05$ dla ELISA i $t = 2,705$, $p = 0,014 < 0,05$ dla PCR).

Analiza filogenetyczna króliczych szczepów HEV przeprowadzona w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentów ORF2 i ORF 2/3 wskazała na ich przynależność do HEV gt 3 podtypu ra. HEV obecny był również we krwi (5/146; 3,4%; 95% CI: 1,1 – 7,8) jak i wątrobie wieprzowej (1/100; 1,0%; 95% CI: 0,0 – 5,0). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wirusa pomiędzy próbkami krwi i wątrób ($t = 1,33$; $p = 0,182 > 0,05$). Z kolei u świni wykazano obecność gt 3 HEV o podtypie e i f. PAdV wykrywany był wyłącznie we krwi spożywczej (19/146; 13,0%; 95% CI: 8,0 – 19,5). Analiza sekwencji nukleotydowych fragmentu genu kodującego białko heksonu pAdV dowiodła, że szczepy adenowirusa należą do serotypu 5 i wywołują one zakażenia układu oddechowego, a nie pokarmowego świń. Obecność pAdV w próbkach krwi nie wynikała z ich zanieczyszczenia kałem zwierząt. W związku z powyższym detekcja pAdV bez identyfikacji serotypu wirusa jako wskaźnika zanieczyszczenia żywności enterowirusami ma znikomą wartość. Częstość występowania HEV i pAdV w tkankach zwierząt pochodzących ze stad o różnej wielkości bez względu na region ich utrzymywania nie różniła się statystycznie ($F = 0,81$, $p = 0,447 > 0,05$ dla HEV; $F = 0,42$, $p = 0,655 > 0,05$ dla pAdV). Również sposób żywienia i utrzymania zwierząt nie miał istotnego wpływu na częstość zakażeń HEV u świń skierowanych do uboju.

Dotychczas w Polsce nie prowadzono badań mających na celu identyfikację zakażeń HEV wśród zwierząt włączanych w łańcuch żywnościowy człowieka, jak również nie badano żywności pochodzenia zwierzęcego w kierunku obecności HEV. W tym celu do badań serologicznych królików rzeźnych zaadaptowano komercyjnie dostępny ELISA *recomWell* HEV IgG do wykrywania swoistych przeciwciał anty-HEV w surowicach ubijanych zwierząt. Ponadto dowiedziono obecności zoonotycznych szczepów HEV o genotypie 3 w wątrobach króliczych i wieprzowych, a także spożywczej krwi wieprzowej, wskazując na istnienie ryzyka związanego z transmisją wirusa na człowieka za pośrednictwem żywności pochodzenia zwierzęcego.

Summary

Hepatitis E virus (HEV) is a hepatovirus causing infections in humans and several animal species. HEV belongs to *Orthohepeviruses* within *Hepeviridae* family which encompasses mammalian and avian virus strains. Infections in humans are caused by HEV

of 1 – 4 genotypes (gt). Among them only strains gt 3, 4 and 7 are zoonotic. Farm animals, such as pigs and rabbits are mainly infected with the virus, whereas wild boar and deer are its sylvatic reservoirs. Food of animal origin is the major source of the virus and consumption of contaminated food could result in human infection. HEV infections in animals are not fatal as well as they do not cause breeding losses, but in humans, especially in pregnant women can result in serious health problems.

The aim of the study was a molecular and serological assessment of the occurrence of HEV infections in slaughtered rabbits. Furthermore, a virus detection in samples of pig's edible blood and liver used for production of offal-derived foodstuffs was performed. An important part of this research was an adaptation of an ELISA kit used for testing of human sera for the presence of the anti-HEV antibodies in rabbits. Subsequently, the identification of zoonotic virus strains in animals entering the food chain was also conducted. In addition, samples of pig's edible blood and liver were analyzed for the presence of porcine adenovirus (pAdV) being an index virus of food contamination by other faecally derived enteric viruses. In total, 1210 samples, encompassing the pairs of rabbit's blood and livers (n=482), as well as samples of pigs' livers (n=100) and pooled pig's blood (n=146) were used in the study. The slaughtered rabbits were raised on the small-scale farms located in Wielkopolska and Podkarpackie provinces and on commercial rabbits farms from Mazovia province. In the case of pigs they originated from farms of central and eastern Polish provinces. Moreover, in slaughtered pigs the relationship between farm size (the number of animals raised), feeding type, housing system, and frequency of HEV infections was assessed. The pigs' livers were purchased from the local meat retailers, while samples of pigs' and rabbits' blood including rabbits' livers were taken during their slaughter.

The isolation of viral RNA from samples of rabbits' blood as well as rabbits' and pigs' livers was performed using a QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Detection of HEV RNA in food samples was conducted by the use of a duplex real-time RT-qPCR method, while the presence of a feline calicivirus (FCV) constituting a food sample process control was detected by a one-step real-time RTPCR. Detection of pAdV DNA was done by the real-time PCR. For the identification of the genotype and subtype of porcine and rabbit HEV strains, the nucleotide sequence analyses of the HEV ORF2 and/or ORF 2/3 genome fragments were conducted.

One- and two-way analysis of variance (ANOVA) with an interaction was used for a statistical assessment of an optimal protein A (conjugate) concentration to be used in the adapted ELISA kit for the detection of specific anti-HEV antibodies in rabbits' sera. The differences in HEV occurrence in rabbits originating from small- and large-scale commercial farms, as well as in pigs' livers and blood samples were assessed using a Student's t-test. Additionally, a chi-square (χ^2) independence test was applied to check the presence of a correlation between serological and molecular results of the prevalence of HEV infections in rabbits. Furthermore, the analysis of variance with confidence intervals was used to assess the differences in a frequency occurrence of HEV and pAdV in liver and blood of slaughtered animals originating from small, medium and large farms.

The protein A was adopted in ELISA kit for the detection of HEV infections in rabbits as it showed a cross reactivity with human and rabbit IgG antibodies. To determine its optimal concentration several dilutions of protein A were tested against the panel of rabbit's control sera and those included in ELISA kit. Subsequently, the modified ELISA was used for the detection of anti-HEV antibodies in 482 rabbit sera. The presence of anti-HEV IgG was shown in 6% (29/482) sera samples. Viral RNA was found in 14.9% (72/482) rabbit livers collected from animals raised only on the small-scale rabbit farms. When serological (ELISA) and molecular (PCR) results were analysed, there were no significant differences observed in the frequency of HEV infections between rabbits from small-scale and large commercial farms ($t = 2.675$, $p = 0.015 < 0.05$ for ELISA and $t = 2.705$, $p = 0.014 < 0.05$ for PCR). A phylogenetic analysis of the ORF2 and ORF2/3 genome fragments of rabbit HEV strains showed that they belong to the group of HEV gt 3 strains of "ra" subtype.

HEV RNA was detected in both pig's blood (5/146; 3.4%; 95% CI: 1.1 – 7.8) and liver (1/100; 1.0%; 95% CI: 0.0 – 5.0) intended for human consumption with no significant differences observed in the frequency of virus occurrence between these by-products ($t = 1.33$; $p = 0.182 > 0.05$). The phylogenetic analysis of ORF2 nucleotide sequences of detected swine HEV strains showed their affiliation to the 3f and 3e subtype groups. PAdV was only found in pig's blood (19/146; 13.0%; 95% CI: 8.0 – 19.5). The nucleotide sequences of the fragment of the hexon capsid protein gene were all classified to the respiratory pAdVs of serotype 5. Of note is that their presence in blood did not result from fecal contamination. This finding indicates that the use of pAdV as an indicator of fecal

contamination of food may have a limited value when identification of the virus serotype is not performed.

The number of animals raised on the farm and geographical location of the farms in Poland had no influence on the occurrence of HEV and pAdV infections in pigs ($F = 0.81$, $p = 0.447 > 0.05$ for HEV; $F = 0.42$, $p = 0.655 > 0.05$ for pAdV). Likewise, the feeding type and housing system had also no significant influence on the frequency of HEV infections in slaughtered pigs.

Nowadays, there were no studies conducted in Poland aiming the identification of HEV infections in animals entering the food chain, and testing the food of animal origin for the presence of HEV. For the purpose of detection of HEV specific antibodies in slaughtered rabbits, the ELISA recomWell HEV IgG (human) was employed. Moreover, the presence of zoonotic gt 3 HEV strains in rabbits' and pigs' livers, as well as in edible pig's blood was shown. This could indicate at a possible risk of virus transmission to humans *via* food of animal origin.