

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Branislav I. Kureljušić

**ISPITIVANJE IMUNOFENOTIPA  
MONONUKLEARNOG ĆELIJSKOG  
INFILTRATA U JETRI SVINJA PRIRODNO  
INFICIRANIH VIRUSOM HEPATITISA E**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Branislav I. Kureljušić

**ISPITIVANJE IMUNOFENOTIPA  
MONONUKLEARNOG ĆELIJSKOG  
INFILTRATA U JETRI SVINJA PRIRODNO  
INFICIRANIH VIRUSOM HEPATITISA E**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Branislav I. Kureljušić

**IMMUNOPHENOTYPING OF MONONUCLEAR  
CELL INFILTRATE IN SWINE LIVER NATURALLY  
INFECTED WITH HEPATITIS E VIRUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

**Mentor:**

**dr Milijana Knežević, redovni profesor u penziji,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za patološku morfologiju**

**Članovi komisije:**

dr Milijana Knežević, redovni profesor u penziji,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za patološku morfologiju,

dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za patološku morfologiju,

dr Dragan Delić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet  
Klinika za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije,

dr Vojin Ivetić, viši naučni saradnik,  
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd  
Odeljenje za patološku morfologiju

**Datum odbrane:**

# ISPITIVANJE IMUNOFENOTIPA MONONUKLEARNOG ĆELIJSKOG INFILTRATA U JETRI SVINJA PRIRODNO INFICIRANIH VIRUSOM HEPATITISA E

## REZIME

U ovoj disertaciji ispitano je 233 rektalna brisa od klinički zdravih svinja, različitih uzrasnih kategorija, poreklom sa četiri farme, na prisustvo nukleinske kiseline virusa hepatitisa E metodom RT-PCR. Pored toga, RT-PCR, bakteriološkom i PCR analizom su ispitani uzorci jetre od 12 svinja kod kojih je RT-PCR nalaz iz uzorka rektalnog brisa pokazao prisustvo HEV RNK. Kod 12 svinja kod kojih je metodom RT-PCR u uzorku rektalnog brisa utvrđena nukleinska kiselina virusa hepatitisa E, izvršena je punkcija *vena cava cranialis* i uzeta je krv za biohemijska ispitivanja. Nakon koagulisanja krvi i izdvajanja seruma uz pomoć poluautomatskog biohemijskog spektrofotometra određeni su sledeći parametri: ukupni proteini, albumini, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT),  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza (GGT) i ukupni bilirubin.

Histopatološka i imunohistohemijska analiza urađena je na uzorcima jetre koji su fiksirani u 10% neutralnom formalinu, obrađeni u automatskom tkivnom procesoru i uklopljeni u parafin. Parafinski isečci debljine oko 3-5 $\mu$ m bojeni su hematoksilin-eozin i *Masson* trihrom metodom. Imunofenotipizacija ćelija mononuklearnog infiltrata izvršena je streptavidin-biotin (LSAB2) metodom i tehnikom dvostrukog imunohistohemijskog bojenja, uz upotrebu antitela za CD3 i CD79. Ekspresija TGF $\beta$ <sub>1</sub> molekula postignuta je streptavidin-biotin (LSAB2) metodom. Za procenu gustine i distribucije limfocitno – plazmaćelijskog infiltrata u jetri korišćena je semikvantitativna analiza. Broj CD3 i CD79 pozitivnih ćelija u jetri određen je morfometrijskom analizom. Pored deskriptivnih statističkih parametara upotrebljeni su ANOVA i *Tukey* test.

Ukupno je ispitano 233 svinje, od kojih je kod dvanaest u uzorku rektalnog brisa dokazana HEV RNK (5,15%). Istovremeno prisustvo HEV RNK u uzorku rektalnog brisa i jetre je ustanovljeno kod pet svinja (41,67%). U dvanaest uzoraka jetre nije dokazano prisustvo aerobnih i anaerobnih bakterija i genoma svinjskog cirkovirusa tip 2.

Biohemijskim ispitivanjem seruma nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima ukupnih proteina, albumina i AST između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe. Statistički veoma značajna razlika ( $p < 0.01$ ) između inficiranih svinja i kontrolne grupe je utvrđena za ALT, dok je za vrednosti GGT i ukupnog bilirubina razlika između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe bila statistički značajna ( $p < 0.05$ ).

Kod 12 ispitanih svinja makroskopskim pregledom ustanovljeno je blago povećanje jetre, dok je izrazito dilatirana žučna kesa ustanovljena u četiri slučaja (33,33%). U šest slučajeva (50%), ustanovljeno je uvećanje portnih limfnih čvorova.

Histološkim pregledom uzoraka jetre svinja inficiranih virusom hepatitisa E dominantan nalaz čini mononuklearni ćelijski infiltrat različite distribucije i gustine. Hepatociti su pokazivali različit stepen degeneracije. U nekim uzorcima jetre u centrolobularnom i srednjezonalnom području uočavaju se znaci hepatocelulolize, sve do potpunog iščezavanja ostataka hepatocita. Kao posebno interesantan nalaz ističe se prisustvo pojedinačnih acidofilnih hepatocita okruženih svetlom halo zonom što se uklapa u morfološku sliku apoptoze. Opisane histopatološke promene upućuju na akutni virusni hepatitis sa nekroinflamatornim promenama u tkivu jetre, bez narušavanja arhitekture lobulusa jetre. U nekim uzorcima jetre inficiranih svinja prisutna je povećana količina vezivnog tkiva u portnim prostorima i u susednim lobulusima u vidu širih ili užih traka. Oba opisana nalaza govore u prilog hroničnom oštećenju jetre i uklapaju se u sliku fibroze.

Dominantnu ćelijsku populaciju u mononuklearnom ćelijskom infiltratu čine CD3 pozitivni limfociti. Populacija CD79 pozitivnih limfocita manje je zastupljena. Infiltrat ovakvog sastava u svih 12 uzoraka (100%) lokalizovan je u portnim prostorima jetre, a u 10 uzoraka (83,33%) i multifokalno u parenhimu jetre. Intenzivnu pozitivnu reakciju na TGF- $\beta_1$  pokazivale su ćelije zapaljenskog infiltrata u uzorcima jetre sa apoptozom hepatocita.

Masivne nekroze hepatocita u centrolobularnom i srednjezonalnom području bile su praćene gustim mononuklearnim infiltratom. Može se pretpostaviti da je broj limfocita u direktnoj povezanosti sa nastalim nekrotičnim procesom. Dobijeni rezultati sugerišu da oštećenje hepatocita nastaje kao posledica imunoreaktivnosti odnosno, ukazuje na značaj prisutnih limfocita u patogenezi oštećenja jetre svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E.

Ispitani odnos između stepena histoloških lezija i biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja je pokazao statistički vrlo značajnu razliku ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupne proteine, AST, ALT i ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za AST i ALT kod inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre; utvrđena je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i svinja sa trećim stepenom oštećenja jetre.

**Ključne reči:** svinja, virus hepatitisa E, RT-PCR, prevalencija, mononuklearni ćelijski infiltrat, imunofenotipizacija.

**Naučna oblast:** Klinička patologija i terapija životinja

**Uža naučna oblast:** Patološka morfologija

**UDK broj:** 619:616

# IMMUNOPHENOTYPING OF MONONUCLEAR CELL INFILTRATE IN SWINE LIVER NATURALLY INFECTED WITH HEPATITIS E VIRUS

## SUMMARY

In this thesis from clinically healthy pigs of different ages, originating from 4 farms, a total of 233 rectal swabs were tested for the presence of HEV RNA by RT-PCR. In addition, liver samples of 12 pigs which were RT-PCR positive to HEV RNA were tested by RT-PCR, bacteriological and PCR analysis. A total of 12 pigs which rectal swabs tested positive by RT-PCR analysis were further on sampled by puncture of *vena cava cranialis*, as well. After coagulation blood sera were analyzed on a biochemical spectrophotometer and the following parameters were determined: total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT),  $\gamma$  – glutamil transpeptidase (GGT) and total bilirubin.

Histopathological and immunohistochemical analyses were performed on liver samples fixed in 10% neutral formalin, processed in an automated tissue processor and embedded in paraffin. Paraffin sections about 3-5 $\mu$ m thick were stained with hematoxilin-eosin and by Masson trichrome method. Immunophenotypisation of mononuclear infiltrate cells was carried out by the streptavidin – biotin method (LSAB2) and by the double immunohistochemical staining technique with antibodies for CD3 and CD79. Expression of TGF- $\beta_1$  molecule was obtained by the streptavidin – biotin method (LSAB2). Estimation of the density and distribution of lymphocytic-plasmacytic infiltrate in the liver was done by semiquantitative analysis. The number of CD3 and CD79 positive cells in the liver was determined by morphometric analysis. In addition to descriptive statistical parameters ANOVA and Tukey test were used, as well.

A total of 233 pigs were tested. Out of this number in 12 rectal swabs HEV RNA (5.15%) was confirmed. Concurrent presence of HEV RNA in both rectal and liver samples was determined in 5 pigs (41.67%). In 12 liver samples the presence of aerobic and anaerobic bacteria, as well as circovirus type 2 genome were not confirmed.

Results of blood serum biochemical testing did not show statistical significance between values for total proteins, albumins, and AST between the infected pigs and the control group. A statistically very significant difference ( $p < 0.01$ )



between the infected and the control group was determined for ALT, and a significant difference ( $p < 0.05$ ) was recorded for GGT and total bilirubin.

In 12 tested pigs a slightly enlarged liver was macroscopically specified, while a dilated gallbladder was recorded in four cases (33.33%), and in six pigs (50%) enlarged portal lymph nodes were evident.

Histological examination of liver tissue samples of pigs infected with hepatitis E revealed mononuclear cell infiltrates of different distribution and density. Hepatocytes displayed different levels of degeneration. In some liver samples in the centrilobular and midzonal region signs of hepatocellular lysis were evident, up to the stage of complete loss of hepatocytes. Of special interest is the presence of individual acidophilic hepatocytes surrounded with a light halo zone which fits into the morphological picture of apoptosis. The described histopathological changes point to acute viral hepatitis with necroinflammatory changes in the liver tissue, but without alterations of the lobular liver architecture. In some liver samples from infected pigs there is an increased amount of connective tissue bands in the portal spaces and in the adjacent lobules. Both of the above described findings speak in favor of chronic liver damage and fit into the picture of fibrosis.

In the mononuclear cell infiltrate CD3 positive lymphocytes were dominant, the CD79 positive lymphocyte population was less frequent. Such infiltrate was present in all 12 tested liver samples (100%) and was localized in the portal spaces and in 10 samples (83.33%) were multifocal in the parenchyma. An intensive positive reaction to TGF- $\beta_1$  was displayed by the inflammatory cell infiltrate in liver samples with hepatocyte apoptosis.

Massive necrosis of hepatocytes in the centrilobular and midzonal areas were accompanied by dense mononuclear infiltrate. It can be supposed that the number of lymphocytes is in direct relation to the developed necrotic process. The obtained results suggest that hepatocyte damage is the result of immunoreactivity indicates the importance of the present lymphocytes in the pathogenesis of liver damage of pigs infected with hepatitis E virus.

The studied relationship between the degree of lesions and blood biochemical parameters of infected pigs has shown a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) between the average values for total protein, AST, ALT, and total bilirubin between infected pigs with the first and fourth degree of liver damage, as well as for AST and ALT values between infected pigs with the second and fourth degree of liver damage.

A statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) was described for total bilirubin values between pigs with the first and third degree of liver damage.

**Key words:** pig, hepatitis E virus, RT-PCR, prevalence, mononuclear cell infiltrate, immunophenotipization.

**Scientific field:** Clinical pathology and therapy of animals

**Field of academic expertise:** Pathological morphology

**UDK number:** 619:616

# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE.....   | 3  |
| 3. CILJ I ZADACI.....  | 34 |
| 4. MATERIJAL I METODE.....   | 35 |
| 4.1. Životinje.....  | 35 |
| 4.2. Biohemijska ispitivanja.....  | 35 |
| 4.3. Makroskopski pregled i uzimanje uzoraka.....  | 36 |
| 4.4. Histološko i imunohistohemijsko ispitivanje.....  | 36 |
| 4.5. Semikvantitativna analiza.....  | 38 |
| 4.6. Morfometrijska analiza.....   | 39 |
| 4.7. Molekularna detekcija virusa hepatitisa E.....  | 39 |
| 4.8. Molekularna detekcija svinjskog cirkovirusa tip 2 (PCV2).....                                   | 42 |
| 4.9. Bakteriološka analiza.....  | 42 |
| 4.10. Statistička analiza podataka.....  | 42 |
| 5. REZULTATI.....  | 44 |
| 5.1. Rezultati ispitivanja prevalencije infekcije virusom hepatitisa e.....                          | 44 |
| 5.2. Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi.....   | 45 |
| 5.3. Makroskopski nalaz.....   | 47 |
| 5.3.1. Kontrolna grupa.....  | 47 |
| 5.3.2. Jetra svinja inficiranih virusom hepatitisa E.....  | 47 |
| 5.4. Histopatološki nalaz.....   | 49 |
| 5.4.1. Kontrolna grupa.....  | 49 |
| 5.4.2. Jetra svinja inficiranih virusom hepatitisa E.....  | 49 |
| 5.5. Rezultati semikvantitativne analize.....  | 53 |
| 5.6. Imunohistohemijski nalaz.....   | 54 |
| 5.6.1. CD3.....  | 54 |
| 5.6.2. CD79.....   | 54 |
| 5.6.3. Tehnika dvostrukog imunohistohemijskog bojenja.....   | 55 |
| 5.6.4. TGF- $\beta_1$ .....  | 55 |
| 5.7. Rezultati morfometrijske analize.....   | 58 |
| 5.8. Molekularna detekcija svinjskog cirkovirusa tip 2 (PCV2).....                                   | 58 |
| 5.9. Bakteriološka analiza.....  | 58 |
| 5.10. Odnos između stepena histoloških lezija i biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja..... | 58 |
| 6. DISKUSIJA.....  | 67 |
| 7. ZAKLJUČCI.....  | 72 |
| 8. LITERATURA.....   | 74 |

# 1. Uvod

Virus hepatitisa E (hepatitis E virus – HEV, eng.) se nalazi u svim područjima sveta u kojima postoji intenzivna proizvodnja svinja. Virus hepatitisa E inficira nekoliko životinjskih vrsta, a infekcija uglavnom protiče asimptomatski. Sojevi virusa izolovani kod ljudi i svinja su genetički slični, što ukazuje na potencijalni zoonotski karakter bolesti i mogućnost da su svinje obolele od hepatitisa E izvor infekcije za ljude. Iz ovih razloga Svetska zdravstvena organizacija i Centar za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD ističu mogućnost zoonotskog širenja virusa. Mada je zoonotski potencijal ovog virusa sasvim izvesan, za sada je u svega nekoliko slučajeva u svetu definitivno potvrđeno prenošenje ovog virusa sa životinja na ljude. Više od 60% novootkrivenih infektivnih agenasa u poslednjih nekoliko decenija koji izazivaju oboljenja kod ljudi vode poreklo od životinja ili namirnica životinjskog porekla. Jedan od njih je i virus hepatitisa E, koji iako ne izaziva kliničku sliku oboljenja kod svinja i ekonomske gubitke dobija sve više na značaju zbog zoonotskog potencijala, nedovoljnog poznavanja epizootiologije i patogeneze. U poslednjih nekoliko godina infekcija ljudi virusom hepatitisa E je sve učestalija u razvijenim zemljama na šta ukazuju brojni autohtoni slučajevi infekcije ljudi koji nisu putovali u endemske regione. Ovome je svakako doprinelo usavršavanje postojećih i pronalaženje novih dijagnostičkih postupaka u otkrivanju ovog oboljenja. Veterinari, zatim odgajivači svinja i radnici na klanicama su posebno izloženi riziku od infekcije virusom hepatitisa E, što ovo oboljenje svrstava u grupu profesionalnih oboljenja. Poseban rizik od ove infekcije postoji pri ksenotransplantaciji organa od svinja donora ljudima koji se tako mogu inficirati i prenositi virus na druge ljude. Iz ovih razloga sprovode se brojna istraživanja na ovom polju koja imaju za cilj pronalaženje infektivnog izvora i puteva infekcije ljudi.

U literaturi postoji dosta podataka o prevalenciji HEV infekcije kod svinja u različitim zemljama sveta. Osim toga, brojna istraživanja su bazirana na molekularnoj epizootiologiji i genotipizaciji virusa hepatitisa E. Ispitivanja prevalencije HEV infekcije kod svinja u našoj zemlji su skromna, pa je jedan deo ovih istraživanja bio usmeren u tom pravcu.

Infekcija svinja virusom hepatitisa E nastaje orofekalnim putem, ingestijom hrane i vode kontaminirane virusom ili direktnim kontaktom između inficiranih i zdravih životinja. Patogeneza HEV infekcije kod svinja se razlikuje od patogeneze ove infekcije kod ljudi i nije u svemu dovoljno istražena. Mada je hepatitis E kod svinja definisan kao subkliničko oboljenje, neki autori opisuju promene u koncentracijama pojedinih biohemijskih parametara u krvnom serumu inficiranih svinja. Histološki se u jetri kod inficiranih svinja uočava blaga do umerena limfocitno – plazmaćelijska infiltracija i fokalna područja nekroze hepatocita. Ima naznaka, da virus hepatitisa E, slično kao i drugi virusi, pokreće apoptozu hepatocita uz moguće posredovanje citokina TGF- $\beta_1$ . Istraživanja u kojima je vršeno praćenje ćelijskog imunskog odgovora na infekciju virusom hepatitisa E kod ljudi su pokazala da je oštećenje jetre imunski posredovano i da nastaje najverovatnije kao posledica delovanja citotoksičnih T limfocita i ćelija prirodnih ubica (NK ćelije). Osim toga, postoji i mogućnost direktnog oštećenja hepatocita virusom hepatitisa E.

Imajući u vidu skromna saznanja o patogenezi i mehanizmu nastanka oštećenja hepatocita kod svinja inficiranih virusom hepatitisa E, ispitivanja u ovoj disertaciji su bila usmerena u tom pravcu.

## 2. Pregled literature

Infektivni hepatitis, zapaljenje jetre kod svinja infektivne etiologije, može nastati kao posledica bakterijskih, parazitskih ili virusnih infekcija. Bakterijski hepatitis može biti izazvan različitim vrstama bakterija, i obično nastaje kao posledica sistemske infekcije. *Mycobacterium spp.*, *Clostridium novyi*, *Listeria spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Leptospira spp.*, *Salmonella spp.*, *Brucella spp.*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* su neki od rodova i vrsta bakterija koji mogu izazvati hepatitis kod svinja. *Mycobacterium spp.* i *Brucella spp.* izazivaju hronično granulomatozno zapaljenje jetre koje se karakteriše formiranjem infektivnih granuloma (Nakamura i sar., 1984; Ivetić i Sudarić, 1987; Cvetnić i sar., 2005; Hibiva i sar., 2008.). Listerioza svinja je praćena masivnom nekrozom u jetri čije je periferno područje infiltrirano limfocitima i makrofagima (Long i Dukes, 1972). *Clostridium novyi* je uzročnik infektivnog nekrotičnog hepatitisa koji se karakteriše nalazom fokusa hepatocelularne nekroze različite veličine koja su okružena zonom aktivne hiperemije, dok se kod leptospiroze pored nekroze u jetri mogu uočiti i krvavljenja različitog intenziteta kao i infiltracija inflamatornim ćelijama u periportnim područjima (Delbem i sar., 2002; Garcia i sar., 2009). *Arcanobacterium pyogenes* izaziva gnojni apostematozni hepatitis najčešće kod prasadi u neonatalnom periodu (Takeuchi i sar., 1979; Kume i sar., 1983). Osim *Arcanobacterium pyogenes*, apostematozni hepatitis mogu da izazovu i druge vrste bakterija kao što su: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, a znatno ređe *Citrobacter freundii*, *Proteus sp.* i druge vrste (Tahir i Sheikh-Omar, 1985). Promene u jetri kod salmoneloze svinja uključuju infiltraciju jetre mononuklearnim ćelijskim infiltratom u formi tzv. paratifoznih čvorića, ali i pojavu manjih ili većih nekrotičnih žarišta u jetrinom parenhimu (Murakami i sar., 2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae* se u literaturi pominje kao uzročnik granulomatoznog hepatitisa kod svinja (Ohba i sar., 2008).

Od parazitskih hepatitisa kod svinja, u literaturi se opisuje hepatitis koji nastaje kao posledica migracije larvi *Ascaris suum* kroz jetru i hepatitisi izazvani

larvenim oblicima pantljičara *Taenia hydatigena* i *Echinococcus granulosus*. Makroskopske promene na jetri kod migracije larvi *Ascaris suum* uključuju pojavu mlečnih pega koje variraju u veličini i mogu biti i do 2 centimetra u prečniku. Distribucija mlečnih pega je najčešće na levom i desnom medijalnom i levom lateralnom lobusu jetre. Ukoliko je u pitanju akutna faza askaridoze tada se u jetri uočavaju hemoragično infiltrirana područja koja su praćena i nekrozom. Mikroskopskim pregledom se kod ovog parazitskog hepatitisa može uočiti krvavljenje, nekroza hepatocita, infiltracija lobulusa eozinofilnim granulocitima kao i proširene interlobularne vezivnotkivne septe sa prisutnim tragovima fibrina i velikim brojem eozinofilnih granulocita i makrofaga (Tahir i Sheikh-Omar i sar., 1985; Sanford i sar., 1991, Gjestvang i sar., 2004). Tokom migracije larve *Cysticercus tenuicollis* u jetri se javljaju subkapsularna krvavljenja kao i krvavljenja u samom parenhimu jetre. Krvavljenja nastaju usled migracije larvi koje oštećuju sinusoide jetre. Larveni oblik *Taenia hydatigena* *Cysticercus tenuicollis* se obično uočava na površini jetre obavijen seroznom ovojnicom, dok je larveni oblik *Echinococcus granulosus* lokalizovan češće u samom parenhimu jetre. Cista ehinokokusa je obavijena vezivnotkivnom membranom i ima veliki broj skoleksa (fertilna cista) ili ih uopšte nema (sterilna cista), dok je cista cisticerkusa obavijena tankim seroznim omatačem i ima jedan relativno krupan skoleks (Blazek i sar., 1985; Romig i sar., 2006; Bruzinskaite i sar., 2009).

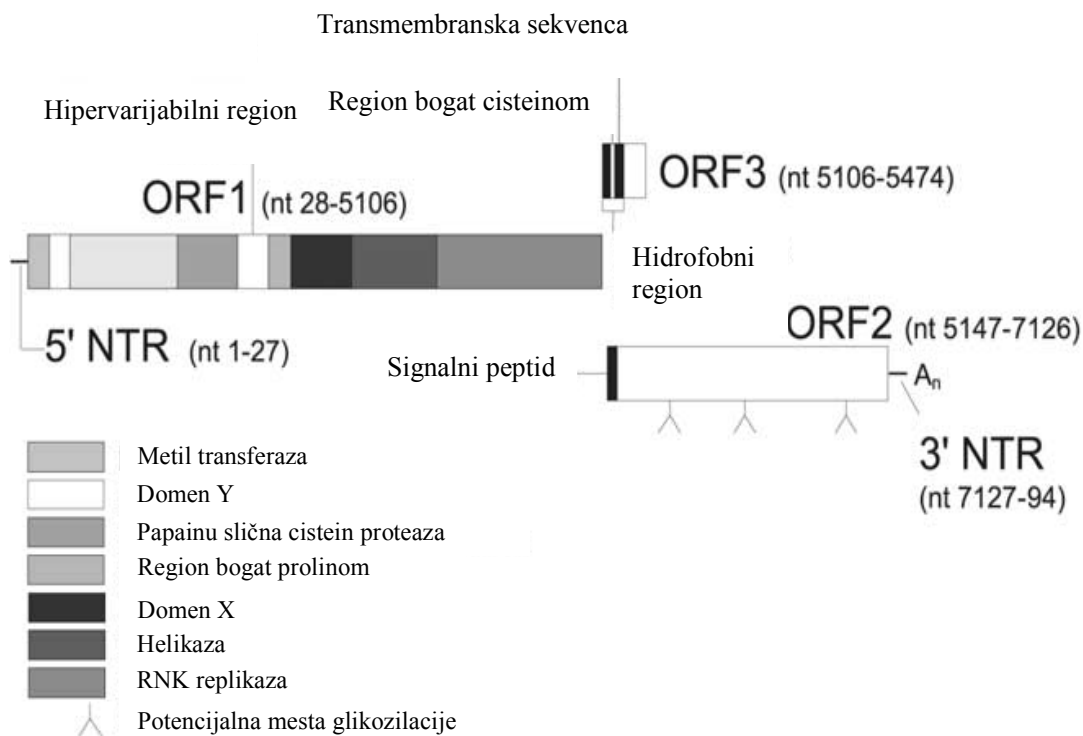
Svinjski cirko virus tip 2 (PCV2) koji izaziva multisistemski sindrom kržljanja zalučene prasadi (postweaning multisystemic wasting syndrome – PMWS, eng.) i virus hepatitisa E su poslednji među virusima koji su prepoznati kao uzročni agensi virusnog infektivnog hepatitisa kod svinja (Martin i sar., 2007). Oboljenje jetre je česta klinička i patomorfološka karakteristika svinja obolelih od PMWS bilo da je u pitanju samo infekcija circo-2 virusom ili koinfekcija i sa parvovirusom svinja (porcine parvo virus – PPV, eng.). Sindrom abortusa i mortaliteta kod krmača (sow abortion and mortality syndrome – SAMS, eng.), teško oboljenje gravidnih krmača, gde je hepatitis primarna lezija, je prvobitno povezivan sa infekcijom virusom reproduktivno-respiratornog sindroma svinja (porcine reproductive and respiratory syndrome virus – PRRSV, eng.). Kasnije je dokazano da u nastanku hepatičnih lezija učestvuje i PCV2. Koinfekcija PCV2 virusom i virusom Aujeckijeve bolesti je dokazana kod svinja obolelih od PMWS sa teškim hepatičnim lezijama. U eksperimentalnim uslovima je dokazano da hepatične lezije mogu nastati kao

posledica sinergističkog dejstva u koinfekciji sa PCV2 i PPV, kao i PCV2 i virusom PRRS. Patomorfološke karakteristike hepatitisa koji nastaje kao posledica delovanja PCV2 virusa su veoma slične hepatitisu koji nastaje kao posledica infekcije sa virusom hepatitisa E, uključujući i prisustvo sincicijelnih ćelija u limfatičnim tkivima (Ellis i sar., 2004).

Virus hepatitisa E je prvobitno bio klasifikovan u familiju *Caliciviridae*. Kasnije je izvršena reklasifikacija, pa je virus svrstan u familiju *Hepeviridae* i rod *Hepevirus* čiji je za sada jedini član. Ovaj rod uključuje sve sojeve otkrivene kod ljudi i kod životinja (Emerson i Purcell, 2003). U populaciji ljudi, virus je prvi put otkriven 1983. godine metodom imunske elektronske mikroskopije (Balayan i sar., 1983). Međutim, još je sredinom XX veka u Nju Delhiju u Indiji opisana velika hidrična epidemija hepatitisa koji nije ličio ni na A ni na B hepatitis pa je bio označen kao non-A, non-B hepatitis. Epidemija je nastala usled konzumiranja kontaminirane vode, a tek je 1980. godine, ispitivanjem zamrznutih seruma od obolelih osoba, serološki dokazano da se radi o novom oboljenju – hepatitisu E (Worm i sar., 2002). Virus svinjskog hepatitisa E, koji je sličan virusu hepatitisa E ljudi, je prvi put izolovan i opisan u SAD 1997. godine (Meng i sar., 1997). Međutim, prva eksperimentalna infekcija svinja azijskim sojem humanog virusa, pri čemu je virus inokulisan intravenski, opisana je još 1990 (Balayan i sar., 1990). Tokom 1995. godine vršena su ispitivanja na svinjama u Nepal u i dokazana je virusna RNK kao i antitela na virus, ali je identitet virusa ostao nepoznat sve do 1997 godine (Clayson i sar., 1995). Jedan od mogućih razloga zašto je svinjski virus hepatitisa E kasnije otkriven u poređenju sa humanim virusom je verovatno i činjenica da virus izaziva subkliničku infekciju svinja.

Virus hepatitisa E ne poseduje omotač, poseduje pozitivno orjentisanu jednolančanu RNK, a dijametar se kreće od 27 do 34nm (Emerson i sar., 2004). Virusni genom sadrži tri „open reading frames“ (ORF) regiona. ORF1 se nalazi na 5' kraju i kodira nestrukturane proteine uključujući RNK zavisnu RNK polimerazu. U okviru ORF1 regiona se nalazi hipervarijabilni region bogat prolinom, za koji se smatra da je odgovoran za replikaciju virusa *in vitro* i *in vivo* uslovima, mada biološki i patogenetski značaj ovog regiona i dalje ostaje nepoznat. ORF2 se nalazi na 3' kraju i kodira proteine kapsida, a ORF3 se nalazi između ORF1 i ORF2 regiona i kodira jedan mali protein sa nejasnom funkcijom (Lu i sar., 2005; Li i sar., 2006; Meng, 2010) (Šema 1.).





**Šema 1.** Organizacija genoma virusa hepatitisa E (Worm i sar., 2002.)

Postoje četiri genotipa virusa hepatitisa E. Genotip 1 je podeljen na 5 subtipova i zastupljen je u Aziji i Africi, a povezan je sa velikim epidemijama kod ljudi izazvanih upotrebom kontaminirane vode, mada je opisana i infekcija svinja ovim genotipom virusa. Genotip 2 je zastupljen u Aziji, Africi, Čadu, Meksiku i Nigeriji i inficira uglavnom ljude. U okviru genotipa 2 postoje dva subtipa virusa. Genotip 3 pored ljudi inficira i svinje u razvijenim zemljama Severne Amerike, Evrope, a dokazan je i u Japanu. Genotip 4 je uglavnom zastupljen u Aziji i povezan je sa sporadičnim slučajevima infekcije ljudi preko namirnica životinjskog porekla. Pojedini sojevi koji pripadaju ovom genotipu inficiraju i svinje. Genotipovi 3 i 4 su takođe ustanovljeni i kod divljih svinja i jelena (Lu i sar., 2005; Zheng i sar., 2006; Caron i sar., 2006). U okviru genotipa 3 postoji deset subtipova, a genotip 4 ima 7 subtipova virusa (Tabela 1.). U područjima gde su ustanovljeni genotip 3 i genotip 4 virusa, sekvence humanih i svinjskih izolata virusa pokazuju visoku konzerviranost što ukazuje na zajedničko poreklo virusa iz istog infektivnog izvora (Lu i sar., 2005; Song, 2010). Uprkos razlikama koje postoje u sekvencama nukleotida kod ova četiri

genotipa virusa, ne postoji mogućnost serološkog razlikovanja i epitopi pokazuju unakrsnu reaktivnost (Li i sar., 2005).

**Tabela 1.** Prikaz osnovnih karakteristika genotipova virusa hepatitisa E

| Genotip   | Broj subtipova | Prijemčiva vrsta                     | Geografska distribucija        |
|-----------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Genotip 1 | 5              | čovjek, svinja                       | Azija, Afrika                  |
| Genotip 2 | 2              | čovjek                               | Azija, Afrika, Meksiko         |
| Genotip 3 | 10             | čovjek, svinja, divlja svinja, jelen | Severna Amerika, Evropa, Japan |
| Genotip 4 | 7              | čovjek, svinja, divlja svinja, jelen | Azija                          |

Postoji i virus hepatitisa E patogen za ptice, koji je prvi put izolovan u SAD 2001. godine iz žuči pilića obolelih od hepatitis – splenomegalija sindroma. Avijarni HEV je genetski različit od sisarskih sojeva virusa hepatitisa E, pokazujući samo oko 50% poklapanja u nukleotidnoj sekvenci tako da verovatno pripada zasebnom rodu u okviru familije *Hepeviridae*. Uprkos značajnim razlikama u nukleotidnoj sekvenci između sisarskih sojeva i avijarnog virusa hepatitisa E, izgleda da ipak pripadaju istom serotipu (Huang i sar., 2004; Meng, 2010).

Hepatitis E je endemsko oboljenje ljudi u Aziji, Africi i Latinskoj Americi. U ovim područjima, hepatitis E predstavlja ozbiljan zdravstveni problem (Aggarwall i Krawczynski, 2000; Krawczynski i sar., 2000). U razvijenim zemljama, HEV infekcija je sporadična kod ljudi, ali vremenom dobija na značaju naročito u Japanu, Severnoj Americi i Evropi, zbog putovanja stanovništva iz tih područja u endemske regione ili zbog konzumiranja termički netretiranog mesa divljih svinja (Tei i sar., 2003). U poslednjih nekoliko godina infekcija ljudi virusom hepatitisa E je sve učestalija u razvijenim zemljama, na šta ukazuju brojni autohtoni slučajevi infekcija ljudi koji nisu putovali u endemske regione. Ovome je svakako doprinelo usavršavanje postojećih i pronalaženje novih dijagnostičkih postupaka u otkrivanju ovog oboljenja. Iz tih razloga sprovode se brojna istraživanja na ovom polju koja imaju za cilj pronalaženje infektivnog izvora i puteva infekcije ljudi (Bachlein i Grummer, 2010). U svetu su opisane brojne hidrične epidemije koje su nastale usled konzumiranja kontaminirane vode (Kasorndorkbua i sar., 2004).

Epidemiološka ispitivanja su pokazala da je infekcija virusom hepatitisa E endemična i u Srbiji, s obzirom na činjenicu da je u humanoj populaciji ustanovljena seroprevalencija od 14,4% (78/538). Naime, seroprevalencija HEV infekcije u zemljama koje nisu endemične za ovu infekciju se kreće od 1,1 do 3% (Delić i sar., 2003.). Istraživači u Srbiji su ustanovili naročito visoku seroprevalenciju anti-HEV IgG kod muških homoseksualaca i kod prostitutki, što objašnjavaju stilom života i odsustvom preventivnih higijenskih mera. Otkrivenu visoku seroprevalenciju kod dobrovoljnih davalaca krvi 16,9% (35/206) objašnjavaju lošim ekonomskim prilikama, ali i niskim stepenom lične i kolektivne higijene, kao i neregulisanim snabdevanjem pijaćom vodom u nekim ruralnim područjima (Delić i sar., 2003).

Prilično visoka prevalencija anti-HEV imunoglobulina klase G je otkrivena kod ljudi u mnogim zemljama u razvoju, pri čemu je u Egiptu, više od 70% celokupne populacije ljudi pozitivno na anti-HEV IgG. Iznenađujuće je da je seroprevalencija visoka i u nekim razvijenim zemljama. Razlog za visoku seroprevalenciju i dalje ostaje nepoznat, mada ga verovatno treba tražiti u prenošenju virusa pri kontaktu ljudi sa životinjama kao i u konzumaciji kontaminiranog i nedovoljno termički obrađenog mesa životinja (Meng, 2010; Pavio i sar., 2010). Osim toga, razlozi visoke seroprevalencije bi potencijalno mogli biti i mala specifičnost metoda koje se koriste u serološkoj dijagnostici, kao i mogućnost unakrsne reakcije. Nije isključena ni mogućnost postojanja avirulentnih sojeva ovog virusa (Shata i Navaneethan, 2008). Dodatni dokaz koji ukazuje na zoonotski potencijal virusa i svrstava ovo oboljenje u grupu profesionalnih oboljenja farmera i veterinarara je nalaz antitela na HEV kod farmera i veterinarara koji rade na farmama svinja, a pri tome ne pokazuju kliničke znake oboljenja (Withers i sar., 2002; Meng i sar., 2002, Galiana i sar., 2008, Adjei i sar., 2009). U jednom ispitivanju je ustanovljena seroprevalencija od 18,8% u populaciji veterinarara i farmera na farmama svinja. U kontrolnoj grupi koju su činili ljudi koji nisu dolazili u kontakt sa svinjama ustanovljena je seroprevalencija od 4,1% (Galiana i sar., 2008). Isti autori naglašavaju veoma značajnu ulogu primene higijenskih mera na farmama svinja u cilju zaštite od širenja ove infekcije. Drugo ispitivanje koje je vršeno na Tajlandu je dalo slične rezultate. U populaciji farmera koji su zaposleni na farmama svinja ustanovljena su anti-HEV IgG kod 27,9% ispitanih, dok je seroprevalencija u populaciji farmera koji rade na živinarskim farmama bila 24,5%. U kontrolnoj grupi, koju su činili ljudi koji nisu dolazili u svakodnevni kontakt sa svinjama ustanovljena je seroprevalencija od 16,7%. Mada je

seroprevalencija u kontrolnoj grupi prilično visoka, statistički gledano razlika između kontrolne grupe i druge dve ispitivane grupe je značajna (Pourpongporn i sar., 2009). Ove činjenice ukazuju da je infekcija virusom hepatitisa E globalni zdravstveni problem i da se iz tog razloga mora vršiti kontinuirano praćenje ove infekcije kako u populaciji ljudi, tako i u populaciji životinja.

Sekvencioniranje HEV genoma je ukazalo na činjenicu da su izolati ovog virusa poreklom od svinja više slični izolatima poreklom od ljudi u istom geografskom području nego izolatima svinja iz drugih regiona (Huang i sar., 2002). Za razliku od svinjskog virusa hepatitisa E, hepatitis E virus ptica je genetski nesrodan humanom virusu hepatitisa E (Huang i sar., 2004). U prilog ovome idu i ispitivanja sprovedena na Tajlandu, gde je utvrđeno da su izolati virusa hepatitisa E izolovani od obolelih ljudi vrlo slični izolatima virusa hepatitisa E od svinja i da pripadaju genotipu 3 (Suwannakarn i sar., 2010).

Eksperimentalne infekcije su pokazale da svinjski sojevi virusa hepatitisa E mogu da izazovu infekciju kod nečovekolikih primata, ali da se i svinje mogu inficirati humanim sojem US-2 (Halbur i sar., 2001). Takođe, postoje direktni dokazi povezanosti humanog hepatitisa E sa konzumiranjem nedovoljno termički obrađenog i termički netretiranog mesa divljih svinja i jelena (Li i sar., 2005; Teo 2010). Opisan je i slučaj HEV infekcije kod radnika zaposlenog u klanici koji je na liniji klanja bio u direktnom kontaktu sa trupovima i unutrašnjim organima zaklanih svinja. Pacijent nije putovao u endemična područja, nije konzumirao sirovo meso i morske plodove, i nije primao transfuzije krvi, tako da je jedini faktor rizika bilo njegovo zanimanje. Ovakav nalaz, svrstava ovo oboljenje u grupu profesionalnih oboljenja (Perez-Garcia i sar., 2007). Mogućnost infekcije ljudi koji rade u klanici potvrđuje i drugo ispitivanje u kome je utvrđeno da 7,3% svinja zaklanih na klanici između 9 i 12 meseci starosti, izlučuje virus fecesom (Di Martino i sar., 2010).

Slično kao kod ljudi, infekcija kod svinja virusom hepatitisa E nastaje orofekalnim putem ili direktnim kontaktom između inficiranih i zdravih životinja. S obzirom na tu činjenicu, u epizootiologiji infekcije izazvane virusom hepatitisa E veliki značaj imaju izvorišta vode koja mogu biti kontaminirana virusom hepatitisa E. Međutim, ispitivanjem 28 farmi u SAD na prisustvo HEV RNK u fecesu, na sedam je nađen pozitivan rezultat metodom RT-PCR. Pri tome, na svim farmama su uzeti uzorci vode da bi se ispitalo da li je voda koja služi za napajanje svinja kontaminirana virusom hepatitisa E i kao takva potencijalni izvor infekcije za svinje. Međutim, ni

jedan od ispitanih uzoraka vode RT-PCR metodom nije bio pozitivan na prisustvo HEV nukleinske kiseline (Kasorndorkbua i sar., 2004). To svakako ne znači da kontaminacija vode nije nemoguća, pa se shodno tome posebna pažnja mora posvetiti mogućoj kontaminaciji vode za piće, naročito ako se ima u vidu da je u pitanju orofekalni put infekcije. Pored toga, obolele svinje fecesom eliminišu virus pa tako i svinjsko đubrivo može biti potencijalni izvor infekcije. Ispitivanja u SAD su pokazala da svinjski feces koji se deponuje u lagunama na farmama svinja može biti izvor infekcije za svinje. Dokazano je takođe u eksperimentalnim uslovima da virus iz fecesa svinja može da izazove infekciju zdravih svinja. Kontaminirano svinjsko đubrivo je potencijalni izvor virusa hepatitisa E i kontaminacije životne sredine ovim virusom (Kasorndorkbua i sar., 2004).

Oboljenje je serološki dijagnostikovano kod različitih životinjskih vrsta, uključujući ovce, koze, goveda, pse, zečeve, kokoške, glodare, jelene i divlje svinje (Panda i sar., 2007). Istraživači u Kini su utvrdili anti-HEV antitela kod 78,8% ispitanih svinja, 6,3% ispitanih goveda, međutim kod koza nisu otkrili anti-HEV antitela EIA metodom (Wang i sar., 2002). U Egiptu je hepatitis E serološki dijagnostikovano kod radnih konja, pri čemu je ispitivanjem bilo obuhvaćeno 200 radnih konja i ELISA metodom utvrđena seroprevalencija od 13%. Kod 4% konja RT-PCR metodom ustanovljena je viremija, kao i značajno povećanje enzima AST u serumu (Saad i sar., 2007). Ispitivanja u Brazilu su pokazala da je seroprevalencija anti-HEV antitela klase G kod divljih glodara 50%, kod svinja 24,28%, kod pilića 20%, kod pasa 6,97%, kod krava 1,42%, kod ljudi 6,25%, dok kod ovaca, koza i nečovekolikih primata nisu ustanovili antitela na virus (Vital i sar., 2005). Kod goveda je infekcija virusom hepatitisa E ustanovljena kako serološki tako i direktnim dokazom nukleinske kiseline virusa metodom RT-PCR. Od 60 seropozitivnih grla sa jedne farme pozitivno na nukleinsku kiselinu HEV je bilo 7 (11,67%), dok je na drugoj farmi od 31 seropozitivnih pozitivno bilo 1 grlo (3,23%). Ovaj nalaz ukazuje da i goveda mogu biti potencijalni izvor infekcije virusom hepatitisa E za ljude (Hu i Ma, 2010). Hepatitis E je utvrđen i kod zečeva u Kini, u farmskim uslovima gajenja. Soj koji je utvrđen kod zečeva je vrlo sličan genotipu 3 HEV sa kojim ima oko 82% preklapanja u nukleotidnoj sekvenci, tako da možda pripada genotipu 3. Međutim, za sada nema dovoljno informacija o zoonotskom potencijalu ovog izolata (Zhao i sar., 2009).

Da bi ispitali da li je infekcija virusom hepatitisa E sezonski zavisna, istraživači u Kini su ispitivali prisustvo HEV nukleinske kiseline u žuči svinja zaklanih na klanicama u različitim periodima tokom godine. U ovom ispitivanju nisu ustanovili da je oboljenje sezonski vezano za godišnja doba, već se podjednako često javlja tokom cele godine (Lu i sar., 2009).

Prisustvo virusa hepatitisa E u zapatima svinja je ustanovljeno u mnogim zemljama sveta (Okamoto, 2007). U Srbiji su tokom 2008. godine, a potom i 2010. objavljeni rezultati ispitivanja koji ukazuju da je HEV prisutan i u populaciji svinja u Srbiji (Petrović i sar., 2008, Savić i sar., 2010). Prisustvo HEV RNK je utvrđeno PCR metodom, kako u zbirnim uzorcima fecesa tako i u zbirnim uzorcima tkiva (slezina, jetra i mezenterijalni limfni čvor). Devet (30%) od 30 ispitanih zbirnih uzoraka fecesa sa 3 farme i 9 (45%) od 20 ispitanih uzoraka tkiva sa dve farme su bili pozitivni na prisustvo genoma hepatitisa E virusa. Prisustvo HEV RNK nije utvrđeno u 10 zbirnih uzoraka fecesa divljih svinja, kao ni u 15 zbirnih uzoraka tkiva svinja iz seoskih dvorišta (Petrović i sar., 2008).

Infekcija virusom hepatitisa E je osim u Srbiji, utvrđena i u susednim zemljama Republike Srbije. U Mađarskoj je oboljenje endemski prisutno u populaciji ljudi, ali i u populaciji svinja, zatim kod divljih svinja i jelenske divljači. Ispitujući uzorke fecesa i jetre metodom RT-PCR od svinja uzrasta od 6 do 10 nedelja, iz 12 farmi, od ispitanih 132 uzorka fecesa ustanovili su 30 pozitivnih (22,7%) i 12 pozitivnih uzoraka jetre na prisustvo HEV RNK od 39 ispitanih (30,8%) (Reuter i sar., 2009). Ispitivanje drugih autora takođe u Mađarskoj je pokazalo da je 39% ispitanih farmi pozitivno na prisustvo ovog virusa. Od ispitanih 248 uzoraka fecesa poreklom od svinja 21% je bilo pozitivno, a od ispitanih 45 uzoraka jetre 31% je bilo pozitivno. Prevalencija izlučivanja virusa fecesom je praćena kod različitih uzrasnih kategorija, pa je u uzrastu od 1 do 4 nedelje prevalencija bila 9%, zatim od 5 do 10 nedelja 27%, od 11 do 16 nedelja 36%, a kod svinja starijih od 17 nedelja 10% (Forgach i sar., 2010). Ispitujući fecese svinja poreklom sa šest farmi, istraživači u Sloveniji su ustanovili prisustvo infekcije virusom hepatitisa E u populaciji svinja u Sloveniji (Steyer i sar., 2011). Retrospektivna serološka ispitivanja u Španiji su pokazala da je HEV prisutan na farmama svinja u Španiji još od 1985. godine. Od ispitanih 2871 seruma svinja 48,4% uzoraka je bilo serološki pozitivno na prisustvo anti-HEV antitela. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno 208 farmi svinja pri čemu je 95% farmi imalo najmanje jednu serološki pozitivnu svinju na HEV (Casas i sar., 2009). U

populaciji divljih svinja u Španiji ustanovljena je seroprevalencija od 42,7%, dok je u istom istraživanju broj pozitivnih seruma ispitanih RT-PCR metodom na prisustvo HEV RNK bio 19,6%. Filogenetska analiza je potvrdila da svi sojevi virusa hepatitisa E koji su otkriveni u Španiji pripadaju genotipu 3 (de Deus i sar., 2008). Osim ispitivanja seroprevalencije, istraživači u Španiji su pratili i distribuciju HEV infekcije po različitim uzrasnim kategorijama svinja ispitivanjem fecesa metodom RT-PCR i ustanovili prosečnu prevalenciju ekskrecije virusa od 17,1%. Kod prasadi uzrasta od 3 do 6 nedelja i prasadi uzrasta 22 nedelje nisu ustanovili prisustvo genoma virusa u fecesu, kao ni kod krmača. RNK virusa hepatitisa E su ustanovili kod svih prasadi starosti od 8 do 10 nedelja i kod 40% prasadi starosti 12 do 13 nedelja (Seminati i sar., 2008). Slična ispitivanja su rađena i u Italiji, pri čemu je RT-PCR metodom od ispitanih 274 uzorka fecesa svinja poreklom sa šest farmi ustanovljeno 115 pozitivnih uzoraka na HEV. Sve farme su bile pozitivne na HEV infekciju sa prevalencijom koja se kretala od 12,8% do 72,5%. Prateći prevalenciju infekcije u različitim proizvodnim kategorijama, ustanovljeno je prisustvo virusa kod 43,1% nazimica, 38,6% mladih krmača koje su imale jedno do dva prašenja i 53,4% starijih krmača koje su se prasile više od dva puta. Na farmama sa zaokruženim proizvodnim ciklusom u kategoriji odbijene prasadi starosti do 120 dana prevalencija se u zavisnosti od farme kretala od 10 do 44%, a u kategoriji tovljenika starosti preko 120 dana prevalencija se u zavisnosti od farme kretala od 0 do 60%. Filogenetskom analizom je utvrđeno da svi sojevi pripadaju genotipu 3 virusa (Di Bartolo i sar., 2008). Ispitivanjem ukupno 11 farmi u Češkoj, na 7 farmi (63,6%) je ustanovljeno prisustvo HEV RNK metodom RT-PCR, pri čemu je filogenetskom analizom utvrđena pripadnost genotipu 3 (Vasickova i sar., 2009). Ispitujući deset farmi u Velikoj Britaniji, istraživači su ustanovili metodom RT-PCR da je svih deset farmi imalo najmanje jedan pozitivan uzorak fecesa, i da se prevalencija HEV infekcije na ispitanim farmama kretala od 5% do 35% (McCreary i sar., 2008). Serološka ispitivanja 96 seruma zdravih svinja starosti između pet i šest meseci u Severnoj Grčkoj poreklom sa deset farmi su pokazala da su svih 10 ispitanih farmi pozitivne na anti HEV IgG, a ustanovljena je seroprevalencija od 80% (Asimoula i sar., 2009). U Holandiji je od ukupno ispitanih 97 farmi svinja metodom RT-PCR, na 53% farmi ustanovljeno prisustvo virusa hepatitisa E, a prevalencija HEV infekcije u populaciji divljih svinja je bila 4%. Filogenetskom analizom je utvrđeno da ovi izolati pripadaju genotipu 3 (Rutjes i sar., 2009).

Osim u Evropi, HEV infekcija je ustanovljena i na drugim kontinentima. Ispitivanja u Australiji su pokazala prisustvo ove infekcije na farmama svinja pri čemu se prevalencija kretala od 30% do 95%. Međutim, autori naglašavaju da dalja ispitivanja treba usmeriti na to, da li HEV izaziva i oboljenje kod svinja i da li postoji rizik za prenošenje ove infekcije na ljude (Chandler i sar., 1999).

Opsežna ispitivanja sprovedena su i na Azijskom kontinentu. Istraživanja u Peking (Kina), su pokazala da se seroprevalencija HEV infekcije na farmama svinja u predgrađima Pekinga kreće od 47,5-100%. Na velikim farmama industrijskog tipa prosečna seroprevalencija je bila 76,6% dok je na manjim porodičnim farmama iznosila 90%. Iz uzoraka tkiva jetre RT-PCR metodom ustanovljeno je prisustvo HEV RNK u 3,5% uzoraka (Li i sar. 2009a).

Korejski istraživači su vršili ispitivanja zastupljenosti HEV infekcije u centralnim i južnim oblastima Koreje i ispitali RT-PCR metodom ukupno 565 uzoraka fecesa poreklom sa 12 farmi. Hepatitis E je ustanovljen na svih dvanaest farmi i to sa prevalencijom ekskrecije virusa od 2,1 do 35,4% u zavisnosti od farme. Prateći stopu izlučivanja po različitim proizvodnim kategorijama ustanovljena je prosečna prevalencija ekskrecije kod prasadi na sisi od 6,3%, pri čemu HEV infekciju u ovoj kategoriji nisu ustanovili na 7 farmi od ukupno dvanaest ispitanih farmi. U kategoriji prasadi iz odgoja ustanovljena je prosečna prevalencija ekskrecije od 16,3%, a najviši stepen ekskrecije je utvrđen u kategoriji svinja u tovu i to 38%. Ispitivanjem su bile obuhvaćene i krmače pri čemu je prosečna prevalencija ekskrecije u toj kategoriji iznosila 9,3%. Na sedam farmi nisu ustanovili izlučivanje virusa kod krmača od dvanaest ispitanih farmi. Ovakvi nalazi ukazuju na činjenicu da su kategorije prasadi u odgoju i svinja u tovu posebno prijemčive za ovu infekciju. Infekcija se najčešće javlja nakon odbijanja prasadi (Kim i sar., 2008). Ispitujući serume 2500 svinja u Japanu, istraživači su ustanovili serokonverziju kod 1448 ispitanih svinja (58%). Seroprevalencija je zavisila od uzrasta svinja tako da je kod svinja uzrasta 2 meseca iznosila 7%, uzrasta 3 meseca 40%, 4 meseca 87%, i 90% kod svinja uzrasta 5 i 6 meseci. Osim toga, ispitali su i prisustvo virusne nukleinske kiseline u serumu svinja uzrasta 3 i 6 meseci ORF2 prajmerima RT-PCR metodom, i ustanovili da su sve svinje uzrasta 6 meseci bile negativne na prisustvo HEV RNK, a kod 15% svinja uzrasta tri meseca je ustanovljena HEV RNK (Takahashi i sar., 2003).

Prisustvo HEV infekcije utvrđeno je i u Južnoj Americi, odnosno Brazilu i Argentini kao značajnim izvoznicima svinjskog mesa. Serološka ispitivanja



raširenosti HEV infekcije u Argentini ELISA metodom su pokazala prisustvo anti-HEV antitela u svih pet ispitanih pokrajina Argentine, pri čemu se seroprevalencija kretala od 4 do 58%. Koristeći RT-PCR metodu ustanovili su prisustvo HEV RNK u uzorcima fecesa svinja sa farmi u provinciji Buenos Aires, a sekvencioniranjem je utvrđeno da ovi izolati pripadaju genotipu 3 (dos Santos i sar., 2009; Munne i sar., 2007).

Ispitivanja 998 seruma od svinja starosti šest meseci u Kanadi su pokazala da je seroprevalencija 59,4%, i da je virus hepatitisa E veoma zastupljen na farmama svinja u Kanadi (Yoo i sar., 2001).

U epizootologiji HEV infekcije svinja značajnu ulogu imaju i divlje svinje za koje je dokazano da su rezervoari različitih virusa, bakterija i parazita, te tako mogu biti inficirane i virusom hepatitisa E. U jednom ispitivanju je RT-PCR metodom dokazano da je 2,5% ispitanih jetri poreklom od ustreljenih divljih svinja, bilo pozitivno na prisustvo nukleinske kiseline virusa hepatitisa E (Takahashi i sar., 2004; Kaci i sar., 2008; Reuter i sar., 2009, Kaba i sar., 2010). Ovo je naročito značajno kada je u pitanju ekstenzivna proizvodnja svinja. U takvoj situaciji divlje svinje dolaze u direktan kontakt sa domaćim svinjama, ponekad se čak i međusobno pare, tako da postoji mogućnost prenošenja infekcije putem krvi ili fekooralnim putem. Ovu činjenicu potvrđuju ispitivanja istraživača koji su ustanovili visok stepen homologije u nukleotidnim sekvencama virusa hepatitisa E poreklom od domaćih i divljih svinja kao i ljudi. Ova činjenica ukazuje na mogućnost da su divlje svinje potencijalni izvori infekcije za domaće svinje, ali i za ljude (Reuter i sar., 2009; Kaba i sar., 2009). Međutim, preliminarna ispitivanja zastupljenosti HEV infekcije kod divljih svinja u Srbiji, nisu pokazala prisutnost ove infekcije u populaciji divljih svinja (Petrović i sar., 2008).

Osim divljih svinja, pretpostavlja se da u epizootologiji hepatitisa E značajnu ulogu imaju i druge divlje životinje i to pre svega jelenska divljač. Ispitivanja u Japanu su pokazala da i jeleni mogu asimptomatski biti inficirani virusom hepatitisa E, ali je otkrivena znatno niža prevalencija kod njih nego kod divljih svinja tako da su divlje svinje verovatno primarni nosioci virusa (Takahashi i sar., 2004).

Bezbednost hrane jeste veoma značajan aspekt u epidemiologiji hepatitisa E, s obzirom da meso i proizvodi od svinjskog mesa mogu biti kontaminirani virusom hepatitisa E, uzimjući pri tome u obzir i činjenicu da su svinje rezervoari ovog virusa i da svinje za klanje takođe mogu biti inficirane (Leblanc i sar., 2007). Istraživanja u

Sjedinjenim Američkim Državama su pokazala da je oko 11% svinjskih jetri koje se prodaju na tržištu kontaminirano virusom hepatitisa E. Međutim, ohrabrujuća je činjenica da virus može biti inaktivisan uobičajenim postupcima termičke obrade, mada temperatura od 56°C u toku jednog časa ne može da inaktivise virus (Feagins i sar., 2008). Virion hepatitisa E je osetljiv na niske temperature i sredstva za dezinfekciju na bazi joda. Dokazano je da je HEV osetljiviji na zagrevanje od virusa hepatitisa A. Hepatitis A virus je 50% inaktivisan na temperaturi od 60°C u toku jednog časa, a u potpunosti na 66°C, dok je HEV 50% inaktivisan na 56°C i skoro potpuno inaktivisan (96%) na 60°C (Meng, 2010).

Osim u fecesu, prisustvo HEV RNK je utvrđeno u urinu svinja i svinjskom mesu. Nalaz virusa u urinu ukazuje na mogućnost kontaminacije sredine ne samo fecesom već i izlučenim urinom, a to svakako doprinosi lakšem širenju virusa. Kontaminacija mesa je zapravo posledica viremije, odnosno prisustva virusa u krvnim sudovima koji ishranjuju muskulaturu. Ova činjenica dodatno ukazuje na mogućnost infekcije ljudi svinjskim mesom koje nije dovoljno termički obrađeno (Bouwknegt i sar., 2009).

Infekcija svinja virusom hepatitisa E, slično kao kod ljudi, nastaje orofekalnim putem ingestijom hrane i vode kontaminirane virusom ili direktnim kontaktom između inficiranih i zdravih životinja (Kasorndorkbua i sar., 2004). Dokazano je da se virus prenosi sa svinja koje su u eksperimentalnim uslovima peroralno inficirane virusom hepatitisa E na zdrave svinje koje su u kohabitaciji sa eksperimentalno inficiranim svinjama (Casas i sar., 2008). Patogeneza HEV infekcije kod svinja se razlikuje od patogeneze ove infekcije kod ljudi i nije u svemu dovoljno istražena (Meng i sar., 1997).

Period koji protekne od momenta infekcije do pojave virusa u fecesu varira i iznosi od 1 do 4 nedelje, a izlučivanje virusa traje do sedam nedelja (Halbur i sar., 2001; Meng i sar., 1998). U eksperimentalnim ispitivanjima je utvrđeno da se posle kontaktne infekcije virus može ustanoviti u fecesu sedmog dana, a viremija nastaje dvadesetog dana od momenta infekcije i traje oko 10 dana. Izlučivanje virusa prema drugim podacima može trajati oko tri nedelje (Bouwknegt i sar., 2009; Kasorndorkbua i sar., 2004). Ispitujući izlučivanje virusa fecesom kod svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E istraživači su ustanovili da je srednja vrednost prevalencije ekskrecije kod prasadi uzrasta 3 do 5 nedelja 26%, a kod prasadi uzrasta 10 do 12 nedelja 44%. Kod svinja uzrasta 22 do 24 nedelje, srednja prevalencija ekskrecije je

iznosila 7,9%, a kod krmača 6% (McCreary i sar., 2008). Ovaj nalaz ukazuje na činjenicu da se vrhunac ekskrecije virusa javlja upravo kod svinja u porastu odnosno u periodu od 10 do 12 nedelja starosti, što je u skladu sa nalazom i drugih autora (Meng i sar., 1997). Slična istraživanja ukazuju da se infekcija kod svinja javlja najčešće između 80 i 120 dana starosti. Razlog ovome je verovatno postojanje protektivnog prirodnog pasivnog imuniteta kod prasadi u prvim nedeljama života koji stiču putem kolostruma (Martelli i sar., 2008). Nasuprot tome, drugo istraživanje je pokazalo da i prasadi mlađa od dva meseca takođe mogu oboleti. Naime, od ispitanih 40 uzoraka jetre metodom RT-PCR, kod 18 prasadi na sisi (54,5%) ustanovljena je nukleinska kiselina virusa hepatitisa E (Lee i sar., 2007). Ispitujući prisustvo HEV nukleinske kiseline u fecesu različitih uzrasnih kategorija svinja metodom RT-PCR istraživači u Španiji su ustanovili prevalenciju od 10% kod svinja uzrasta do 4 nedelje, 41% kod svinja uzrasta od 5 do 12 nedelja, 5% kod svinja uzrasta 13 do 20 nedelja i 7% kod svinja uzrasta od 21 do 24 nedelje. Ni kod jednog ispitanog nerasta nisu ustanovili prisustvo virusne RNK u fecesu, dok su kod 18% krmača ustanovili prisustvo HEV RNK. Ispitujući istovremeno i serume ovih životinja na prisustvo virusne RNK ustanovili su pozitivan rezultat u 20% seruma svinja uzrasta do 4 nedelje, 32% seruma svinja uzrasta od 5 do 12 nedelja, 10% uzoraka svinja od 13 do 20 nedelje, 11% uzoraka svinja uzrasta od 21 do 24 nedelje. Kod 5% krmača su u serumu ustanovili prisustvo HEV RNK, dok ni kod jednog nerasta nisu ustanovili prisustvo HEV RNK u serumu (Fernandez-Barredo i sar., 2007). Drugo ispitivanje, takođe u Španiji je pokazalo da je prevalencija ekskrecije virusa u kategoriji prasadi na sisi 11,1%, a u kategoriji odlučene prasadi (od odlučnja do uzrasta od 3 meseca) 41,7%. Najviša prevalencija ekskrecije virusa je ustanovljena kod svinja u prvom mesecu tova i to od 60%. U drugom mesecu tova prevalencija je iznosila 5%, a u trećem mesecu 7,1%. U kategoriji krmača ustanovljena je prevalencija ekskrecije virusa od 21,9%, dok ni kod jednog nerasta nije ustanovljeno izlučivanje virusa (Fernandez-Barredo i sar., 2006). Značajno smanjenje prevalencije ekskrecije u toku drugog i trećeg meseca tova ovi autori objašnjavaju sticanjem efektivnog zaštitnog imunskog odgovora na virus hepatitisa E. Ispitivanja prevalencije ekskrecije virusa hepatitisa E putem fecesa na tri farme u Japanu, istraživači su ustanovili prevalenciju ekskrecije virusa od 32% na farmi A, na farmi B 5% i na farmi C 48%. Visoka učestalost detekcije HEV genoma je ustanovljena između prvog i trećeg meseca uzrasta i to od 20 do 75% na farmi A, od 0 do 9% na farmi B i od 38 do 100% na farmi C. Od četvrtog do šestog meseca

uzrasta na sve tri farme ustanovljena prevalencija ekskrecije se kretala od 0 do 14% u zavisnosti od farme. Značajno manju prevalenciju ekskrecije virusa na fami B autori objašnjavaju primenom dobre higijenske prakse na toj farmi kao i činjenicom da se na toj farmi prasadi nakon odbijanja ne mešaju sa prasadima iz drugih legala u fazi odgoja i tova (Nakai i sar., 2006).

Ispitivanja na Tajvanu su pokazala da nijedno prase na sisi od dvadeset ispitanih nije izlučivalo virus fecesom, dok je u kategoriji svinja u odgoju i tovu od ispitana 34 uzorka ustanovljena prevalencija od 9%. Ispitujući serume svinja na prisustvo HEV RNK isti autori su ustanovili najviši stepen viremije (4,5%) kod prasadi uzrasta dva meseca, a niži u početnoj (1,2%) i završnoj fazi tova (1,8%) (Wu i sar., 2002).

Istraživači u Japanu su pratili infekciju virusom hepatitisa E u dva prirodno inficirana legla prasadi. Prasad u leglu A su imala maternalna antitela klase G i A, a prasad u leglu B su bila seronegativna. Ustanovili su i kasniji nastanak viremije i serokonverzije u leglu A što ukazuje da maternalna antitela štite od infekcije u prvim danima života. Izlučivanje virusa u oba legla je trajalo od 30 do 110 dana uzrasta, a viremija od 40 do 100 dana. Bez obzira na postojanje maternalnog imuniteta kinetika izlučivanja virusa je bila slična u oba legla. Metodom kvantitativnog real-time RT-PCR, veća količina virusa je ustanovljena u fecesu u odnosu na količinu virusa u serumu. U uzrastu od 200 dana HEV RNK je ustanovljena u unutrašnjim organima kod 3 od 13 ispitanih svinja (Kanai i sar., 2010).

Infekcija virusom hepatitisa E kod svinja protiče uglavnom asimptomatski (Halbur i sar., 2001; Lee i sar., 2008a). Ispitivanja koja potvrđuju ovu činjenicu sprovedli su istraživači u Holandiji, pri čemu su RT-PCR metodom ispitali fecese poreklom od devet svinja sa prolivom, i pri tome ni kod jedne svinje nije ustanovljena nukleinska kiselina virusa u fecesu (van der Poel i sar., 2001). U drugom istraživanju kod eksperimentalno inficirane prasadi stare tri nedelje, nije bilo kliničkih simptoma oboljenja izuzev kod jedne jedinke. Obolelo prase je imalo blagu dijareju, a kod ostalih jedinki koje nisu ispoljavale kliničku sliku bolesti, pri patoanatomskom pregledu jedino je ustanovljeno blago uvećanje mezenterijalnih limfnih čvorova. Histološki se u jetri kod eksperimentalno inficiranih svinja uočava blaga limfocitno – plazmaćelijska infiltracija i fokalna područja nekroze hepatocita. Distribucija virusa hepatitisa E u tkivima je praćena metodom *in situ* hibridizacije, pri čemu je jetra pokazivala najveći stepen pozitivne reakcije. Pozitivni signal je uočen u citoplazmi

hepatocita, zatim u Kupferovim ćelijama, epitelnim ćelijama žučnih kanalića i limfocitima. Pozitivni signal nije uočen u degenerisanim hepatocitima. Sa mnogo manje učestalosti svinjski HEV je bio zastupljen u ekstrahepatičnim tkivima kao što su limfni čvorovi, tonzile, slezina, tanko i debelo crevo. Veća količina virusne cDNK koja se eksprimira u hepatocitima ukazuje da su ove ćelije glavno mesto replikacije virusa hepatitisa E (Lee i sar., 2008b). Međutim, druga ispitivanja u kojima je sprovedena ekperimentalna infekcija svinja svinjskim i humanim sojem virusa, a potom RT-PCR metodom praćena distribucija virusne RNK, su ukazala da su ćelije žučnih kanala, žučne kese i intestinalnog sistema mesta gde se replikacija virusa odvija vrlo intenzivno (Halbur i sar., 2001). Pretpostavlja se, da se primarna ekstrahepatična replikacija virusa hepatitisa E dešava u ćelijama gastrointestinalnog sistema, a da tek potom virus pri primarnoj viremiji stiže u jetru. Posle replikacije u jetri, virus se oslobađa u žuč i fecesom izlučuje u spoljašnju sredinu (Meng i Halbur, 2006).

Istovremenim ispitivanjem fecesa i jetre od 42 svinje metodom RT-PCR ustanovljeno je prisustvo RNK virusa kod 10 svinja. Kod tri svinje virus je detektovan samo u jetri (Forgach i sar., 2010). Ovakav nalaz se može objasniti izlučivanjem virusa putem fecesa, ili ranom replikacijom u intestinalnom sistemu (Lee i sar., 2008a). U sličnom ispitivanju ustanovljen je pozitivan rezultat u devet uzoraka jetre i osam uzoraka fecesa. Kod 4 svinje istovremeno je virus detektovan i u jetri i u fecesu. Kod 5 svinja virus je ustanovljen samo u jetri, a kod 4 samo u uzorcima fecesa (de Deus i sar., 2007).

Prateći distribuciju antigena svinjskog virusa hepatitisa E u eksperimentalnoj infekciji Balb/c SPF miševa metodom indirektno imunofluorescencije, istraživači su dokazali HEV antigen u ćelijama jetre, slezine, bubrega, jejunuma, ileuma i kolona. Intenzitet pozitivne reakcije najviše je bio izražen u slezini, a potom u jetri (Huang i sar., 2009).

Generalno uzevši, oštećenje ćelija jetre virusima može nastati kao posledica direktnog delovanja virusa ili indirektno, usled antivirusnog imunskog odgovora domaćina ili kombinacijom jednog i drugog. Moguće je da snažan imunski odgovor dovodi do efikasnog uklanjanja virusa i oštećenja jetre različitog stepena, a slabiji imunski odgovor dovodi do perzistencije virusa i oštećenja jetre slabijeg intenziteta (Srivastava i sar., 2007). Mehanizmi koji regulišu intenzitet imunskog odgovora su verovatno od ključnog značaja u odbrani organizma i od ovog virusa.

U prilog ovoj činjenici idu istraživanja uloge CD8<sup>+</sup> T ćelija u patogenezi akutne infekcije izazvane virusom hepatitisa A, B i C u kojima je dokazana ključna uloga ovih ćelija u patogenezi (Vallbracht i sar., 1986; Bertoletti i sar., 1991; Koziel i sar., 1993).

Mada je HEV svrstan u grupu necitopatogenih virusa, kod infekcije ljudi i životinja dolazi do izvesnih oštećenja jetre (Jameel, 1999). Ovu mogućnost neki autori vide kao posledicu direktnog oštećenja hepatocita virusom hepatitisa E (Zhao i sar., 2001). Nakon orofekalnog puta infekcije primarno mesto replikacije virusa je intestinalni sistem. Do sada nije jasno na koji način virus dospeva u jetru, mada se pretpostavlja da tamo stiže putem portne vene. U citoplazmi hepatocita se odigrava proces replikacije virusa, a mehanizmi koji omogućavaju njegovo oslobađanje u žuč i krv nisu u svemu poznati (Jameel, 1999).

Patogeneza oštećenja hepatocita u slučaju infekcije svinja virusom hepatitisa E je složena i dalje nerazjašnjena. Prateći celularni imunski odgovor tokom akutnog hepatitisa E ljudi, istraživači su ustanovili povećanje populacije CD4<sup>+</sup> ćelija, ali ne i CD8<sup>+</sup> ćelija u perifernoj krvi inficiranih ljudi. Ovo objašnjavaju činjanicom da CD8<sup>+</sup> ćelije imaju vrlo važnu ulogu u tkivima gde dolaze u dodir sa antigenima. Pored toga, ustanovili su i povećanu produkciju IFN- $\gamma$  od strane mononuklearnih ćelija periferne krvi u odgovoru na stimulaciju HEV ORF2 proteinom, što svakako ima značaja u patogenezi oštećenja jetre kod pacijenata obolelih od ove infekcije. Pojava snažnog humoralnog imunskog odgovora pri infekciji ljudi virusom hepatitisa E ukazuje na činjenicu da T limfociti mogu da pruže adekvatnu pomoć pri sintezi antitela (Srivastava i sar., 2007). Istraživanja u kojima je vršeno praćenje ćelijskog imunskog odgovora na infekciju virusom hepatitisa E kod ljudi su pokazala da je oštećenje jetre imunski posredovano i da nastaje najverovatnije kao posledica delovanja citotoksičnih T limfocita i ćelija prirodnih ubica (NK ćelije). Broj CD8<sup>+</sup> ćelija je bio sličan u tkivu jetre pacijenata obolelih od A, B, C i E hepatitisa što može da ukaže na istovetne ili slične mehanizme patogeneze kod različitih tipova hepatitisa. Osim toga, isti autori su dokazali povećanje broja CD56<sup>+</sup> NK ćelija u poređenju sa negativnom kontrolnom grupom. Međutim, značajno više je bio povećan broj CD8<sup>+</sup> ćelija tako da se može pretpostaviti da one imaju ključnu ulogu u patogenezi infekcije virusom hepatitisa E (Prabhu i sar., 2011). Iz literature je poznato da celularni imunski odgovor ima značajnu ulogu u nastanku lezija u jetri kod infekcije ljudi virusom hepatitisa C (Marianneau i sar., 1998). Drugi autori su ispitivali ulogu citotoksičnih T limfocita i

citokina TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  pri hepatitisu C (Bertoletti and Maini, 2000). Pri ispitivanju patomorfoloških promena koje nastaju u jetri ljudi obolelih od žute groznice, istraživači su ustanovili CD4+ T limfocite kao dominantnu populaciju ćelija u prisutnom mononuklearnom infiltratu, kao i hepatocite koji ekspimiraju TGF- $\beta$ . Smatra se da je TGF- $\beta$  odgovoran za apoptozu hepatocita koja je kod ovog oboljenja bila dominantan nalaz, kao i za slabiji inflamatorni odgovor (Quaresma i sar., 2006). Izvor za TGF- $\beta_1$  u jetri su Kupferove ćelije, endotelne ćelije, hepatociti, epitelne ćelije žučnih kanalića i perisinusoidne zvezdaste ćelije (Hinz i sar., 2007). Kada hepatociti podlegnu apoptozi oni aktivno izlučuju citokine i hemokine koji aktiviraju prenos signala do susednih ćelija i oslobađaju profibrogene i inflamatorne citokine među kojima je i TGF- $\beta_1$ . TGF- $\beta_1$  je najvažniji citokin koji stimuliše razvoj fibroze u svim parenhimskim organima, uključujući i jetru. Prema mišljenju nekih autora oslobađanje TGF- $\beta_1$  predstavlja ključni događaj u patogenezi fibroze (Takiya i sar., 1995; Kisseleva i Brenner, 2008). TGF- $\beta_1$  ima višestruke funkcije tokom organogeneze, oštećenja tkiva i njegovog oporavka. Pri razvoju fibroze jetre ne dolazi samo do povećane sinteze TGF- $\beta_1$ , već je povećana i njegova aktivacija iz latentne u biološki aktivnu formu (Friedman, 1999).

Poznato je da je apoptoza aktivni fiziološki proces u regulaciji populacije različitih ćelija, koja se karakteriše specifičnim biohemijskim i morfološkim promenama. Razni signali unutar ćelije ili signali izvan ćelije mogu aktivirati biohemijske reakcije u ćeliji koje će rezultirati apoptozom. U ovaj složeni proces su uključene cistein proteinaze, enzimi iz familije kaspaza koji igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze (Salvesen i Dixit, 1997; Roulston i sar., 1999). Mnogi virusi uključuju apoptozu ćelije domaćina kao deo njihovog životnog ciklusa. S druge strane, apoptoza ne indukuje inflamaciju, a samim tim smanjuje se i stepen oštećenja ćelija (Roulston i sar., 1999).

Ispitivanja su pokazala da HEV infekcija protiče subklinički kod prirodno inficiranih svinja (Di Bartolo i sar., 2008). Eksperimentalna intravenska infekcija svinja humanim i svinjskim sojevima virusa hepatitisa E, nije uspela da izazove kliničku sliku bolesti, niti povećanje vrednosti biohemijskih parametara krvi koji ukazuju na oštećenje jetre (jetrini enzimi, bilirubin) (Halbur i sar., 2001).

U eksperimentalnoj infekciji Balb/c SPF miševa virusom svinjskog hepatitisa E, u serumu je ustanovljeno povećanje vrednosti aspartat-aminotransferaze (AST) i to za 2,6 puta i alkalne fosfataze (AP) u grupama miševa inficiranih peroralno i

intravenski. Vrednosti za ukupni bilirubin i alanin-aminotransferazu (ALT) nisu bile značajno povećane u odnosu na kontrolnu grupu (Huang i sar., 2009). Prema podacima iz literature povećanje aktivnosti ALT nije koristan indikator za HEV infekciju kod primata (Aggarwal i sar., 2000). Nasuprot tome, istraživači u Kini su sprovedi eksperimentalnu infekciju rezus majmuna (*Macaca mulatta*) i pri tome ustanovili povećanje vrednosti enzima ALT i histopatološke promene u jetri koje dodatno ukazuju na reakciju organizma na ovaj virus (Ji i sar., 2008). Visoke vrednosti za ALT ustanovljene su i kod distrofije jetre i drugih hroničnih hepatopatija, primarnih tumora jetre i metastaza (Žurić i Stanković, 1991).

Kod SPF eksperimentalno inficirane prasadi kojima su intravenski aplikovani humani i svinjski sojevi virusa, prisustvo HEV RNK je praćeno metodom RT-PCR. Pozitivno orjentisana RNK je ustanovljena od 3. do 27. dana posle infekcije u jetri, limfnim čvorovima, kolonu, tankom crevu, želucu, slezini, bubrezima, tonzilama, pljuvačnim žlezdama i plućima. Međutim, negativno orjentisana - replikativna forma virusne RNK nije ustanovljena u bubregu, želucu, pankreasu, plućima, srcu, mišićima, pljuvačnoj žlezdi i tonzilama. Ovo ukazuje na činjenicu da je primarna detekcija ovog virusa u replikativnoj formi u tankom crevu i kolonu što podržava pretpostavku da se u fecesu nalazi veća količina virusa nego u žuči. Replikativna forma virusne RNK je ustanovljena prvo u tankom crevu, kolonu, limfnim čvorovima i jetri. Virus se duže vremena replikuje u ovim organima nego u ostalim (Williams i sar., 2001).

Ispitivanja uzoraka seruma, žuči, jetre, mezenterijalnih limfnih čvorova i fecesa poreklom od 69 svinja RT-PCR metodom, su pokazala da je HEV RNK najčešće dokazana u žuči, zatim u mezenterijalnim limfnim čvorovima, jetri, fecesu i na kraju u serumu (de Deus i sar., 2008). Slične nalaze su ustanovili i drugi autori (Vasickova i sar., 2009). Prisustvo HEV RNK je ustanovljeno kod svinja starosti 1 mesec (7/23), 2 meseca (8/17) i tri meseca (11/20). Ni kod jedne jedinke mlađe od jednog meseca i starije od tri meseca nije ustanovljeno prisustvo virusa u navedenim uzorcima. Kod svinja iz ovog eksperimenta nisu ustanovljene patoanatomske promene na jetri i mezenterijalnim limfnim čvorovima. Međutim, histopatološkim pregledom 31,9% svinja je imalo blagi do srednje izraženi hepatitis, koji se karakterisao prisustvom mononuklearnog ćelijskog infiltrata (makrofagi, limfociti i plazma ćelije) uglavnom smeštenim u periportnim područjima i nasumično. Uz ovo, bile su prisutne i multifokalne nekroze hepatocita. Kod jedinki koje su imale najmanje jedan uzorak pozitivan RT-PCR metodom u 57,7% slučajeva ustanovljene su opisane lezije. Kod



jedinki čiji su uzorci bili negativni RT-PCR metodom, histološki su ustanovljene lezije u jetri u 16,3% slučajeva (de Deus i sar., 2008). Ispitivanja drugih istraživača su pokazala da je od 156 ispitanih seruma svinja, metodom RT-PCR, kod 44 (28,2%) ustanovljena nukleinska kiselina virusa hepatitisa E, a samo kod 30 (68,2%) su ustanovljene lezije karakteristične za hepatitis. Isti autori naglašavaju značaj virusa hepatitisa E i njegovu sposobnost da samostalno dovede do nastanka lezija u jetri kod svinja, što potvrđuju pozitivnom korelacijom između hepatičnih lezija i nalaza anti-HEV antitela kod prirodno inficiranih svinja (Martin i sar., 2007).

Da bi se utvrdio uticaj virusa hepatitisa E na gravidne krmače, i njihove fetuse, vršena je eksperimentalna intravenska inokulacija virusa gravidnim krmačama. Posle dokaza HEV RNK u fecesu RT-PCR metodom kliničke slike oboljenja nije bilo. Nakon partusa, kod novorođene prasadi nije ustanovljena infekcija virusom, što ukazuje da u uslovima eksperimentalne infekcije nema vertikalnog prenošenja virusa na potomstvo. Takođe, nije uočen značajan uticaj virusa na veličinu fetusa i njihovu vijabilnost, kao ni na telesnu masu novorođene prasadi i njihov prirast. Prasad su putem kolostruma stekla maternalna antitela na HEV, ali su već od 71. dana života bila seronegativna na HEV (Kasorndorkbua i sar., 2003). Međutim u drugom ispitivanju, u prirodnim uslovima infekcije, istovremeno je dokazana HEV RNK u abortiranim fetusima i u fecesu krmača. Osim na HEV, svi abortirani fetusi su istovremeno bili pozitivni i na cirkovirus tip 2. Ova istraživanja ukazuju da je moguća transplacentarna infekcija istovremeno sa HEV i PCV2 kod krmača sa reproduktivnim poremećajima (Hosmillo i sar, 2010). Vertikalno prenošenje virusa je ustanovljeno u humanoj polulaciji pri čemu je dokazana *in utero* infekcija novorođenčeta od inficirane majke virusom hepatitisa E (Khuroo i sar., 1995).

Prateći eksperimentalnu infekciju nečovekolikih primata svinjskim hepatitis E virusom inokulisanim intravenski, istraživači u SAD su ustanovili serokonverziju 4. nedelje posle infekcije, a antitela su bila prisutna u serumu do kraja šesnaestonedelnog eksperimenta. Ekskrecija virusa je uočena između prve i druge nedelje posle infekcije i trajala je još od treće do pete nedelje. Viremija je uočena u prvoj nedelji, a trajala je narednih 4 do 5 nedelja. Pored toga, u serumu je ustanovljeno blago povećanje aktivnosti ALT i ICD (izocitrat dehidrogenaza), što nije slučaj kada se nečovekoliki primati inficiraju humanim sojevima virusa kada je značajnije povećanje aktivnosti enzima. Kod oba inficirana primata, u uzorcima jetre dobijenim biopsijom u periodu povećanja aktivnosti enzima, uočene su nekro-

inflamatorne promene koje ukazuju na blagu formu akutnog virusnog hepatitisa. Inficirajući svinje humanim US-2 sojem virusa nisu ustanovili zanačajno povećanje aktivnosti enzima alkalne fosfataze, sorbitol dehidrogenaze, ALT, gamaglutamiltransferaze (GGT) i bilirubina (Meng i sar., 1998).

U eksperimentalnoj infekciji pacova humanim sojem virusa hepatitisa E, ustanovljeno je prisustvo HEV RNK u fecesu od 7. dana, a u serumu intermitentno između 4. i 35. dana metodom RT-PCR. Metodom direktne imunofluorescencije virusni antigen je utvrđen u jetri, mononuklearnim ćelijama periferne krvi, slezini, mezenterijalnim limfnim čvorovima i tankom crevu. Na osnovu ovog može se zaključiti da su mononuklearne ćelije periferne krvi nosioci virusa i da omogućuju njegov transport putem krvi do različitih organa u organizmu (Maneerat i sar., 1996).

U literaturi koja se odnosi na stepen i tip oštećenja hepatocita virusom hepatitisa E postoje različiti podaci, ali s obzirom da je ovo oboljenje novijeg datuma, nema mnogo podataka koji se odnose na patomorfološke promene. U jednom ispitivanju četiri praseta prirodno inficirana svinjskim virusom hepatitisa E su obdukovana tokom akutnog stadijuma infekcije. Patoanatomske promene nisu uočene na jetri kao ni na ostalih 18 ispitanih tkiva i organa tokom obdukcije. Međutim, kod sva četiri praseta, histopatološkim pregledom je ustanovljen hepatitis, koji se karakterisao blagim do umerenim multifokalnim i periportnim limfocitno - plazmaćelijskim infiltratom, sa područjima blage fokalne nekroze hepatocita (Meng i sar., 1997). Ovakve histopatološke nalaze u jetri potvrđuju i drugi autori (Halbur i sar., 2001; Lee i sar., 2007; de Deus i sar., 2007; de Deus i sar., 2008; Lee i sar., 2008a). Pored hepatitisa, kod sva četiri praseta je uočen blagi multifokalni limfocitno - plazmaćelijski intersticijalni nefritis (Meng i sar., 1997). Ima izveštaja (Williams i sar., 2001), da lezije u jetri nastaju kao posledica imunskog odgovora na virus, a ne kao posledica replikacije virusa u hepatocitima.

Na osnovu gustine limfocitno – plazmaćelijskih infiltrata u jetri koje su ustanovili pri eksperimentalnoj infekciji svinja virusom hepatitisa E, neki autori su predložili klasifikaciju hepatitisa u pet stadijuma. Nulti stepen je stepen bez inflamatornih promena; prvi stepen podrazumeva postojanje 1 do 2 fokusa limfocitno - plazmaćelijskih infiltrata u 10 posmatranih lobulusa; drugi stepen podrazumeva postojanje 2 do 5 fokusa u 10 lobulusa jetre; u trećem stepenu postoji od 6 do 10 fokusa u 10 lobulusa, a četvrti podrazumeva postojanje više od 10 fokusa infiltrata u 10 lobulusa jetre (Halbur i sar., 2001). S obzirom da je u ovom slučaju bila u pitanju

eksperimentalna infekcija, težinu lezija nastalih kod svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E treba pažljivo porediti sa lezijama koje nastaju u eksperimentalnoj infekciji, pre svega zbog različitog načina inficiranja.

Pri eksperimentalnoj infekciji dugorepog majmuna (*Macaca fascicularis*) inficiranim intravenski virusom hepatitisa E, promene u bubrežima su se karakterisale akutnom tubularnom nekrozom sa fokalnim krvavljenjima, što ukazuje da se HEV verovatno replikuje u bubregu majmuna, a možda i čoveka (Aggarwal i sar., 2001). Histopatološke promene u bubrežima se u ovom slučaju razlikuju od onih koje nastaju u bubrežima svinja pri infekciji virusom hepatitisa E (Meng i sar., 1997).

U eksperimentalnoj infekciji prasadi, makroskopskim pregledom jedino je ustanovljeno blago uvećanje mezenterijalnih limfnih čvorova. Kod eksperimentalno inficiranih svinja, histopatološkom analizom ustanovljena je blaga limfocitno – plazmaćelijska infiltracija i fokalna područja nekroze hepatocita (Lee i sar., 2008a). Do sličnih nalaza došli su i drugi autori koji su pratili prirodnu infekciju virusom hepatitisa E, i ustanovili pri patoanatomskom pregledu da nijedna od ispitanih svinja nije imala vidljive makroskopske promene na jetri i mezenterijalnim limfnim čvorovima (de Deus i sar., 2007). Međutim, kod makroskopskog ispitivanja jetri svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E, neki autori su u manjem broju slučajeva ustanovili blago povećanje jetre i prisustvo retkih žuto obojenih fokusa diseminovanih po površini jetre (Lee i sar., 2007).

Inficirajući svinje svinjskim i humanim sojem virusa hepatitisa E, istraživači su histopatološkim ispitivanjem ustanovili multifokalni limfocitno - plazmaćelijski hepatitis, koji je bio blago do srednje izražen kod svinja inficiranih svinjskim sojem, dok je kod svinja inficiranih humanim sojem bio umeren do izrazito težak. Od ukupno 18 svinja koje su inficirane svinjskim sojem virusa kod 15 su uočene inflamatorne promene u jetri, a od 19 svinja inficiranih humanim sojem virusa lezije u jetri su ustanovljene u 16 slučajeva. Osim toga u kontrolnoj grupi koja je brojala 17 svinja, kod 9 su ustanovljene promene u jetri koje odgovaraju limfocitno - plazmaćelijskom hepatitisu. Osim inflamatornih promena, u jetri su ustanovljene i nekroza hepatocita i apoptoza pojedinačnih hepatocita koje su se karakterisale prisustvom eozinofilne citoplazme i fragmentacijom ili odsustvom ćelijskih jedara. Ovakve promene su ustanovljene kod pet od 17 svinja u kontrolnoj grupi, zatim kod 10 od 18 svinja u grupi koja je inficirana svinjskim sojem virusa i kod 13 od 19 svinja inficiranih humanim sojem virusa. Najizraženiji zapaljenski proces i nekroza hepatocita bila je

ispoljena od dvadesetog dana posle intravenske inokulacije virusa, pa sve do pedesetpetog dana kada je i dalje bila umereno izražena u grupi svinja koje su inficirane humanim sojem virusa. Kod svinja koje su inficirane svinjskim sojem virusa, pedesetpetog dana posle inokulacije, lezija u jetri nije bilo ili su bile prisutne samo u tragovima. Virus je ustanovljen u fecesu u periodu od sedmog do dvadesetog dana posle inokulacije, a u žuči od trećeg do dvadesetsedmog dana. U uzorcima jetre ustanovljena je virusna RNK tokom infekcije kod svih svinja inficiranih humanim sojem virusa žrtvovanih u periodu od trećeg do 14. dana. Međutim, kod svinja inficiranih svinjskim sojem virusa u tom periodu je HEV RNK dokazana kod 6 od devet ispitanih svinja, a kod svih je dokazana u fecesu i u žuči. Ovakav nalaz se može objasniti procesom izlučivanja virusa putem žuči iz jetre, a potom putem fecesa iz samog organizma svinje (Halbur i sar., 2001).

U eksperimentalnoj infekciji suprasnih krmača, koje su bile inficirane intravenski, ustanovljeno je izlučivanje virusa putem fecesa, mada kliničkih znakova infekcije nije bilo. Histološkim pregledom u jetri je uočen multifokalni limfohistiocitni hepatitis slabog stepena kod 4 od 12 inficiranih krmača (Kasornorkbua i sar., 2003).

Hepatitis E se kod ljudi karakteriše akutnim zapaljenjem jetre sa izraženim multifokalnim nekrozama, aktivacijom Kupferovih ćelija, i izraženom intralobularnom holestazom i to naročito u perifernolobularnoj zoni. U portnim prostorima i multifokalno u parenhimu se nalazi limfocitni infiltrat. Limfociti su dominantna ćelijska populacija u infiltratu, mada se mogu naći i polimorfonuklearni granulociti u portnim prostorima i intralobularnim infiltratima. CD8<sup>+</sup> su češće prisutni u odnosu na CD4<sup>+</sup> limfocite. Za razliku od svinja, kod ljudi je opisan i nalaz limfocitnog destruktivnog holangitisa kod pacijenta kod kojeg je serološki i RT-PCR nalaz upućivao na hepatitis E. Ovakav nalaz je čest u slučajevima infekcije virusom hepatitisa B i C, a pretpostavlja se da nastaje kao rezultat imunoreaktivnosti protiv epitelnih ćelija žučnih kanalića koje su inficirane virusom (Delić, 1998; Wendum i sar., 2005). U drugom ispitivanju od ukupno ispitanih 54 biopsije jetre od ljudi obolelih od hepatitisa E je u svim slučajevima ustanovljena hidropsna degeneracija hepatocita, u 75% slučajeva holestaza, a u 65% biopsija hepatociti sa dva ili više jedara. Osim toga, ustanovljena su apoptotska tela kao i proliferacija Kupferovih ćelija. Metodom *in situ* hibridizacije RNK virusa je utvrđena u citoplazmi hepatocita u neposrednoj blizini jedra (Zhao i sar., 2001).

Patohistološki nalaz pri eksperimentalnoj infekciji Balb/c SPF miševa virusom svinjskog hepatitisa E, ukazuje na inflamatorni proces u parenhimu jetre, sa područjima fokalne hepatocelularne nekroze i krvavljenjima. Nalaz u slezini ukazuje na fokalna područja nekroze, a u bubrezima na prisustvo limfocitnog infiltrata i ćelijskog debrisa (Huang i sar., 2009).

Pri jednoj eksperimentalnoj infekciji svinja makroskopske promene nisu uočene prilikom obdukcije, dok su histopatološke promene uočene u jetri, žučnoj kesici, ileumu i limfnim čvorovima. Histološki, uočen je multifokalni limfocitni hepatitis 28. dana posle infekcije, a u žučnoj kesici slabo izražen limfocitni infiltrat lokalizovan subepitelno kod tri svinje. Osim toga, blaga do umerena hiperplazija Pajerovih ploča je uočena kod svih ispitanih, izuzev kod jedne svinje. Blaga do srednje izražena hiperplazija u limfnim čvorovima je uočena kod 4 od 12 ispitanih svinja. Kod četiri svinje je uočeno povećanje aktivnosti enzima AST i ALT koji mogu da ukažu na proces napredovanja oštećenja jetre tokom HEV infekcije (Bouwknegt i sar., 2009).

Prvo saznanje da je hepatitis E potencijalna zoonoza potiče još iz 1990. godine kada je uspela eksperimentalna infekcija svinja u Centralnoj Aziji sa humanim sojem virusa (Balayan i sar., 1990). Od tada pa do danas, veliki je broj slučajeva gde postoji pouzdana sumnja na prenošenje infekcije sa životinja na ljude, kao i prenošenje virusa preko namirnica životinjskog porekla, ali je mali broj potvrđenih slučajeva.

Infekcija kod ljudi protiče akutnim tokom, a u literaturi se navodi da 0,5-3% obolelih ima fulminantnu formu hepatitisa E, koja može imati i letalan ishod (Milošev-Žilović i sar., 2003). Hepatitis E kod ljudi je sličan hepatitisu A, jer ne dovodi do hroničnog oboljenja jetre i ciroze, što nije slučaj kod hepatitisa B i C (Mast i Krawczynski, 1996). Međutim, novija ispitivanja su pokazala da infekcija virusom hepatitisa E može biti i hroničnog toka kod imunokompromitovanih pacijenata obolelih od sindroma stečene humane imunodeficijencije (AIDS), kod pacijenata kod kojih je urađena transplantacija kao i kod pacijenata sa hematološkim malignim oboljenjima (Kamar i sar., 2008; Ollier i sar., 2009; Dalton i sar., 2009).

Virus hepatitisa E je uzročnik hepatitisa E kod ljudi i predstavlja veoma važan zdravstveni problem u mnogim nerazvijenim zemljama Azije i Afrike. Infekcija nastaje orofekalnim putem mada su opisani i slučajevi prenošenja virusa i preko transfuzije krvi. Klinički se oboljenje kod ljudi karakteriše žuticom, hepatomegalijom, anoreksijom, abdominalnim bolom, povraćanjem i povišenom temperaturom i

uglavnom protiče akutnim tokom. Osim u kliničkoj, oboljenje se može javiti i u subkliničkoj formi kada nema izraženih simptoma infekcije. Inkubacioni period iznosi od 15 do 40 dana, a povećanje aktivnosti jetrinih enzima se javlja u dva navrata tokom trajanja kliničkih simptoma sa jednim međuperiodom u trajanju od oko nedelju dana sa normalizacijom njihove aktivnosti. Povišena aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT) može trajati i 1 do 2 nedelje posle ozdravljenja. Infektivne virusne čestice su prisutne u žuči i fecesu tokom perioda kasne inkubacije i prisutne su još 1 do 2 nedelje nakon pojave kliničkih simptoma oboljenja. IgM antitela se pojavljuju tokom akutne faze i nestaju za tri do šest meseci, dok IgG antitela perzistiraju od 2 do 13 godina. Histološki se u jetri kod ljudi obolelih od hepatitisa E uočava portalni triaditis, holestaza, inflamacija lobulusa i degeneracija hepatocita. Iz literature je poznato da virusi hepatitisa B i hepatitisa C imaju sposobnost da modulišu apoptozu. Međutim, u slučaju virusa hepatitisa E ovo područje nije dovoljno istraženo, mada se histopatološkim pregledom biopsija jetre poreklom od ljudi obolelih od hepatitisa E uočavaju apoptotska tela - *Councilman* tela. Stopa mortaliteta od ove infekcije je niska (manje od 1%) ali može biti značajna kod trudnica i dostizati 25% (Balayan, 1997; Jameel, 1999; Worm i sar., 2002; Emerson i Purcell, 2003; Kumar i sar., 2004, Pischke i sar., 2010). Iako se hepatitis E klinički dijagnostikuje kod malog broja pacijenata iz razvijenih zemalja, iznenađujuća je visoka prevalencija otkrivenih anti-HEV antitela u humanoju populaciji (Drobeniuc i sar., 2001).

Imunski odgovor svinja pri infekciji virusom hepatitisa E se karakteriše najpre prolaznom pojavom imunoglobulina klase M (IgM) u serumu, a zatim se javljaju dugoživeći imunoglobulini klase G (IgG) i to u periodu kasne viremije i tokom faze izlučivanja virusa. Proteini kapsida svinjskog virusa hepatitisa E su imunogeni i podstiču nastanak protektivnog imuniteta slično kao kod humanog virusa hepatitisa E. Dokazano je da ORF2 kapsidni protein svinjskog virusa hepatitisa E ima zajedničke epitope sa humanim i avijarnim virusom hepatitisa E. Smatra se da svi sojevi virusa hepatitisa E koji su izolovani do sada, uključujući i svinjske genotipove 3 i 4 pripadaju jednom serotipu. Ovo potvrđuju eksperimenti sprovedeni na primatima koji su imali protektivni imunitet za različite genotipove humanih hepatitis E virusa. Seropozitivne krmače putem kolostruma prenose anti-HEV antitela na svoju prasad tako da su prasad seropozitivna i imaju maternalna antitela koja traju 7 do 9 nedelja. Smatra se da maternalna antitela štite prasad od nastanka HEV infekcije u prvim nedeljama života (Meng i Halbur, 2006).

Nakon infekcije protektivni imunoglobulini klase G kod ljudi iščezavaju u periodu od 6 do 12 meseci, mada prema nekim ispitivanjima mogu biti prisutna i 1 do 4 godine posle infekcije. Samo je u jednom ispitivanju dokazano postojanje anti-HEV IgG 14 godina posle infekcije kod oko 50% ljudi koji su bili inficirani tokom jedne epidemije hepatitisa E (Aggarwal i Jameel, 2008).

U patogenezi virusnih infekcija značajnu ulogu imaju i humoralni i celularni imunski odgovor. Mada antitela koja nastaju pri infekciji virusom hepatitisa E imaju verovatno neutralizacionu aktivnost, njihovo trajanje i tačna uloga u zaštiti od HEV infekcije ostaje i dalje nejasna (Srivastava i sar., 2007).

Pošto je kod svinja infekcija virusom hepatitisa E asimptomatska, dijagnostika se rutinski ne sprovodi. Međutim, razvijene su brojne metode dijagnostike pre svega u naučno-istraživačke svrhe.

U dijagnostici HEV infekcije svinja se mogu koristiti indirektna i direktna metode dijagnostike. Indirektna metode su zasnovane na dokazivanju serokonverzije odnosno imunoglobulina klase G i klase M. Ove serološke metode se primenjuju širom sveta u cilju utvrđivanja seroprevalencije HEV infekcije u humanoj populaciji kao i u populaciji različitih vrsta domaćih i divljih životinja. Najčešće korišćena serološka metoda za utvrđivanje serokonverzije je indirektna ELISA (de Deus i sar., 2007; Casas i sar., 2008; de Deus i sar., 2008; Seminati i sar., 2008; dos Santos i sar., 2009). Kao antigen u ovoj metodi koristi se uglavnom ORF2 antigen. S obzirom da je indirektna ELISA zasnovana na dokazivanju serokonverzije, odnosno antitela, smatra se nepouzdanom metodom u dijagnostici u akutnoj fazi bolesti kada još nije došlo do sinteze antitela. Pouzdanim se smatraju direktna metode koje utvrđuju antigen virusa hepatitisa E direktno u uzorku. Mada je u literaturi opisana izolacija virusa u kulturi tkiva i njegov citopatogeni efekat, izolacija svinjskog virusa hepatitisa E u kulturi tkiva je vrlo teška, tako da se preporučuje upotreba drugih dijagnostičkih postupaka (Smith, 2001; Jameel, 1999). Od direktnih metoda u dijagnostici HEV infekcije mogu se koristiti RT-PCR, *in situ* hibridizacija i imunohistohemijske metode. RT-PCR je molekularna metoda zasnovana na utvrđivanju genoma virusa u uzorku. Kao uzorak može se koristiti feces, žuč ili tkiva poreklom od inficiranih životinja (de Deus i sar., 2008). *In situ* hibridizacija je metoda za direktnu vizuelizaciju virusnog genoma u tkivu (Lee i sar., 2008b). Izvođenje *in situ* hibridizacije je uglavnom ograničeno na dijagnostičke laboratorije koje poseduju dobre tehničke i materijalne mogućnosti, s obzirom da je izvođenje ove metode prilično skupo. Neki autori su

imunohistohemijski detektovali antigen virusa hepatitisa E u jetri kod prirodno inficiranih svinja. Trideset svinja iz različitih zapata su odabrali na osnovu pozitivnih nalaza na HEV dobijenih RT-PCR tehnikom, i kod svih trideset su u jetri imunohistohemijski utvrdili HEV antigen. Pozitivna reakcija je utvrđena osim u jetri, odnosno hepatocitima, i u tankom i debelom crevu, limfnim čvorovima, tonzilama, slezini i bubrezima (Ha i Chae, 2004). Mada je imunohistohemijska metoda mnogo praktičnija za detekciju svinjskog HEV, komercijalna monoklonska ili poliklonska antitela protiv svinjskog virusa hepatitisa E nisu još dostupna (Lee i sar., 2008b). Međutim, neki autori smatraju (Lee i sar., 2007) da imunohistohemijska metoda nije pogodna za dijagnostiku hepatitisa E u fazi eliminacije virusa, kada se virus intenzivno izlučuje preko žuči, već samo u fazi inkubacije i fazi pojave prvih kliničkih simptoma oboljenja.

Direktna vizuelizacija virusnih čestica u uzorcima fecesa svinja obolelih od HEV infekcije elektronskim mikroskopom se ne smatra pouzdanom dijagnostičkom procedurom, zbog toga što je u jednom ispitivanju od 25 uzoraka koji su bili pozitivni metodom RT-PCR samo u jednom slučaju dokazana virusna partikula koja ima morfološke karakteristike virusa hepatitisa E. Ovako relativno mali broj pozitivnih uzoraka metodom elektronske mikroskopije se može objasniti većom osetljivošću RT-PCR metode. Pored toga, virus hepatitisa E je veoma osetljiv na promene temperature (smrzavanje i odmrzavanje), tako da je i to verovatno jedan od razloga zašto je u samo jednom slučaju virion dokazan metodom elektronske mikroskopije (van der Poel i sar., 2001). I pored toga što se RT-PCR smatra visoko osetljivom metodom, ova metoda služi pre svega za dokazivanje nukleinske kiseline virusa, koja kao takva ne može da dovede do infekcije. Ova metoda takođe može da otkrije nukleinsku kiselinu u sklopu nekompletnih i defektnih virusnih čestica koje takođe ne mogu da dovedu do infekcije (Petrović i sar., 2009).

Za proučavanje HEV infekcije postoje eksperimentalni životinjski modeli koji omogućavaju praćenje ove infekcije u eksperimentalnim uslovima. Kao životinjski model najčešće se koristi svinja i različite vrste primata, mada se mogu koristiti i pacov i miš, ali i druge vrste glodara kao na primer mongolski gerbil. Primati se uglavnom koriste radi proučavanja infekcije sa genotipovima 1 i 2, dok se svinje kao vrlo pogodan model koriste radi proučavanja infekcije sa genotipovima 3 i 4. S obzirom da se eksperimenti najčešće sprovode radi razumevanja patogeneze ove infekcije kod ljudi, neophodno je pažljivo vršiti ekstrapolaciju ovih rezultata dobijenih



u eksperimentalnim uslovima. Neka eksperimentalna ispitivanja su prevashodno sprovedena radi razumevanja patogeneze ove infekcije kod svinja (de Deus i sar., 2007; Li i sar., 2009b; Huang i sar., 2009).

Kod procene histopatoloških promena u jetri, treba isključiti druge infektivne agense koji mogu dovesti do sličnih promena, ili infektivne agense koji možda ispoljavaju sinergističko patogeno dejstvo sa virusom hepatitisa E. Često se u literaturi navode infekcije cirkovirusima i virusom PRRS kao infekcije koje mogu biti udružene sa HEV infekcijom (Meng i Halbur, 2006). Hepatitis je jedna od osnovnih karakteristika infekcije svinja cirkovirusom tip 2 (PCV2), mada je približno jedna trećina svinja obolelih od PMWS sa prvim i drugim stadijumom promena u jetri, negativna na prisustvo virusa u jetri (Martin i sar., 2007). Ispitivanja su pokazala da je infekcija virusom hepatitisa E povezana sa nastalim lezijama u jetri kod svinja, i da ta povezanost ne zavisi od toga da li je ta životinja istovremeno inficirana i sa PCV2 virusom. Dakle, oba uzročna agensa (HEV i PCV2) verovatno mogu nezavisno jedan od drugog da dovedu do hepatičnih lezija kod svinja. Međutim, za razliku od virusa hepatitisa E koji izaziva subkliničku infekciju sa lezijama u jetri prvog i drugog stadijuma, PCV2 izaziva klinički manifestno oboljenje, a lezije u jetri su obično više izražene (Martin i sar., 2007).

Virusni hepatitis koji se javlja kod svinja inficiranih cirkovirusom tip 2 se karakteriše umerenom infiltracijom portalne regije ćelijama zapaljenja, zatim vakuolizacijom, povećanjem i zaokrugljivanjem hepatocita sa kariomegalijom. Posledično dolazi do sužavanja sinusoidnih kapilara (Clark, 1997; Segales i sar., 2004). Mogu se javiti i lezije sa generalizovanom perilobularnom fibrozom, disorganizacijom reznjića sa masovnim gubitkom hepatocita. Ove promene su uglavnom udružene sa žuticom i makroskopskim promenama na jetri (Segales i sar., 2004). U ciljne ćelije jetre za PCV2 infekciju spadaju Kupferove ćelije, ćelije inflamatornog infiltrata i hepatociti. Antigen PCV2 je u Kupferovim ćelijama i ćelijama mononuklearne loze lokalizovan u citoplazmi, izuzetno retko u jedru. Nasuprot tome, nukleinska kiselina PCV2 u hepatocitima je najčešće lokalizovana u jedru, a retko u citoplazmi (Allan i sar., 2000; Rosell i sar., 2000). Ponekad je moguće dokazati virusni genetski materijal i u cirkulišućim mononuklearnim ćelijama u sinusoidima i portnim regijama jetre, kao i u endotelnim ćelijama kapilara. U izraženim slučajevima PMWS Kupferove ćelije, po koja endotelna ćelija, ćelije inflamatornog infiltrata i ćelije granuloma su pozitivne na nukleokapsidni protein

PCV2. Slično kao i u limfnom čvoru makrofagi učestvuju u fagocitozi i u citoplazmi sadrže antigene virusa. Prisustvo virusnog antigena u njihovom ćelijskom jedru je zanemarujuće u odnosu na količinu virusnog antigena u citoplazmi (Krakowka i sar., 2004).

Neki autori su na osnovu težine lezija u jetri svinja inficiranih cirkovirusom tip 2 hepatična oštećenja podelili u četiri stadijuma (Rosell i sar., 2000). Prvi stadijum oštećenja jetre se karakteriše niskim intenzitetom inflamatorne reakcije portnog prostora multifokalnog karaktera. Drugi stadijum se karakteriše umereno do intenzivno izraženom ćelijskom infiltracijom u parenhimu jetre uz aktivaciju Kupferovih ćelija. Ređe se mogu naći apoptotska tela u parenhimu jetre. Karakteristično obeležje trećeg stadijuma oštećenja jetre je prisustvo mononuklearnog infiltrata u jetrinom parenhimu, disorganizacija arhitekture režnjića različitog stepena i prisustvo apoptotskih tela. Intenzivna difuzna inflamatorna infiltracija je prisutna u portnim prostorima. U polovini slučajeva uočava se povećanje hepatocita sa izraženom kariomegalijom. Ne retko, zapaža se i kondenzacija hromatina uz jedrov omotač. Četvrti stadijum se karakteriše generalizovanom perilobularnom fibrozom sa izraženom disorganizacijom arhitekture režnjića i masovnim gubitkom hepatocita. Preostala stroma je difuzno infiltrirana mononuklearnim ćelijama (Rosell i sar., 2000). Ovi nalazi pokazuju da hepatociti mogu da budu ciljne ćelije za PCV2 i da se u njima vrši replikacija virusa. Verovatno se hepatociti inficiraju preko Kupferovih ćelija, endotelnih ćelija sinusoida i mononuklearnih ćelija koji su lokalizovani periportno. Infekcija hepatocita se kvalitativno razlikuje od infekcije ćelija monocitno-makrofagne linije, utoliko što je kod hepatocita lokalizacija virusa u jedru dok je kod ovih drugih u citoplazmi. Infekcija hepatocita dovodi do promene u morfološkom izgledu ovih ćelija i do njihovog raspada, uključujući megalocitozu sa kariomegalijom i apoptotsku alteraciju (Clark, 1997; Rosell i sar., 2000). Histopatološki nalaz upućuje na mišljenje da su PCV2 i apoptoza najverovatnije u vezi sa smrću hepatocita. Tako, ekstenzivni gubitak hepatocita, difuzna zapaljenska infiltracija jetre i perilobularna fibroza dovode do zadnjeg stadijuma oštećenja jetre. Makroskopski, ove jetre su cirotične, i bez mogućnosti za regeneraciju. Proliferacija bilijarnih kanala nije obavezan nalaz (Rosell i sar., 2000; Segales i sar., 2004).

Ispitivanja istraživača u Srbiji su pokazala da je najučestalija histopatološka promena u jetri poreklom od prasadi obolele od PMWS bila infiltracija portalne regije mononuklearnim ćelijskim elementima različitog intenziteta. Grupe mononuklearnih

ćelija se takođe mogu naći i u sinusoidnim prostorima jetre. Čest je nalaz povećanog broja Kupferovih ćelija u sinusoidnim prostorima jetre. Neke Kupferove ćelije imaju zarezasto jedro nalik na srp, dok druge imaju okruglasto ili zvezdasto jedro. U periportnom delu lobulusa ponekad se mogu videti multifokalne nekroze pojedinačnih hepatocita. Spomenute promene uglavnom ne narušavaju arhitekturu režnjića jetre. Kod manjeg broja obolelih prasadi uočljivi su znaci periportne fibroze. U tom slučaju, pored izraženih interlobularnih vezivno-tkivnih septi, uočljiv je i gubitak većeg broja hepatocita i difuzna infiltracija mononuklearnim ćelijama, uz narušenu arhitekturu lobulusa (Becskei i sar, 2010).

Virus svinjskog hepatitisa E je ubikvitaran virus kod svinja širom sveta i ima zoonotski potencijal. Stoga, postoje dva osnovna problema kada je u pitanju HEV: 1. Infekcija virusom hepatitisa E je infekcija visoko rizičnih grupa kao što su veterinari, zatim odgajivači svinja i 2. Prenošenje svinjskog virusa hepatitisa E putem svinjskih ksenograftova u ljudske recipijente pri ksenotransplantaciji i potencijalno posledično prenošenje virusa na druge ljude. Potencijalni ksenozoonotski rizik se može prevenirati adekvatnim ispitivanjem i striktnim poštovanjem procedure za svinje donore (Meng, 2003; Meng i Halbur, 2006).

Pojava akutnog hepatitisa E kod ljudi u razvijenim zemljama se možda potcenjuje zbog toga što se javljaju sporadični slučajevi koji se često ne dijagnostikuju kao hepatitis E. Odgovarajuća lična higijena, i uopšte primena higijenskih mera na javnim mestima, zatim farmama svinja, može smanjiti rizik od prenošenja ovog virusa (Meng i Halbur, 2006). Ukoliko se sporadični slučajevi hepatitisa E kod ljudi i dalje budu javljali kao rezultat konzumiranja nedovoljno termički obrađenog svinjskog mesa, trebalo bi, u tom slučaju, raditi na eliminaciji virusa hepatitisa E u komercijalnoj proizvodnji svinja (Meng i Halbur, 2006).

Vakcinacija kao metod kontrole ove bolesti u humanoj populaciji će u budućnosti verovatno biti dostupna, s obzirom da se radi na razvijanju rekombinantne vakcine za ljude. Nemogućnost efikasne kultivacije virusa hepatitisa E na ćelijskim kulturama u velikoj meri ograničava razumevanje biologije i mehanizama delovanja virusa i usporava napredak u razvoju same vakcine (Meng, 2010).

Neka od ispitivanja su pokazala da je jedna od mogućih preporuka za kontrolu ove infekcije svakako primena biosigurnosnih mera kao i pridržavanje principa dobre proizvođačke i higijenske prakse na farmama svinja. Ukoliko postoji mogućnost na farmama bi trebalo, posle odbijanja prasadi i prebacivanja u druge tehnološke faze

proizvodnje, onemogućiti mešanje prasadi iz različitih legala u istim boksevima i tako sprečiti potencijalno širenje virusa iz zaraženih legala (Nakai i sar., 2006). Osim navedenih i drugi stresni faktori kao što je na primer promena hrane kao i načina ishrane mogu uticati na širenje infekcije (Kelley, 1980).

Epizootiološka ispitivanja u Japanu su pokazala da se u više od 95% slučajeva infekcija svinja virusom hepatitisa E dešava do uzrasta od 150. dana i da je mogućnost ekskrecije virusa mala 180. dana kada se tovljenici obično upućuju na klanje. Ipak bi u slučaju značajnijeg povećanja incidencije infekcije moglo doći do pomeranja ove granice ka starijim kategorijama svinja i potencijalne mogućnosti prenošenja infekcije sa svinja na ljude. Ukoliko bi incidencija infekcije počela da raste bilo bi neophodno sprovesti radikalne mere, kao na primer odvajanje zdravih od inficiranih svinja na kraju perioda dojenja kako bi se smanjio broj inficiranih životinja na kraju perioda tova (Satou i Nishiura, 2007).

### 3. Cilj i zadaci

Cilj ovih ispitivanja bio je da se utvrde karakter i stepen oštećenja hepatocita kod svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E. U tu svrhu ispitani su:

1. Prevalencija infekcije svinja virusom hepatitisa E na farmama u Srbiji ispitivanjem rektalnih briseva svinja različitih proizvodnih kategorija;
2. Prisustvo virusne RNK u jetri;
3. Biohemijski parametri krvi (ukupni proteini, albumini AST, ALT, GGT, ukupni bilirubin);
4. Makroskopske promene na jetri kod zaklanih svinja;
5. Karakter i distribucija histoloških lezija u jetri svinja inficiranih virusom hepatitisa E;
6. Imunofenotipizacija i gustina mononuklearnog infiltrata jetre;
7. Distribucija ćelija koje ekspimiraju TGF- $\beta_1$ ;
8. Evaluacija histoloških lezija;
9. Odnos između stepena histoloških lezija i biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. ŽIVOTINJE

Ispitivanja su izvršena na 4 farme svinja iz različitih regiona Srbije. Ispitane farme su brojale od 200 do 1500 priplodnih krmača i imale su zatvoreni proizvodni ciklus. Prasad u odgoju su bila smeštena u kaveze ili bokseve sa žičanim podom ili sa podom od perforirane plastike, a tovljenici u bokseve sa rešetkastim podom. Ishrana se obavljala iz automatskih hranilica *ad libitum* sa potpunom krmnom smešom za pojedine proizvodne kategorije.

Da bi se ustanovila prevalencija HEV infekcije u populaciji svinja, urađeno je uzorkovanje rektalnih briseva po proizvodnim kategorijama od klinički zdravih svinja. Na farmi A uzorkovano je ukupno 113 rektalnih briseva i to: 10 iz kategorije krmača, 10 iz kategorije prasadi na sisi (uzrasta od 0 do 28 dana), 31 iz kategorije prasadi iz odgoja (uzrasta od 28 do 75 dana) i 62 iz kategorije svinja iz tova (uzrasta od 75 do 120 dana). Na farmi B, C i D uzorkovano je po 40 rektalnih briseva i to po 10 iz svake proizvodne kategorije: krmače, prasad na sisi (uzrasta od 0 do 28 dana), prasad iz odgoja (uzrasta od 28 do 75 dana) i svinje iz tova (uzrasta od 75 do 120 dana). Rektalni brisevi su suspendovani u PBS-u, pH 7,2, centrifugirani i supernatant za ekstrakciju RNK čuvan na temperaturi od -78 °C do momenta ispitivanja.

### 4.2. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA

Kod svinja kod kojih je metodom RT-PCR u uzorku rektalnog brisa utvrđena nukleinska kiselina virusa hepatitisa E, izvršena je punkcija *vena cava cranialis* i uzeta je krv za biohemijska ispitivanja. Nakon koagulisanja krvi, izvršeno je centrifugiranje i izdvajanje seruma, u kome su uz pomoć poluautomatskog biohemijskog spektrofotometra (*Rayto RT-1904 VC*, Južna Koreja) određeni sledeći parametri: ukupni proteini, albumini, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT),  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza (GGT) i ukupni bilirubin.

### **4.3. MAKROSKOPSKI PREGLED I UZIMANJE UZORAKA**

Svinje kod kojih je RT-PCR metodom u uzorku rektalnog brisa utvrđena nukleinska kiselina virusa hepatitisa E, upućene su na redovno klanje. Na liniji klanja izvršen je detaljni makroskopski pregled jetre i uzeti uzorci za histopatološku, imunohistohemijsku, RT-PCR i bakteriološku analizu. Kontrolnu grupu svinja činilo je deset svinja kod kojih RT-PCR metodom iz rektalnog brisa nije ustanovljeno prisustvo HEV RNK. Te svinje su takođe upućene na redovno klanje, gde je na liniji klanja izvršen detaljan makroskopski pregled jetre i uzeti uzorci jetre za histopatološku, imunohistohemijsku, RT-PCR i bakteriološku analizu, kao i od inficiranih svinja. Iz istih uzoraka jetre urađena je molekularna detekcija genoma svinjskog cirkovirusa 2.

### **4.4. HISTOLOŠKO I IMUNOHISTOHEMIJSKO ISPITIVANJE**

Uzorci jetre veličine 2x1x0,5 cm za histopatološka i imunohistohemijska ispitivanja su fiksirani u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48 - 72 časa. Posle fiksacije tkivo je procesovano u automatskom tkivnom procesoru (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski isečci debljine 3 do 5µm bojeni su hematoksilin-eozin (HE) i *Masson* trihrom (MTH) metodom.

Od imunohistohemijskih metoda korišćena je trostepena streptavidin-biotin metoda (LSAB2). U tkivnim isečcima je najpre izvršeno demaskiranje antigena, maskiranih fiksiranjem u formalinu. Demaskiranje CD3 i CD79 antigena vršeno je zagrevanjem u mikrotalasnoj peći na 560W u trajanju od 21 minut, u citratnom puferu pH=6, dok je demaskiranje TGFβ<sub>1</sub> postignuto proteinazom K u trajanju od 40 minuta na sobnoj temperaturi. Endogena peroksidaza blokirana je u 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu, na temperaturi od 18°C u trajanju od 15 minuta. Sva ispiranja i razblaženja tokom reakcije rađena su u PBS-u pH=7,2-7,4. Preinkubacija je vršena u 10% kozjem serumu u PBS-u u trajanju od 20 minuta. Odmah zatim isečci su inkubirani sa primarnim antitelima i odgovarajućim kitom za vizuelizaciju.

U imunohistohemijskoj metodi korišćena su:

1. primarna antitela:

- monoklonsko mouse-anti-human CD79 (Dako, M7051) u razređenju 1:50 u trajanju 60 minuta u vlažnoj komori na temperaturi od 18 °C
- monoklonsko rabbit-anti-human CD3 (Dako, A0452), u razređenju 1:50 u trajanju od 60 minuta u vlažnoj komori na temperaturi od 18 °C
- rabbit polyclonal antibody TGFβ<sub>1</sub> (v) (Santa Cruz Biotechnology, sc-146) u razređenju 1:100 preko noći na temperaturi od 4 °C

2. odgovarajući kit za detekciju:

- Dako Cytomation LSAB2 System-HRP (Dako, K0675)
- Dako Envision GI2 Doublestain sistem (K5361)

Antigen-antitelo kompleks koji je nastao u tkivu postao je vidljiv primenom diaminobenzidina (DAB+, Dako, K3468) u trajanju od 10 do 15 minuta. Na mestu pozitivne reakcije javlja se precipitat smeđe boje. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u hematoksilinu (Mayer-ov hematoksilin) u trajanju od 10 sekundi. Nakon bojenja isečci su montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje Glycergel (Dako, C563).

Kao negativna kontrola korišćeni su istovetni tkivni isečci koji nisu tretirani primarnim antitelima. Kao pozitivna kontrola korišćeni su tkivni isečci kod kojih je prethodno imunohistohemijski potvrđeno prisustvo ispitivanih antigena.

Za istovremenu vizuelizaciju dva različita antigena na istom tkivnom isečku jetre svinja korišćen je „DAKO Envision GI2 Doublestain“ sistem (K5361). Vizuelizacija se zasniva na peroksidazi (HRP) i DAB+, kao hromogenu prvog antigena i alkalnoj fosfatazi (AP) i „permanent red“ (PR), kao hromogena za obeležavanje drugog antigena. Na ovaj način prvim primarnim antitelima obeleženi molekuli su obojeni smeđom bojom, a molekuli obeleženi drugim primarnim antitelom intenzivnom ružičastom bojom. Ovaj sistem ne sadrži biotin i na taj način se značajno smanjuju nespecifična bojenja usled endogene biotin-avidin aktivnosti.

Procedura pripreme tkivnih isečaka (deparafinizacija, dehidratacija i demaskiranje antigena), identična je kao i kod klasičnog imunohistohemijskog bojenja. Posle završene procedure demaskiranja antigena rađeno je ispiranje tkivnih isečaka sa puferom za ispiranje u trajanju od 5 minuta. Blokiranje endogenih alkalnih fosfataza, peroksidaza i pseudoperoksidaza vršeno je aplikovanjem „Dual



endogenous enzyme blocks“ reagensa, u trajanju od 5 minuta ( $\pm$  1 minut). Potom je usledilo inkubiranje sa primarnim antitelom u optimalnoj koncentraciji i vremenu. Nakon ovog koraka usledila je inkubacija sa „HPR/Polymer“ reagensom, u trajanju od 10 minuta ( $\pm$  1 minut). Nakon toga je usledilo inkubiranje sa prvim hromogenom - DAB+. Inkubacija sa radnim rastvorom hromogena vršena je u trajanju od 5-15 minuta, uz kontrolu stepena obojenosti pod svetlosnim mikroskopom. Nakon bojenja sa prvim hromogenom usledilo je aplikovanje „Doublestain block“ reagensa u trajanju od 3 minuta. Dalje sledi inkubacija sa drugim primarnim antitelom u preporučenoj koncentraciji i vremenu trajanja. Inkubacija sa „Rabbit/Mouse LINK“ reagensom urađena je u trajanju od 10 minuta ( $\pm$  1 minut). Nakon ovog koraka usledilo je aplikovanje „Polymer/AP“ reagensa u trajanju od 10 minuta ( $\pm$  1 minut), a na kraju aplikovanje radnog rastvora drugog hromogena, PR u trajanju od 5-20 minuta. Kontrastiranje isečaka je izvršeno u hematoksilinu (Mayer-ov hematoksilin) u trajanju od deset sekundi. Montiranje je urađeno sa vodenim medijumom za montiranje DAKO Glycergel (C563).

#### 4.5. SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA

Evaluacija histopatoloških promena je zasnovana na kriterijumima koji su korišćeni za procenu gustine i distribucije limfocitno – plazmaćelijskog infiltrata u jetri svinja eksperimentalno inficiranih virusom hepatitisa E (Halbur i sar., 2001). Kriterijumi za semikvantitativnu analizu prikazani su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Kriterijumi za semikvantitativnu analizu

| Stepen promene | Opis promene   |
|----------------|--|
| 0              | Bez inflamatornih promena  |
| 1.             | Jedan do dva fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre  |
| 2.             | Dva do pet fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre    |
| 3.             | Šest do deset fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre |
| 4.             | Više od 10 fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre    |

#### 4.6. MORFOMETRIJSKA ANALIZA

Histološki preparati su pregledani optičkim mikroskopom Olympus BX51 uz upotrebu uobičajenih uveličanja (20x, 40x, 100x, 200x, 400x i 600x). Za morfometrijsku analizu korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B. U svakom preparatu su izbrojane CD3 i CD79 pozitivne ćelije koje su se nalazile u lobulusima i portnim prostorima jetre. Pomenuta merenja izvršena su u svakom preparatu na dvadesetpet nasumično odabranih vidnih polja na uveličanju objektivu 40x. Unutar svakog vidnog polja definisana je mrežica sa poljima veličine 100x100 mikrometara. Brojanje je izvršeno u četiri slučajno izabrana kvadrata u svakom vidnom polju, što iznosi 0,04mm<sup>2</sup> po vidnom polju. S obzirom da je merenje izvedeno na dvadesetpet nasumično odabranih vidnih polja ukupna površina na kojoj je izvršeno merenje iznosi 1mm<sup>2</sup> za svaki ispitani preparat.

Nakon određivanja broja CD3 i CD79 pozitivnih ćelija izračunata je prosečna vrednost i standardna devijacija za svaku ispitanu grupu.

Digitalne fotografije su napravljene pomoću optičkog mikroskopa Olympus BX51 sa digitalnom kamerom Olympus Color View III.

#### 4.7. MOLEKULARNA DETEKCIJA VIRUSA HEPATITISA E

Uzorci tkiva jetre, zapremine 1 cm<sup>3</sup>, za molekularnu detekciju dela ORF2 fragmenta virusa hepatitisa E RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) metodom, su najpre homogenizovani u tarioniku, zatim su suspendovani u 9ml PBS, centrifugirani na 2000 obrtaja u minuti u trajanju od 10 minuta, a odliveni supernatant je do momenta ispitivanja čuvan na temperaturi od -78 °C.

**I Ekstrakcija** – Ekstrakcija RNK i HEV RT-PCR i RT-nested-PCR iz uzoraka rektalnih briseva i tkiva jetre – prema uputstvu proizvođača *QIAamp ViralRNA Mini kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka)

Protokol za ekstrakciju RNK:

1. U mikrotubu od 1,5 ml sipati 560 µl pripremljenog AVL pufera koji sadrži RNK nosač;
2. Dodati 140 µl supernatanta suspendovanog fecesa i vorteksovati 15 sekundi;
3. Inkubirati na sobnoj temperaturi (15-25 °C) u trajanju od 10 minuta;

4. Kratko centrifugirati na 8000 obrtaja u minuti;
5. Dodati 560 µl etanola (96-100%) i vorteksovati 15 sekundi;
6. Kratko centrifugirati na 8000 obrtaja u minuti;
7. Pažljivo uzeti 630 µl ovog rastvora i pipetirati u mini spin kolonu (2 ml), a potom centrifugirati na 8000 obrtaja u minuti. Prebaciti spin kolonu u novu mikrotubu i filtrat odbaciti;
8. Ponoviti još jednom korak pod tačkom 7;
9. Pažljivo otvoriti mini spin kolonu i dodati 500 µl pufera AW1 i centrifugirati na 8000 obrtaja u minuti. Prebaciti spin kolonu u novu mikrotubu i filtrat odbaciti;
10. Pažljivo otvoriti mini spin kolonu i dodati 500 µl AW2 pufera i centrifugirati na 13000 obrtaja po minutu u trajanju od 3 minuta. Prebaciti mini spin kolonu u novu mikrotubu zapremine 1,5 ml, a filtrat odbaciti. Dodati 60 µl AVE pufera i inkubirati na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minut. Centrifugirati na 8000 obrtaja u minuti u trajanju od 1 minuta;
11. Ekstrahovana RNK je čuvana na temperaturi od -87 °C ili je odmah korišćena u reakciji lančane polimeraze.

**II Reakcija lančane polimeraze** - Svi uzorci su ispitani RT-PCR metodom, dok su svi negativni RT-PCR uzorci podvrgnuti nested-PCR metodi.

1. RT-PCR i nested-PCR – *HotStar Taq MasterMix Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka)* i dva degenerisana seta prajmera za ORF2 region genoma HEV: HEVORF2con-s1 – 5'GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG – 3' i HEVORF2con-a1 – 5'CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC – 3'. Za nested PCR korišćeni su sledeći prajmeri: HEVORF2con-s2 – 5'GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC – 3' i HEVORF2con-a2 – 5'GTTTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG – 3'. Konačni produkt posle RT-PCR je dužine 197 baznih parova, a posle nested-PCR 145 baznih parova;
2. One step RT-PCR po jednom uzorku: 2 µl RNK se dodaje u reakcionu smešu krajnje zapremine 18 µl (Qiagen, Hilden, Nemačka) koji sadrži: 7,2 µl vode slobodne od RNaza, 4 µl 3X Qiagen pufera, 0,8 µl dNTP mešavine nukleotida, po 0,6 µl *forward* i *reverse* prajmera (HEVORF2con-s1 i HEVORF2con-a1) i 0,8 µl mešavine enzima neophodnih za reakciju;

3. Ciklus reverzne transkripcije na 50 °C u trajanju od 30 minuta;
4. Denaturacija na 95 °C u trajanju od 15 minuta;
5. 40 ciklusa denaturacija na 94 °C u trajanju od po 45 sekundi, vezivanje prajmera na 49 °C u trajanju od 45 sekundi i polimerizacija na 72 °C u trajanju od 1 minuta; jedan ciklus krajnje elongacije u trajanju od 7 minuta na 72 °C;
6. Negativni uzorci su nadalje podvrgnuti nested-PCR gde su korišćeni interni prajmeri HEVORF2con-a2 i HEVORF2-con-s2;
7. 1 x PCR pufer (HotStar Master Mix Kit, Qiagen, Hilden, Nemačka) u količini od 10 µl, po 0,4 µl *forward* i *reverse* prajmera i 7,2 µl vode slobodne od Rnaza;
8. prvi ciklus na 95 °C u trajanju od 15 sekundi, 35 ciklusa na 94 °C u trajanju od 45 sekundi, na 49 °C u trajanju od 45 sekundi i na 72 °C u trajanju od jednog minuta i jedan ciklus elongacije od 7 minuta na 72 °C;
9. Amplifikovani produkti se boje etidium bromidom u 2% agaroznom gelu;
10. Negativni i pozitivni uzorci su bili uključeni kao kontrole. Kao negativna kontrola korišćena je destilovana voda, dok je kao pozitivna kontrola korišćen uzorak dobijen sa Odeljenja za virusologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ iz Novog Sada.

Vizuelizacija lančane reakcije polimeraze je postignuta gel elektroforezom u agaroznom gelu koncentracije 2%, u 1 x TBE puferu, sa dodatkom etidium bromida kao fluorescentnog indikatora. Proces elektroforeze je obavljen u *Hoeffler submarine* aparatu za elektroforezu, pri naponu od 60 V i jačini struje od 10mA tokom 30 minuta.

Radi određivanja karakteristične dužine amplifikovanog segmenta korišćen je molekularni marker *Fast ruler DNA ladder, low range (Fermentas, Lithuania)*.

Da bi se izbegla unakrsna kontaminacija, svaka faza dijagnostičkog postupka (od pripreme uzorka do nested-PCR) je rađena u odvojenim prostorijama koje su namenjene PCR dijagnostici, uz primenu odgovarajuće opreme i materijala.

#### **4.8. MOLEKULARNA DETEKCIJA SVINJSKOG CIRKOVIRUSA TIP 2 (PCV2)**

Uzorci tkiva jetre, zapremine 1 cm<sup>3</sup>, za molekularnu detekciju dela ORF2 fragmenta svinjskog cirkovirusa tip 2 PCR (*polymerase chain reaction*) metodom, su najpre homogenizovani u tarioniku, zatim su suspendovani u 9ml PBS, centrifugirani na 2000 obrtaja u minuti u trajanju od 10 minuta, a odliveni supernatant je do momenta ispitivanja čuvan na temperaturi od -78 °C.

**I Ekstrakcija** – prema uputstvu proizvođača *QIAamp DNA Mini kit* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*)

**II Reakcija lančane polimeraze** – prema uputstvu proizvođača *HotStar Taq MasterMix Kit* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*) uz upotrebu oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju ORF2 region genoma PCV2: ORF2 *forward* 5' GGTAATACTTACAGCGCACTTC 3' i ORF2 *reverse* 5' CCCCATGCCCTGAATTTCC 3'.

#### **4.9. BAKTERIOLOŠKA ANALIZA**

Uzorci jetre za bakteriološka ispitivanja zasejani su na agar sa 5% ovčije krvi i Mac Conkey agar i inkubirani na 37 °C tokom 48 časova. Istovremeno su uzorci zasejani na Zeissler-ov agar i inkubirani u anaerobnim uslovima (Genbox anaer bio Merieux) tokom 48 časova.

#### **4.10. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata, kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina  $\bar{X}$ , standardna devijacija SD, standardna greška SE, minimalna vrednost  $X_{\min}$  i maksimalna vrednost  $X_{\max}$  i koeficijent varijacije CV). Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika upotrebljena su dva testa. Prvi test, potpuno slučajan plan (ANOVA), je grupni test i na osnovu njega je ustanovljeno eventualno postojanje signifikantnih razlika između posmatranih grupa. Drugi test je pojedinačni test, Tukey test, pomoću kojeg

su ustanovljene statistički signifikantne razlike između grupa, pojedinačno. Signifikantnost razlika je određena na nivou značajnosti od 5% i 1%. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata je izvršena u statističkom paketu *Palisade StatTools* verzija 1.0.1, u programskom dodatku za *Microsoft Excel 2007*.

## 5. Rezultati

### 5.1. REZULTATI ISPITIVANJA PREVALENCIJE INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E

Rezultati ispitivanja prevalencije infekcije virusom hepatitisa E prikazani su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Prevalencija ekskrecije virusa hepatitisa E fecesom po proizvodnim kategorijama svinja

| Farma svinja  | Broj pozitivnih svinja u različitim proizvodnim kategorijama |                     |                   |            |               |
|---------------|--|---------------------|-------------------|------------|---------------|
|               | Prasad na sisi (%)   | Prasad u odgoju (%) | Svinje u tovu (%) | Krmače (%) | Ukupno (%)    |
| A             | 0/10 (0)   | 6/31 (19,35)        | 3/62 (4,84)       | 0/10 (0)   | 9/113 (7,96)  |
| B             | 0/10 (0)   | 0/10 (0)            | 0/10 (0)          | 0/10 (0)   | 0/40 (0)      |
| C             | 0/10 (0)   | 3/10 (30)           | 0/10 (0)          | 0/10 (0)   | 3/40 (7,5)    |
| D             | 0/10 (0)   | 0/10 (0)            | 0/10 (0)          | 0/10 (0)   | 0/40 (0)      |
| <b>Ukupno</b> | 0/40 (0)   | 9/61 (14,75)        | 3/92 (3,26)       | 0/40 (0)   | 12/233 (5,15) |

Od ukupno ispitane 4 farme infekcija virusom hepatitisa E je ustanovljena na dve farme (50%). Ukupno je ispitano 233 svinje, od kojih je kod dvanaest u uzorku rektalnog brisa dokazana HEV RNK (5,15%). Prevalencija ekskrecije virusa fecesom se kretala od 7,5 do 7,96 % u zavisnosti od farme. Ni kod jednog praseta na sisi, kao ni kod jedne ispitane krmače nije dokazano izlučivanje virusa. U kategoriji prasadi u odgoju od ukupno ispitanih 61 kod 9 je dokazana HEV RNK u uzorku rektalnog brisa (14,75 %), dok je u kategoriji svinja u tovu od ukupno ispitanih 92 kod 3 svinje utvrđeno izlučivanje virusa fecesom (3,26 %).

Istovremenim ispitivanjem rektalnih briseva i jetre poreklom od 233 svinje metodom RT-PCR HEV RNK je dokazana u 12 uzoraka rektalnih briseva i pet uzoraka jetre. Istovremeno prisustvo HEV RNK u uzorku rektalnog brisa i jetre je ustanovljeno kod pet svinja (41,67%).

## 5.2. REZULTATI ISPITIVANJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI

Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja prikazani su u tabeli 4.

**Tabela 4.** Rezultati biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja

|            | Ukupni proteini (g/dl) | Albumini (g/dl) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) | GGT (IU/l) | Ukupni bilirubin ( $\mu$ mol/l) |
|------------|------------------------|-----------------|------------|------------|------------|---------------------------------|
| $\bar{X}$  | 6,81                   | 2,42            | 87,46      | 65,41      | 40,54      | 8,95                            |
| SD         | 0,48                   | 0,41            | 31,29      | 11,42      | 10,29      | 1,81                            |
| SE         | 0,14                   | 0,12            | 9,03       | 3,29       | 2,97       | 0,52                            |
| CV (%)     | 7,05                   | 16,94           | 35,78      | 28,81      | 28,86      | 20,23                           |
| $X_{\min}$ | 5,79                   | 1,91            | 56,48      | 49,28      | 22,51      | 5,31                            |
| $X_{\max}$ | 7,78                   | 3,61            | 166,07     | 89,29      | 57,58      | 11,47                           |

Kao što se iz tabele 4. može videti, prosečna koncentracija ukupnih proteina kod inficiranih svinja iznosila je  $6,81 \pm 0,48$  g/dl, dok se koncentracija kretala u intervalu od 5,79 do 7,78 g/dl sa koeficijentom varijacije od 7,05%. Prosečna koncentracija albumina bila je  $2,42 \pm 0,41$  g/dl, sa intervalom od 1,91 do 3,61 g/dl i koeficijentom varijacije od 16,94%. Prosečna aktivnost enzima AST je bila  $87,46 \pm 31,29$  IU/l, sa minimalnom vrednošću od 56,48 IU/l i maksimalnom vrednošću od 166,07 IU/l. Koncentracija ALT se kretala od 49,28 do 89,29 IU/l ( $\bar{X} = 65,41 \pm 11,42$  IU/l), sa koeficijentom varijacije od 28,81%, a aktivnost enzima GGT od 22,51 do 57,58 IU/l ( $\bar{X} = 40,54 \pm 10,29$  IU/l) i koeficijentom varijacije od 28,86%. Koncentracija ukupnog bilirubina u ovoj grupi svinja je bila u opsegu 5,31 do 11,47  $\mu$ mol/l ( $\bar{X} = 8,95 \pm 1,81$   $\mu$ mol/l) sa koeficijentom varijacije od 20,23%.

Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi kontrolne grupe svinja prikazani su u tabeli 5.



**Tabela 5.** Rezultati biohemijskih parametara krvi kontrolne grupe svinja

|            | Ukupni proteini (g/dl) | Albumini (g/dl) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) | GGT (IU/l) | Ukupni bilirubin ( $\mu$ mol/l) |
|------------|------------------------|-----------------|------------|------------|------------|---------------------------------|
| $\bar{X}$  | 7,12                   | 2,40            | 79,07      | 51,39      | 50,14      | 7,29                            |
| SD         | 0,37                   | 0,49            | 20,93      | 5,75       | 10,26      | 1,40                            |
| SE         | 0,12                   | 0,15            | 6,62       | 1,82       | 3,25       | 0,44                            |
| CV (%)     | 5,19                   | 20,42           | 26,47      | 11,19      | 20,46      | 19,20                           |
| $X_{\min}$ | 6,61                   | 1,68            | 48,51      | 39,40      | 37,13      | 4,26                            |
| $X_{\max}$ | 7,65                   | 2,95            | 121,17     | 58,98      | 66,85      | 8,89                            |

Kao što se iz tabele 5. može videti, prosečna koncentracija ukupnih proteina u kontrolnoj grupi svinja iznosila je  $7,12 \pm 0,37$  g/dl, sa minimalnom vrednošću od 6,61 g/dl i maksimalnom vrednošću od 7,65 g/dl i koeficijentom varijacije od 5,19%. Koncentracija albumina se kretala u intervalu od 1,68 do 2,95 g/dl ( $\bar{X} = 2,40 \pm 0,49$  g/dl), sa koeficijentom varijacije od 20,42%. Prosečna aktivnost enzima AST je bila  $79,07 \pm 20,93$  IU/l, sa minimalnom vrednošću od 48,51 IU/l, maksimalnom vrednošću od 121,17 IU/l i koeficijentom varijacije od 26,47%. Najniža aktivnost enzima ALT je bila 39,40 IU/l, a najviša 58,98 IU/l ( $\bar{X} = 51,39 \pm 5,75$  IU/l) sa koeficijentom varijacije od 11,19%, dok je najniža vrednost za GGT u ovoj grupi svinja bila 37,13 IU/l, a najviša 66,85 IU/l ( $\bar{X} = 50,14 \pm 10,26$  IU/l) sa koeficijentom varijacije od 20,46%. Prosečna koncentracija ukupnog bilirubina bila je  $7,29 \pm 1,40$   $\mu$ mol/l, dok su vrednosti za ovaj parametar bile u intervalu od 4,26 do 8,89  $\mu$ mol/l, sa koeficijentom varijacije od 19,20%.

Rezultati značajnosti razlika izračunatih srednjih vrednosti ispitivanih biohemijskih parametara inficiranih svinja i svinja iz kontrolne grupe su prikazani u tabeli 6.

**Tabela 6.** Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti ispitivanih biohemijskih parametara inficiranih svinja i svinja iz kontrolne grupe

| Ukupni proteini (g/dl) | Albumini (g/dl) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) | GGT (IU/l) | Ukupni bilirubin (μmol/l) |
|------------------------|-----------------|------------|------------|------------|---------------------------|
| NZ                     | NZ              | NZ         | p < 0,01   | p < 0,05   | p < 0,05                  |

**Legenda:** NZ – nema statističke značajnosti razlika  
 p < 0,01 – utvrđena statistička značajnost na nivou od 99%  
 p < 0,05 – utvrđena statistička značajnost na nivou od 95%

Iz tabele 6. se može videti da nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima ukupnih proteina, albumina i AST između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe. Statistički veoma značajna razlika između inficiranih svinja i kontrolne grupe je utvrđena za ALT (p < 0,01), dok je za vrednosti GGT i ukupnog bilirubina razlika između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe bila statistički značajna (p < 0,05).

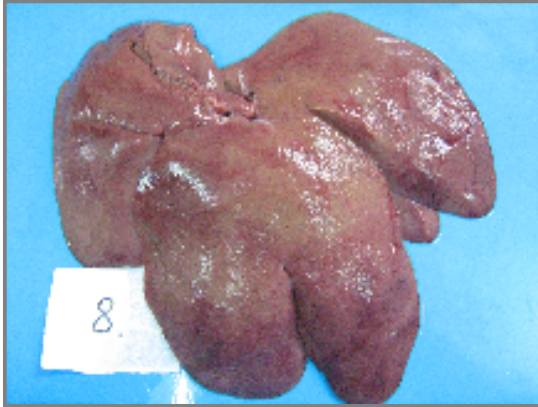
### 5.3. MAKROSKOPSKI NALAZ

#### 5.3.1. Kontrolna grupa

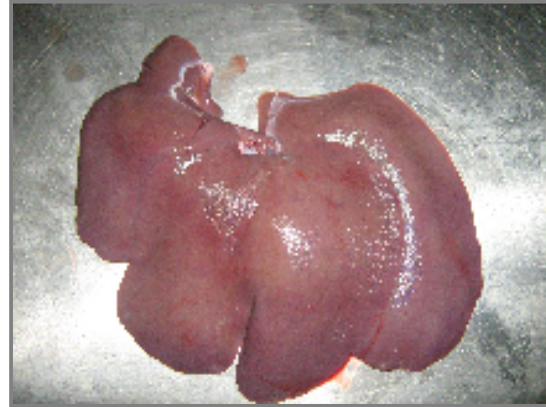
Pregledom jetre kontrolne grupe svinja dobro se uočava šest lobusa obavijenih vezivno-tkivnom kapsulom koja je glatka, sjajna, vlažna i prozirna. Ispod kapsule se uočava parenhim sa dobro diferenciranim lobulusima jetre. Parenhim jetre je jedre konzistencije, svetlo smeđe boje. Na preseku jetre vide se žučni kanalići kao i preseki većih krvnih sudova jetre.

#### 5.3.2. Jetra svinja inficiranih virusom hepatitisa E

Makroskopskim pregledom ustanovljeno je blago povećanje jetre (slika 1 i 2). Izrazito dilatirana žučna kesa je ustanovljena u četiri slučaja (33,33%). Žučna kesa je proširena, prominira preko ruba jetre i pri tom je bila ispunjena većom količinom žuči (slika 3). U šest slučajeva (50%), ustanovljeno je uvećanje portnih limfnih čvorova (slika 4). Limfni čvorovi su na preseku slatinasti i serozno prokvašeni, dok se kora i srž ne mogu razlikovati (slika 5).



**Slika 1.** Blago uvećanje jetre svinje inficirane virusom hepatitisa E



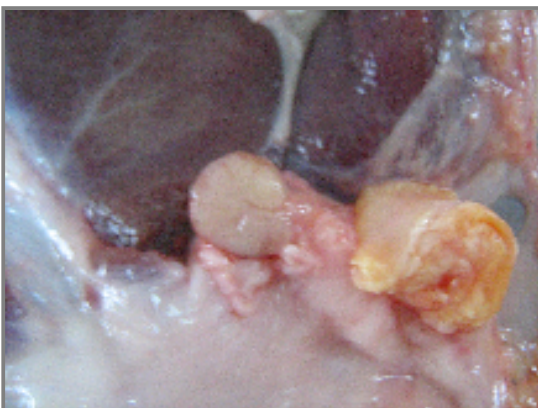
**Slika 2.** Blago uvećanje jetre svinje inficirane virusom hepatitisa E



**Slika 3.** Jetra svinje inficirane virusom hepatitisa E - uvećanje žučne kese koja prominira preko ruba jetre



**Slika 4.** Jetra svinje inficirane virusom hepatitisa E - povećanje portnog limfnog čvora



**Slika 5.** Jetra svinje inficirane virusom hepatitisa E - presek portnog limfnog čvora

## 5.4. HISTOPATOLOŠKI NALAZ

### 5.4.1. Kontrolna grupa

Histološkim pregledom jetre svinja koje nisu inficirane virusom hepatitisa E uočavaju se poligonalni do okrugli jetrini režnjići u čijem središtu se nalazi centralna vena od koje se radijalno pružaju hepatociti složeni u Remakove gredice. Svaki lobulus je jasno od okolnih lobulusa odvojen vezivno-tkivnim septama. Hepatociti su poliedarnog oblika sa jednim ili dva jedra smeštena u sredini ćelije, homogenom citoplazmom i jasnom međućelijskom granicom. Između Remakovih gredica vide se sinusoidni kapilari obloženi pločastim epitelom. U sinusoidnim kapilarima su smeštene Kupferove ćelije okruglog oblika ili oblika zareza. U uglovima između režnjića nalaze se portni prostori u kojima se jasno vide žučni kanalići, ogranak hepatične arterije i portne vene. U jednom portnom prostoru nalazi se od jedan do tri žučna kanalića. Žučni kanalići su obloženi cilindričnim epitelom. Lumen žučnih kanala je prazan. Ogranci hepatične arterije su obloženi endotelom, a *tunica media* je sastavljena od glatko-mišićnih ćelija vretenastog oblika. Ogranci portalne vene su takođe obloženi endotelom. Središnji sloj zida je građen od vretenastih glatko-mišićnih ćelija sa homogenom citoplazmom. Oko žučnih kanalića, arterija i vena nalazi se stroma sastavljena od kolagenih vlakana i retkih fibroblasta.

### 5.4.2. Jetra svinja inficiranih virusom hepatitisa E

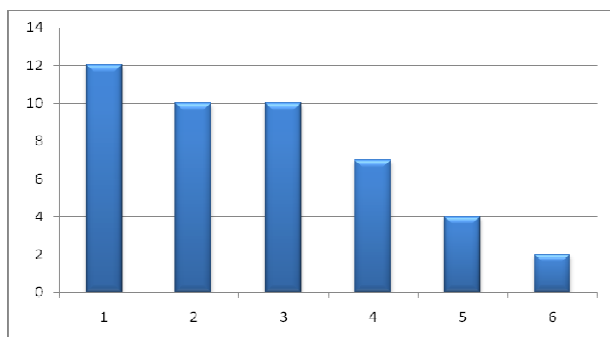
Histološkim pregledom uzoraka jetre svinja inficiranih virusom hepatitisa E dominantan nalaz čini prisustvo mononuklearnog ćelijskog infiltrata različite distribucije i gustine. Uočeni mononuklearni infiltrat se sastoji od limfocita, plazma ćelija i makrofaga. U slučajevima u kojima je izražena nekroza uz opisani mononuklearni ćelijski infiltrat vide se i polimorfonuklearni granulociti. U svih 12 uzoraka (100%) mononuklearni ćelijski infiltrat nalazi se u portnim prostorima jetre (slika 6), gde je blago do umereno zastupljen, dok je u 10 uzoraka (83,33%) uočen multifokalno u parenhimu jetre (slika 7, 8 i 9) (tabela 7, grafikon 1). Hepatociti su pokazivali različit stepen degeneracije. Pored hepatocita sa zamućenom citoplazmom i delimično ili potpuno maskiranim jedrom, uočavaju se i hepatociti vakuolizovane citoplazme. Stepem vakuolizacije je bio različit počev od penušavog izgleda

citoplazme pa sve do nalaza krupnih vakuola koje potpuno ispunjavaju citoplazmu hepatocita (slika 10). U ovako izmenjenim hepatocitima ponekad su jedra bila nekrobiotična i postavljena uz plazminu membranu, a u nekim slučajevima jedra su nedostajala. Promene ovog karaktera nisu imale zonalni raspored, već su nasumično raspoređene po lobulusima jetre. U nekim uzorcima jetre u centrolobularnom i srednjezonalnom području uočavaju se znaci hepatocelulolize, sve do potpunog iščezavanja ostataka hepatocita (slika 11 i 12). Ovakva područja su okružena proširenim sinusoidnim kapilarima i brojnim aktiviranim Kupferovim ćelijama. Kao posebno interesantan nalaz ističe se prisustvo pojedinačnih hepatocita nasumično raspoređenih po lobulusima čija je citoplazma kondenzovana i acidofilnog karaktera. Acidofilni hepatociti su okruženi svetlom halo zonom što se uklapa u morfološku sliku apoptoze (slika 13).

Opisane histopatološke promene upućuju na akutni virusni hepatitis sa nekroinflamatornim promenama u tkivu jetre, bez narušavanja arhitekture lobulusa jetre. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena data je u tabeli 7 i grafikonu 1.

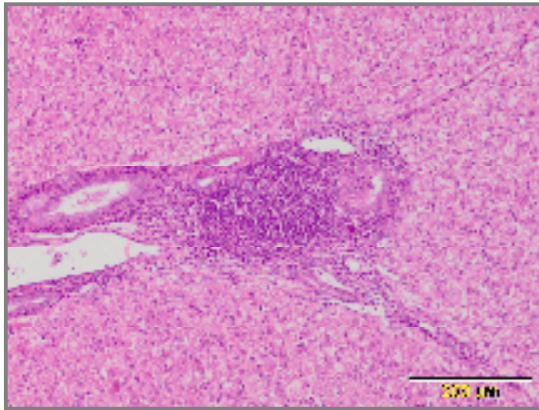
**Tabela 7.** Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u jetri svinja inficiranih virusom hepatitisa E

| Tip promene   | Učestalost promene (%) |
|---|------------------------|
| Mononuklearni ćelijski infiltrat u portnim prostorima jetre     | 12/12 (100)            |
| Multifokalni mononuklearni ćelijski infiltrat u parenhimu jetre | 10/12 (83,33)          |
| Hidropsna degeneracija hepatocita                               | 10/12 (83,33)          |
| Povećani broj Kupferovih ćelija                                 | 7/12 (58,33)           |
| Acidofilna apoptotska tela                                      | 4/12 (33,33)           |
| Područja masivne nekroze  | 2/12 (16,67)           |

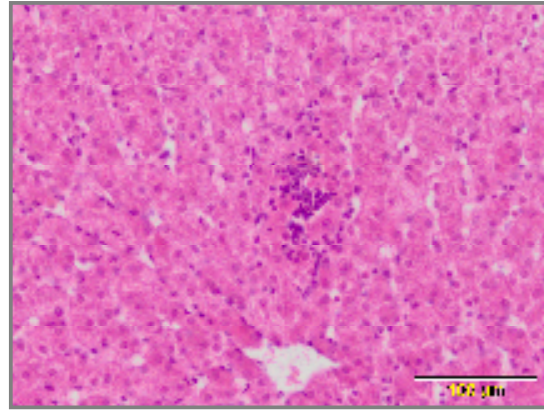


1. Mononuklearni ćelijski infiltrat u portnim prostorima jetre
2. Multifokalni mononuklearni ćelijski infiltrat u parenhimu jetre
3. Hidropsna degeneracija hepatocita
4. Povećani broj Kupferovih ćelija
5. Acidofilna apoptotska tela
6. Područja masivne nekroze

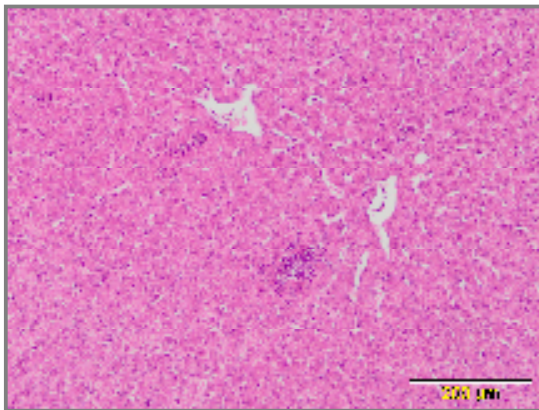
**Grafikon 1.** Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u jetri svinja inficiranih virusom hepatitisa E



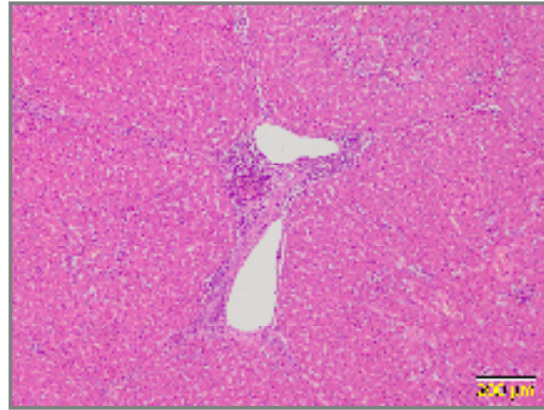
**Slika 6.** Jetra svinje, mononuklearni ćelijski infiltrat lokalizovan u portnom prostoru jetre, HE



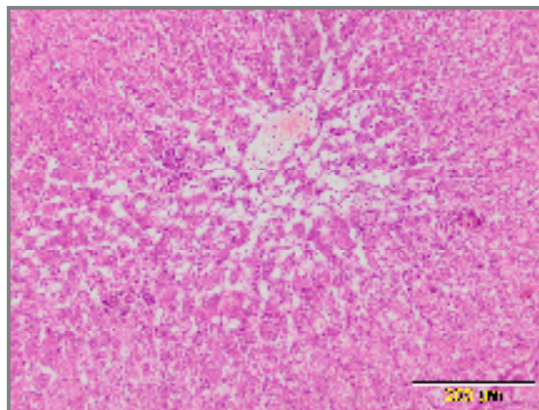
**Slika 7.** Jetra svinje, mononuklearni ćelijski infiltrat lokalizovan u proširenim sinusoidima jetre, HE



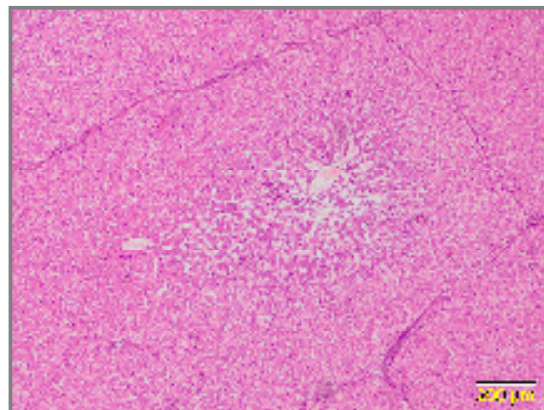
**Slika 8.** Jetra svinje, multifokalno raspoređen mononuklearni ćelijski infiltrat u parenhimu jetre, HE



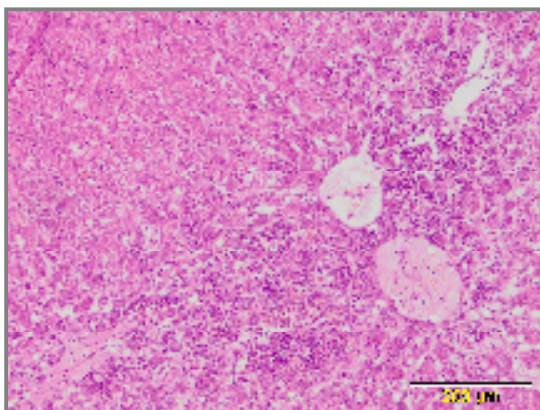
**Slika 9.** Jetra svinje, mononuklearni ćelijski infiltrat u portnom prostoru i parenhimu jetre, HE



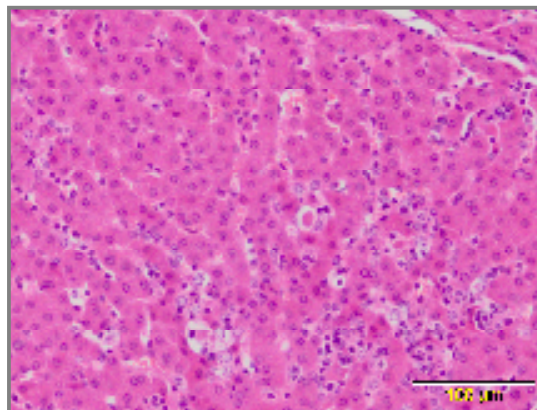
**Slika 10.** Jetra svinje, hepatociti podlegli hidropsnoj degeneraciji i nekrozi, HE



**Slika 11.** Jetra svinje, masivna nekroza hepatocita u centrolobularnom i srednjezonalnom području gde je istovremeno prisutan mononuklearni ćelijski infiltrat, HE

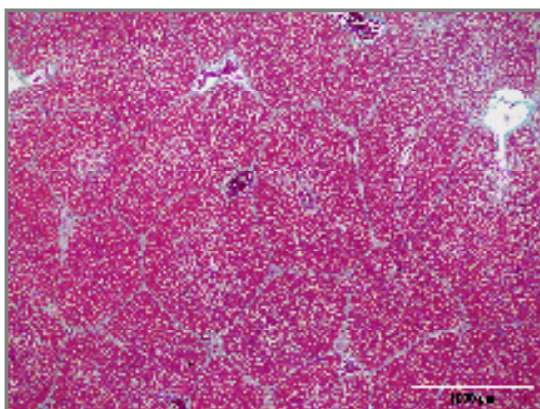


**Slika 12.** Jetra svinje, masivna nekroza hepatocita u centrolobularnom i srednjezonalnom području gde je istovremeno prisutan mononuklearni ćelijski infiltrat, HE

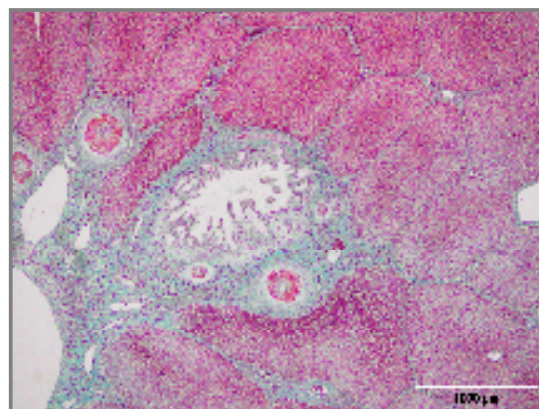


**Slika 13.** Jetra svinje, hepatociti podlegli apoptozi u vidu acidofilnih apoptotskih tela, HE

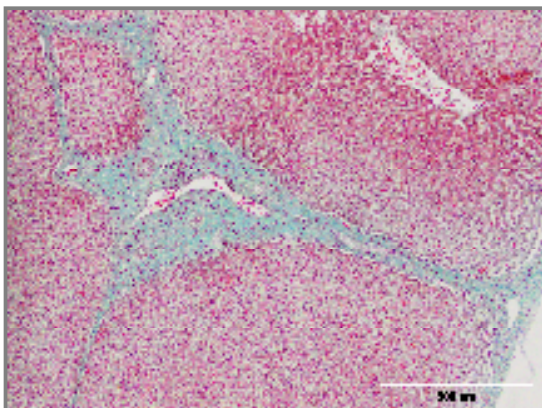
Izražena lobularnost jetre svinja naročito se dobro ističe u uzorcima bojenim *Masson* trihrom metodom (MTH) (slika 14). U nekim uzorcima jetre inficiranih svinja bojenim *Masson* trihrom metodom (MTH) prisutna je povećana količina vezivnog tkiva u portnim prostorima jetre. Uz akumulaciju veće količine vezivnog tkiva ovde se vide dilatirani žučni kanalići sa proliferisanim epitelom okruženi novostvorenim kanalićima manjeg dijametra. Krvni sudovi ovih portnih prostora imaju zadebljalu tuniku mediju u kojoj se jasno vide umnožene glatko-mišićne ćelije (slika 15). Izuzetno retko, uočena je povećana količina vezivnog tkiva ne samo u portnim prostorima jetre već i u susjednim lobulusima u vidu širih ili užih traka (slika 16). Oba opisana nalaza govore u prilog hroničnom oštećenju jetre i uklapaju se u sliku fibroze.



**Slika 14.** Jetra svinje, lobulusi međusobno odvojeni uskim trakama vezivnog tkiva, MTH



**Slika 15.** Jetra svinje, portna fibroza, vezivno tkivo u portnim prostorima (zeleno) i glatko-mišićne ćelije u zidovima krvnih sudova (crveno), MTH



**Slika 16.** Jetra svinje, portna fibroza, trake vezivnog tkiva (zeleno) i glatko-mišićne ćelije u zidu krvnih sudova i oko žučnih kanalića (crveno), MTH

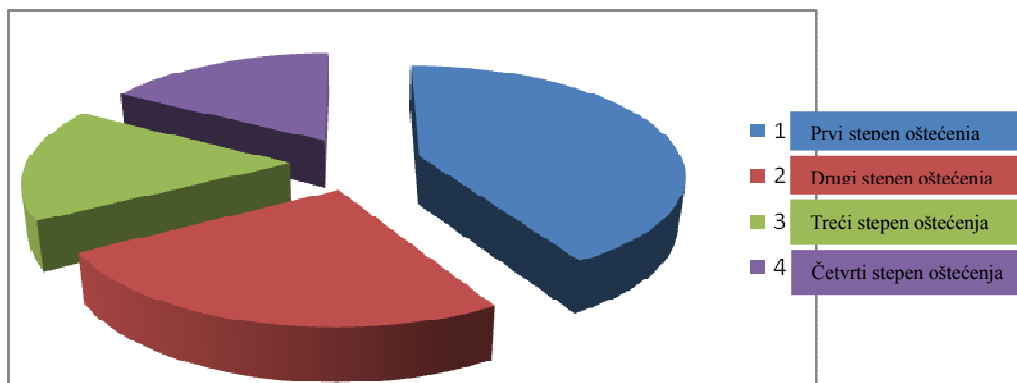
## 5.5. REZULTATI SEMIKVANTITATIVNE ANALIZE

Semikvantitativna analiza (tabela 8, grafikon 2) je pokazala da je u ispitanim uzorcima jetre inficiranih svinja najčešće prisutan prvi stepen oštećenja koji se karakteriše nalazom najviše dva fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata. Redje je viđen drugi stepen oštećenja jetre uz prisustvo do pet fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata. Uzorci sa šest do deset fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata su nađeni samo u dva uzorka. Takođe je, u samo dva uzorka konstatovano više od deset fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata, odnosno četvrti stepen oštećenja parenhima jetre.

**Tabela 8.** Evaluacija histopatoloških promena prema Halbur i sar., 2001

| Stepen oštećenja | Opis promene   | Učestalost promene (%) |
|------------------|--|------------------------|
| 0                | Bez inflamatornih promena  | 0 (0)                  |
| 1.               | Jedan do dva fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre  | 5 (41,67)              |
| 2.               | Dva do pet fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre    | 3 (25)                 |
| 3.               | Šest do deset fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre | 2 (16,67)              |
| 4.               | Više od 10 fokusa limfocitno-plazmaćelijskog infiltrata u 10 posmatranih lobulusa jetre    | 2 (16,67)              |





**Grafikon 2.** Evaluacija histopatoloških promena prema Halbur i sar., 2001

## 5.6. IMUNOHISTOHEMIJSKI NALAZ

### 5.6.1. CD3

U uzorcima jetre zdravih svinja na CD3 antitelo pozitivno reaguju pojedinačni limfociti u sinusoidnim prostorima jetre, centralnoj veni, portnim prostorima i krvnim sudovima portnih prostora (slika 17).

Imunohistohemijskim ispitivanjem uzoraka jetre svinja inficiranih virusom hepatitisa E ustanovljeno je da dominantnu ćelijsku populaciju u mononuklearnom ćelijskom infiltratu čine CD3+ T ćelije (Slika 18, 19, 20, 21). CD3+ T limfociti su ustanovljeni kako u portnim prostorima jetre, isto tako među mononuklearnim ćelijama koje infiltriraju lobulose. Imunopozitivna reakcija je naročito dobro uočljiva u uskom sloju citoplazme uz samu plazminu membranu ćelija ili u području plazmine membrane.

### 5.6.2. CD79

U uzorcima jetre kontrolne grupe svinja na CD79 antitelo pozitivno reaguju pojedinačni limfociti u sinusoidnim prostorima jetre (slika 22).

U ispitanim uzorcima jetre svinja inficiranih virusom hepatitisa E ustanovljen je mali broj ćelija pozitivnih na CD79 ćelijski antigen (slika 23 i 24). Ove ćelije pripadaju grupi B limfocita i bile su pojedinačno zastupljene kako u mononuklearnom infiltratu smeštenom u parenhimu, tako i u mononuklearnom infiltratu lokalizovanom u portnim prostorima jetre.

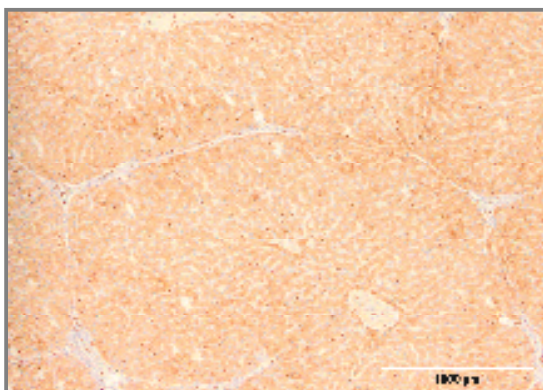
### **5.6.3. Tehnika dvostrukog imunohistohemijskog bojenja**

U uzorcima jetre inficiranih svinja na kojima je primenjena tehnika dvostrukog imunohistohemijskog bojenja je dokazano da je mononuklearni ćelijski infiltrat sastavljen od CD3 i CD79 pozitivnih limfocita. Nadalje, uočeno je dominantno prisustvo CD3 pozitivnih ćelija, dok su CD79 pozitivne ćelije bile pojedinačno rasute u infiltratu (slika 25).

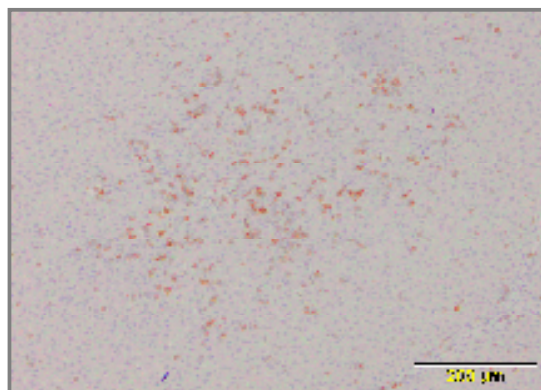
### **5.6.4. TGF- $\beta_1$**

U uzorcima jetre kontrolne grupe svinja blaga citoplazmatska ekspresija TGF- $\beta_1$  dokazana je na pojedinačnim ćelijama u portnom prostoru jetre. U jetrinim režnjicima nije bilo reakcije na ovo antitelo (slika 26).

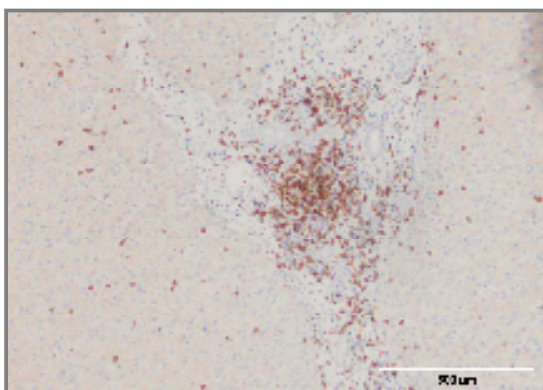
Imunohistohemijskim ispitivanjem uzoraka jetre inficiranih svinja na TGF- $\beta_1$  pozitivno reaguju ćelije mononuklearnog infiltrata i polimorfonuklearne ćelije smeštene u parenhimu jetre (slika 27). Intenzivnu pozitivnu reakciju na TGF- $\beta_1$  pokazivale su ćelije zapaljenskog infiltrata u uzorcima jetre sa apoptozom hepatocita.



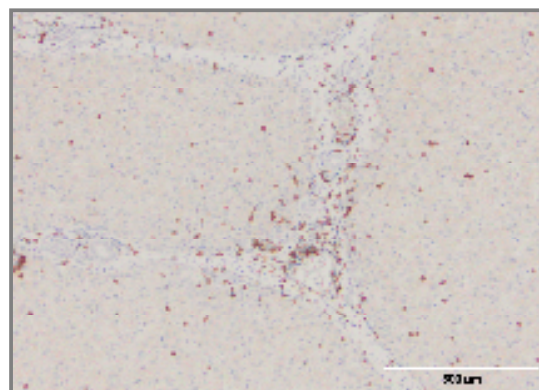
**Slika 17.** Normalna jetra svinje, ekspresija CD3 pozitivnih ćelija u sinusoidnim prostorima jetre, centralnoj veni, portnim prostorima i krvnim sudovima portnih prostora, CD3, LSAB2



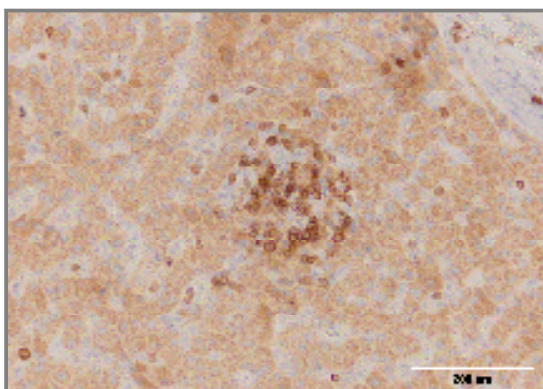
**Slika 18.** Jetra svinje, ekspresija CD3 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu parenhima, CD3, LSAB2



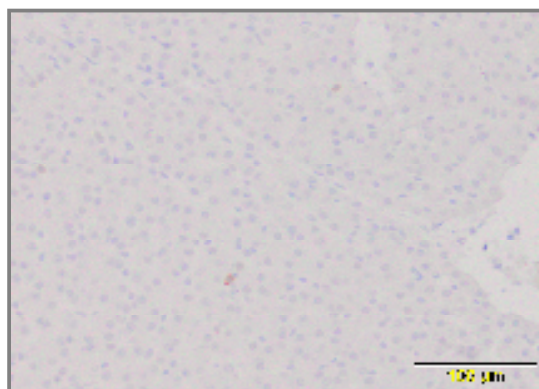
**Slika 19.** Jetra svinje, jaka ekspresija CD3 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu portnog prostora jetre, CD3, LSAB2



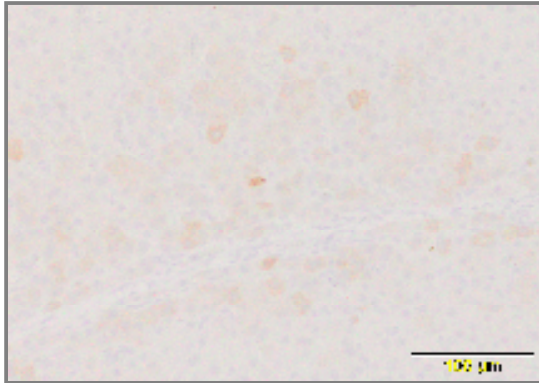
**Slika 20.** Jetra svinje, ekspresija CD3 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu parenhima i portnog prostora jetre istovremeno, CD3, LSAB2



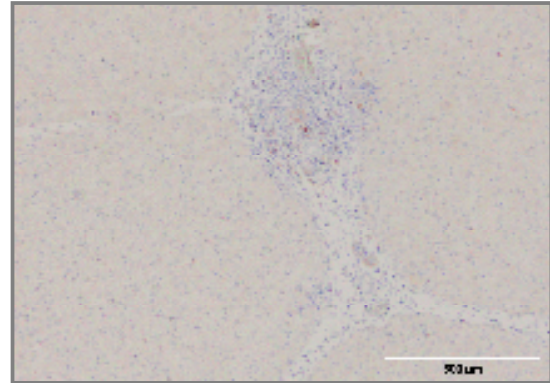
**Slika 21.** Jetra svinje, umerena ekspresija CD3 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu parenhima jetre, CD3, LSAB2



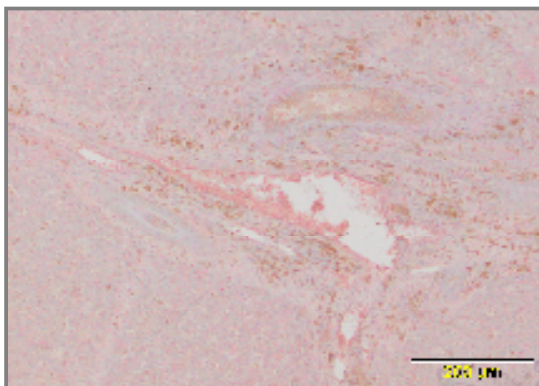
**Slika 22.** Normalna jetra svinje, ekspresija CD79 pozitivnih ćelija u sinusoidnim prostorima jetre, CD79, LSAB2



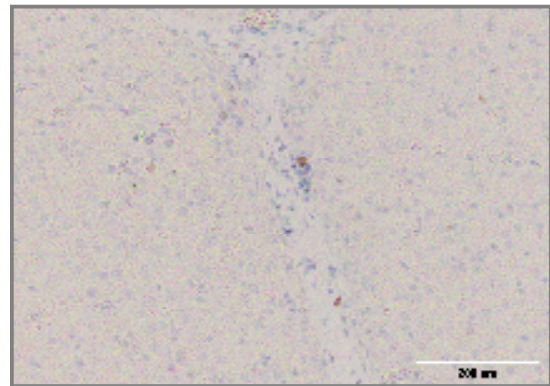
**Slika 23.** Jetra svinje, umerena ekspresija CD79 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu parenhima, CD79, LSAB2



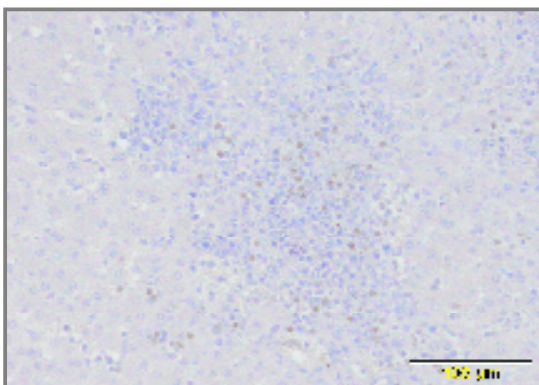
**Slika 24.** Jetra svinje, umerena ekspresija CD79 pozitivnih ćelija u mononuklearnom ćelijskom infiltratu portnog prostora, CD79, LSAB2



**Slika 25.** Jetra svinje, ćelije koje ekspiriraju CD3 (smeđe) se nalaze u blizini ćelija koje ekspiriraju CD79 (crvene) u portnom prostoru, Doublestain system



**Slika 26.** Normalna jetra svinje, ekspresija TGF-β<sub>1</sub> pozitivnih ćelija u portnom prostoru, TGF-β<sub>1</sub>, LSAB2



**Slika 27.** Jetra svinje, ćelije koje ekspiriraju TGF-β<sub>1</sub> se nalaze u gustom zapaljenskom infiltratu jetrinog parenhima, TGF-β<sub>1</sub>, LSAB2

## 5.7. REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE

Kako je u tabeli 9 prikazano broj i CD3 i CD79 pozitivnih ćelija je veći u uzorcima jetre inficiranih u odnosu na kontrolnu grupu svinja.

**Tabela 9.** Broj ćelija izražen po jedinici površine ( $X/ \text{mm}^2$ ). Sve vrednosti su date kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija

| Ćelijski marker | Inficirana grupa<br>$\bar{X} \pm \text{SD} (X_{\min} - X_{\max})$<br>(n=12) | Kontrolna grupa<br>$\bar{X} \pm \text{SD} (X_{\min} - X_{\max})$ (n=10) | p vrednosti |
|-----------------|---|---|-------------|
| CD 3            | 234,80 $\pm$ 79,98 (166-350)  | 183 $\pm$ 8,49 (177-189)  | p < 0,05    |
| CD 79           | 26,00 $\pm$ 17,71 (10-49)   | 3,00 $\pm$ 1,41 (2-4)   | p < 0,01    |

**Legenda:** p < 0,01 – utvrđena statistička značajnost na nivou od 99%  
p < 0,05 – utvrđena statistička značajnost na nivou od 95%

Broj CD3+ ćelija je statistički veći (p<0,05) u uzorcima jetre inficiranih svinja. Statistički značajno veći broj (p<0,01) CD79+ ćelija je ustanovljen kod inficiranih svinja.

## 5.8. MOLEKULARNA DETEKCIJA SVINJSKOG CIRKOVIRUSA TIP 2 (PCV2)

PCR analizom 12 uzoraka jetre poreklom od svinja kod kojih je u uzorku rektalnog brisa dokazana HEV RNK, nije ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline cirkovirusa 2.

## 5.9. BAKTERIOLOŠKA ANALIZA

Ni u jednom uzorku jetre svinja kod kojih je u uzorku rektalnog brisa dokazana HEV RNK nije ustanovljeno prisustvo aerobnih i anaerobnih bakterija.

## 5.10. ODNOS IZMEĐU STEPENA HISTOLOŠKIH LEZIJA I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI INFICIRANIH SVINJA

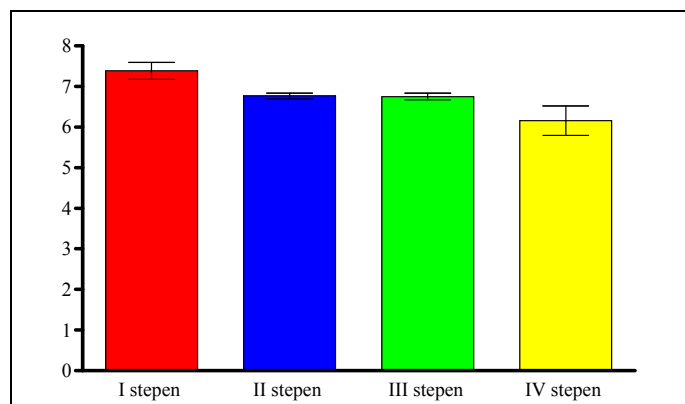
U tabeli 10 su dati deskriptivni statistički parametri ukupnih proteina kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 10.** Deskriptivni statistički parametri za ukupne proteine kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ (g/dl)  | SD   | SE     | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | CV (%) |
|-------------------|-------------------|------|--------|------------|------------|--------|
| <b>I stepen</b>   | 7,37 <sup>x</sup> | 0,37 | 0,2131 | 7,05       | 7,78       | 5,00   |
| <b>II stepen</b>  | 6,77              | 0,14 | 0,0705 | 6,58       | 6,91       | 2,08   |
| <b>III stepen</b> | 6,75              | 0,14 | 0,0833 | 6,63       | 6,91       | 2,14   |
| <b>IV stepen</b>  | 6,15 <sup>x</sup> | 0,52 | 0,3650 | 5,79       | 6,52       | 8,39   |

*Legenda:* Ista slova označavaju signifikantnu razliku. x,y,z  $p < 0,01$ ; a, b, c,  $p < 0,05$ .

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 10) ustanovljeno je da je prosečna koncentracija ukupnih proteina bila najveća kod svinja sa prvim stepenom oštećenja ( $7,37 \pm 0,37$  g/dl), a najniža kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre ( $6,15 \pm 0,52$  g/dl), što je prikazano i na grafikonu 3. Najveću standardnu devijaciju za ukupne proteine je imala grupa inficiranih svinja koja je imala četvrti stepen oštećenja (0,52) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (8,39%). Najmanju standardnu devijaciju (0,14) i najmanji koeficijent varijacije (2,08 i 2,14%) imala je grupa svinja koje su imale drugi i treći stepen oštećenja jetre.



**Grafikon 3.** Prosečne vrednosti ukupnih proteina kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (7,76) ukazuje na postojanje značajnih razlika ( $p < 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno.

Nakon toga pojedinačnim studentovim Tukey testom ustanovljene su signifikantne razlike između grupa ponaosob. Ovim testom ustanovljena je vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti ukupnih proteina kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom

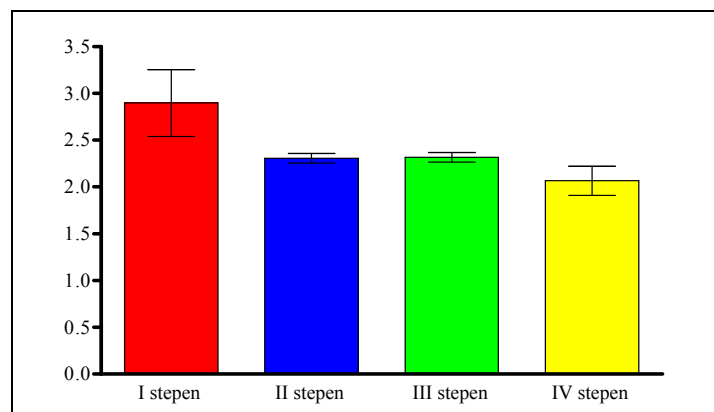
oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Na osnovu ovih rezultata možemo sa 99,00% verovatnoće da tvrdimo da će se, pod nepromenjenim uslovima ispitivanja, ovakvi rezultati ponoviti i ubuduće. Između ostalih testiranih grupa nisu ustanovljene značajne razlike ( $p>0,05$ ).

U tabeli 11. su dati deskriptivni statistički parametri albumina kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 11) ustanovljeno je da je prosečna koncentracija albumina bila najveća kod svinja sa prvim stepenom oštećenja ( $2,90\pm 0,62$  g/dl), a najniža kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre ( $2,07\pm 0,22$  g/dl), što je prikazano i na grafikonu 4. Najveću standardnu devijaciju za albumine je imala grupa inficiranih svinja koja je imala prvi stepen oštećenja (0,62) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (21,37%). Najmanju standardnu devijaciju (0,09) i najmanji koeficijent varijacije (3,91%) imala je grupa svinja sa drugim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 11.** Deskriptivni statistički parametri za albumine kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ (g/dl) | SD   | SE     | $X_{min}$ | $X_{max}$ | CV (%) |
|-------------------|------------------|------|--------|-----------|-----------|--------|
| <b>I stepen</b>   | 2,90             | 0,62 | 0,3574 | 2,50      | 3,61      | 21,37  |
| <b>II stepen</b>  | 2,31             | 0,09 | 0,0521 | 2,22      | 2,40      | 3,91   |
| <b>III stepen</b> | 2,32             | 0,10 | 0,0517 | 2,17      | 2,41      | 4,47   |
| <b>IV stepen</b>  | 2,07             | 0,22 | 0,1550 | 1,91      | 2,22      | 10,62  |



**Grafikon 4.** Prosečne vrednosti albumina kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (3,14) ukazuje da ne postoje statistički signifikantne razlike ( $p > 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno.

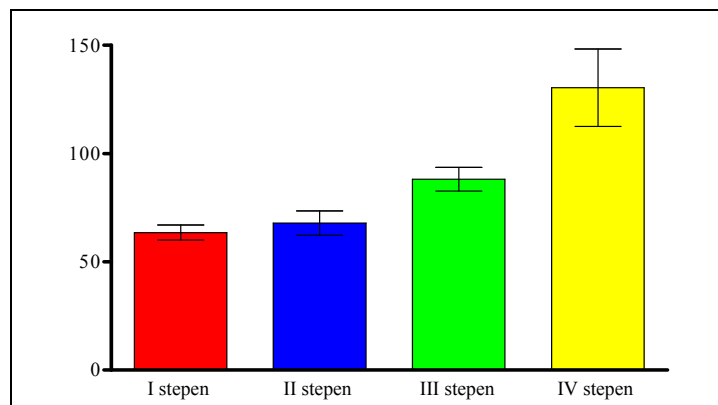
U tabeli 12 su dati deskriptivni statistički parametri za AST kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 12.** Deskriptivni statistički parametri za AST kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ (IU/l)     | SD    | SE      | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | CV (%) |
|-------------------|----------------------|-------|---------|------------|------------|--------|
| <b>I stepen</b>   | 63,46 <sup>x</sup>   | 6,09  | 3,5130  | 56,48      | 67,65      | 9,59   |
| <b>II stepen</b>  | 67,83 <sup>y</sup>   | 9,67  | 5,5830  | 60,26      | 78,72      | 14,26  |
| <b>III stepen</b> | 88,14                | 9,49  | 5,4770  | 80,23      | 98,66      | 10,76  |
| <b>IV stepen</b>  | 130,40 <sup>xy</sup> | 30,92 | 17,8500 | 111,20     | 166,10     | 23,72  |

*Legenda: Ista slova označavaju signifikantnu razliku. x,y,z  $p < 0,01$ ; a, b, c,  $p < 0,05$ .*

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 12) ustanovljeno je da je prosečna vrednost AST bila najveća kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja ( $130,40 \pm 30,92$  IU/l), a najniža kod svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre ( $63,46 \pm 6,09$  IU/l), što je prikazano i na grafikonu 5. Najveću standardnu devijaciju za vrednost AST je imala grupa inficiranih svinja koja je imala četvrti stepen oštećenja (30,92) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (23,72%). Najmanju standardnu devijaciju (6,09) i najmanji koeficijent varijacije (9,59%) imala je grupa svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre.



**Grafikon 5.** Prosečne vrednosti za AST kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre



Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (9,53) ukazuje na postojanje značajnih razlika ( $p < 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno. Nakon toga pojedinačnim studentovim Tukey testom ustanovljene su signifikantne razlike između grupa ponaosob. Ovim testom ustanovljena je vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za AST kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za AST kod grupe inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Na osnovu ovih rezultata možemo sa 99,00% verovatnoće da tvrdimo da će se, pod nepromenjenim uslovima ispitivanja, ovakvi rezultati ponoviti i ubuduće. Između ostalih testiranih grupa nisu ustanovljene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

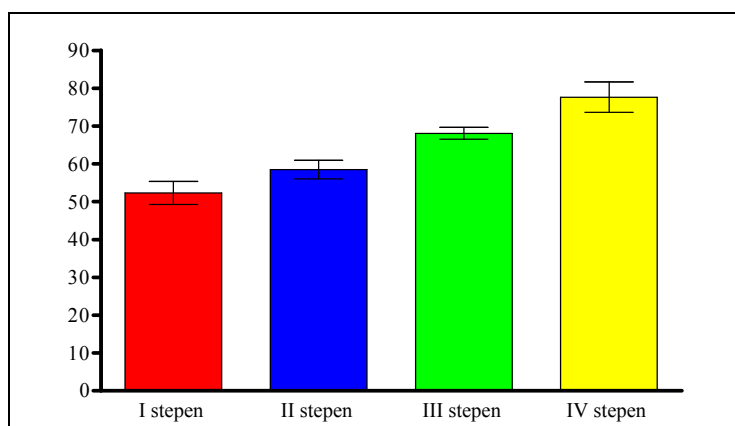
U tabeli 13 su dati deskriptivni statistički parametri za ALT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 13.** Deskriptivni statistički parametri za ALT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ (IU/l)    | SD   | SE     | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | CV (%) |
|-------------------|---------------------|------|--------|------------|------------|--------|
| <b>I stepen</b>   | 52,31 <sup>x</sup>  | 4,29 | 3,0300 | 49,28      | 55,34      | 8,19   |
| <b>II stepen</b>  | 58,45 <sup>y</sup>  | 4,86 | 2,4300 | 51,51      | 62,77      | 8,32   |
| <b>III stepen</b> | 68,01               | 2,21 | 1,5600 | 66,45      | 69,57      | 3,24   |
| <b>IV stepen</b>  | 77,64 <sup>xy</sup> | 8,00 | 4,0000 | 71,23      | 89,29      | 10,30  |

*Legenda:* Ista slova označavaju signifikantnu razliku.  $x, y, z$   $p < 0,01$ ;  $a, b, c$ ,  $p < 0,05$ .

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 13) ustanovljeno je da je prosečna vrednost ALT bila najveća kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja ( $77,64 \pm 8,00$  IU/l), a najniža kod svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre ( $52,31 \pm 4,29$  IU/l), što je prikazano i na grafikonu 6. Najveću standardnu devijaciju za vrednost ALT je imala grupa inficiranih svinja koja je imala četvrti stepen oštećenja (8,00) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (10,30%). Najmanju standardnu devijaciju (2,21) i najmanji koeficijent varijacije (3,24%) imala je grupa svinja sa trećim stepenom oštećenja jetre.



**Grafikon 6.** Prosečne vrednosti za ALT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

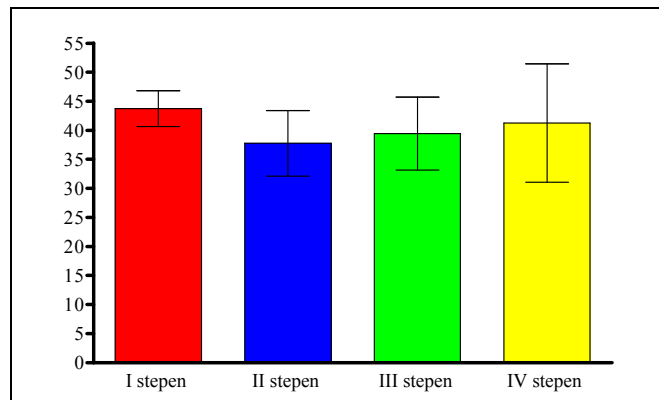
Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (10,71) ukazuje na postojanje značajnih razlika ( $p < 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno. Nakon toga pojedinačnim studentovim Tukey testom ustanovljene su signifikantne razlike između grupa ponaosob. Ovim testom ustanovljena je vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ALT kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za ALT kod grupe inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Na osnovu ovih rezultata možemo sa 99,00% verovatnoće da tvrdimo da će se, pod nepromenjenim uslovima ispitivanja, ovakvi rezultati ponoviti i ubuduće. Između ostalih testiranih grupa nisu ustanovljene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

U tabeli 14. su dati deskriptivni statistički parametri za GGT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 14.** Deskriptivni statistički parametri za GGT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ (IU/l) | SD    | SE      | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | CV (%) |
|-------------------|------------------|-------|---------|------------|------------|--------|
| <b>I stepen</b>   | 43,73            | 5,35  | 3,0900  | 37,86      | 48,34      | 12,24  |
| <b>II stepen</b>  | 37,75            | 9,76  | 5,6360  | 31,14      | 48,96      | 25,86  |
| <b>III stepen</b> | 39,44            | 10,85 | 6,2640  | 30,98      | 51,67      | 27,51  |
| <b>IV stepen</b>  | 41,24            | 17,66 | 10,1900 | 22,51      | 57,58      | 42,81  |

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 14) ustanovljeno je da je prosečna vrednost GGT bila najveća kod svinja sa prvim stepenom oštećenja ( $43,73 \pm 5,35$  IU/l), a najniža kod svinja sa drugim stepenom oštećenja jetre ( $37,75 \pm 9,76$  IU/l), što je prikazano i na grafikonu 7. Najveću standardnu devijaciju za vrednost GGT je imala grupa inficiranih svinja koja je imala četvrti stepen oštećenja (17,66) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (42,81%). Najmanju standardnu devijaciju (5,35) i najmanji koeficijent varijacije (12,24%) imala je grupa svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre.



**Grafikon 7.** Prosečne vrednosti za GGT kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (0,14) ukazuje da ne postoje statistički signifikantne razlike ( $p > 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno.

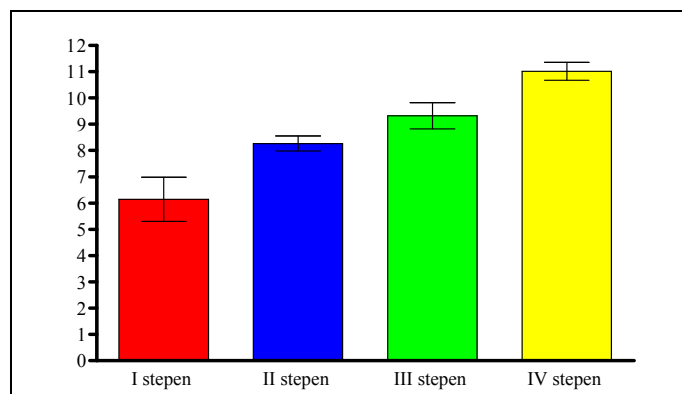
U tabeli 15 su dati deskriptivni statistički parametri za ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre.

**Tabela 15.** Deskriptivni statistički parametri za ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

|                   | $\bar{X}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) | SD   | SE     | $X_{\min}$ | $X_{\max}$ | CV    |
|-------------------|---------------------------------|------|--------|------------|------------|-------|
| <b>I stepen</b>   | 6,15 <sup>xy</sup>              | 1,18 | 0,8350 | 5,31       | 6,98       | 19,22 |
| <b>II stepen</b>  | 8,26 <sup>a</sup>               | 0,49 | 0,2835 | 7,86       | 8,81       | 5,94  |
| <b>III stepen</b> | 9,33 <sup>x</sup>               | 1,00 | 0,50   | 8,67       | 10,81      | 10,70 |
| <b>IV stepen</b>  | 11,01 <sup>ya</sup>             | 0,59 | 0,34   | 10,34      | 11,47      | 5,41  |

**Legenda:** Ista slova označavaju signifikantnu razliku. x,y,z  $p < 0,01$ ; a, b, c,  $p < 0,05$ .

Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara (tabela 15) ustanovljeno je da je prosečna koncentracija ukupnog bilirubina bila najveća kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja ( $11,01 \pm 0,59 \mu\text{mol/l}$ ), a najniža kod svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre ( $6,15 \pm 1,18 \mu\text{mol/l}$ ), što je prikazano i na grafikonu 8. Najveću standardnu devijaciju za vrednost ukupnog bilirubina je imala grupa inficiranih svinja koja je imala prvi stepen oštećenja (1,18) što nam ukazuje da su u ovoj grupi bila i najveća odstupanja od prosečne vrednosti, kao i najveći koeficijent varijacije (19,22%). Najmanju standardnu devijaciju (0,49) imala je grupa svinja sa drugim stepenom oštećenja jetre, a najmanji koeficijent varijacije (5,41%) imala je grupa svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre.



**Grafikon 8.** Prosečne vrednosti za ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa različitim stepenom oštećenja jetre

Signifikantnost razlika aritmetičkih sredina između ispitivanih grupa ukupno ustanovljena je pomoću analize varijanse (ANOVA). Dobijena F vrednost (14,59) ukazuje na postojanje značajnih razlika ( $p < 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno. Nakon toga pojedinačnim studentovim Tukey testom ustanovljene su signifikantne razlike između grupa ponaosob. Ovim testom ustanovljena je vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa trećim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Na osnovu ovih rezultata možemo sa 99,00% verovatnoće da tvrdimo da će se, pod nepromenjenim uslovima ispitivanja, ovakvi rezultati ponoviti i

ubuduće. Pored toga, ovim testom je ustanovljena značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod grupe inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Između ostalih testiranih grupa nisu ustanovljene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

## 6. Diskusija

Infekcija virusom hepatitisa E je ustanovljena u većini zemalja u kojima postoji intenzivna proizvodnja svinja. Osim kod svinja, infekcija ovim virusom je sve češće prisutna i kod ljudi, kako u zemaljama u razvoju, tako i u razvijenim zemljama. S obzirom da su sojevi virusa izolovani kod svinja i kod ljudi genetski međusobno vrlo slični, i da je u oba slučaja u pitanju oralna infekcija, postoji realna opasnost da su inficirane svinje izvor infekcije za ljude. Poznato je da su veterinari, zatim ljudi zaposleni na klanicama i radnici na farmama svinja izloženi povećanom riziku od infekcije ovim virusom, što ovo oboljenje svrstava u grupu profesionalnih oboljenja. Svakako, bi u budućnosti trebalo očekivati da se u zakonsku legislativu naše zemlje uvrsti i ovo oboljenje, kako bi se mogao vršiti odgovarajući monitoring zaklanih svinja na klanicama u svrhu dobijanja higijenski bezbednih namirnica životinjskog porekla. Prisustvo HEV RNK u urinu svinja i svinjskom mesu (Bouwknegt i sar., 2009) ukazuje na mogućnost kontaminacije sredine ne samo fecesom već i izlučenim urinom, a to svakako doprinosi lakšem širenju virusa. Kontaminacija mesa je posledica viremije, odnosno prisustva virusa u krvnim sudovima miškulature. Ova činjenica dodatno ukazuje na mogućnost infekcije ljudi svinjskim mesom koje nije dovoljno termički obrađeno (Bouwknegt i sar., 2009). S obzirom da je u pitanju subklinička infekcija svinja (Di Bartolo i sar., 2008), tim pre je povećan rizik da se meso i proizvodi od mesa svinja inficiranih virusom hepatitisa E nađu na tržištu i postanu realna opasnost po ljudsko zdravlje. Navedene činjenice su i bile razlog da se pristupi ovim istraživanjima.

RT-PCR analizom je potvrđeno da je 12 svinja ispitanih u ovom istraživanju bilo pozitivno na prisustvo genetskog materijala virusa u uzorku rektalnog brisa, što nesumnjivo potvrđuje da su ispitane svinje inficirane ovim virusom. Istovremeno prisustvo virusne RNK u jetri i uzorku rektalnog brisa ustanovljeno je kod pet svinja. Ovakav nalaz se može objasniti činjenicom da se virus izlučuje iz organizma svinje, a izlučivanje virusa prema podacima iz literature, može trajati od 3 do 7 nedelja (Halbur i sar., 2001; Kasorndorkbua i sar., 2004). Postoji i druga mogućnost, da je virus u uzorku rektalnog brisa detektovan u fazi primarne replikacije u digestivnom sistemu, pa ga iz tog razloga još nema u jetri. Ispitivanja prevalencije na četiri farme, sa ukupno ispitanih 233 svinje, su pokazala prevalenciju od 5,15%, što je u svakom slučaju niži procenat u odnosu na druge zemlje (Seminati i sar., 2008; Forgach i sar., 2009). Prevalencija ekskrecije virusa fecesom na dve pozitivne farme u ovom ispitivanju je bila 7,5% i 7,96%, što je značajno niže u odnosu na ispitivanja drugih autora

(Di Bartolo i sar., 2008). Međutim, ovakav nalaz se može objasniti činjenicom da se na ove dve farme primenjuju principi dobre proizvođačke i higijenske prakse kao i činjenicom da se na tim farmama prasadi nakon odbijanja ne mešaju sa prasadima iz drugih legala u fazi odgoja. Ustanovljena visoka prevalencija ekskrecije virusa kod prasadi u odgoju (14,75%) ukazuje na činjenicu da se vrhunac ekskrecije virusa javlja upravo kod svinja u porastu odnosno u uzrastu od 10 do 12 nedelja, što je u skladu sa nalazom i drugih autora (Meng i sar., 1997). Razlog ovome je verovatno postojanje prirodnog pasivnog imuniteta kod prasadi u prvim nedeljama života koji stižu putem kolostruma, i koji ih štiti od HEV infekcije (Martelli i sar., 2008; Seminati i sar., 2008). Ova činjenica je verovatno razlog što u našem ispitivanju ni kod jednog praseta na sisi nije ustanovljeno izlučivanje virusa. Pored toga, ni kod jedne ispitane krmače nije ustanovljeno izlučivanje virusa, o čemu u literaturi postoje neslaganja (Seminati i sar., 2008; Forgach i sar., 2009).

Mada je hepatitis E kod svinja definisan kao subkliničko oboljenje, ova istraživanja su pokazala da postoje promene u koncentracijama pojedinih biohemijskih parametara u krvnom serumu inficiranih svinja. Tako je ustanovljena statistički veoma značajna razlika ( $p < 0,01$ ) za ALT između inficiranih svinja i svinja iz kontrolne grupe, dok je za vrednosti GGT i ukupnog bilirubina razlika između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Pored toga, ustanovljena je vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ALT kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za ALT kod grupe inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Mada je za vrednost GGT razlika između grupe inficiranih svinja i kontrolne grupe bila statistički značajna nije postojala statistički značajna razlika ( $p > 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno za vrednost ovog enzima. Poznato je da enzimi transaminaze (ALT i AST) katalizuju prenošenje amino grupe u toku sinteze proteina u jetri. U toku oštećenja hepatocita ovi enzimi dospevaju u krvnu plazmu i tako predstavljaju korisne markere za otkrivanje poremećaja funkcije jetre. Visoke vrednosti za ALT ustanovljene su kod distrofije jetre i drugih hroničnih hepatopatija, primarnih tumora jetre i metastaza (Žurić i Stanković, 1991). Dobijene više vrednosti za bilirubin u ispitivanoj grupi ukazuju na moguću poremećaj ekskrecije bilirubina iz jetre ili ovaj organ nije u stanju da u dovoljnoj meri biotransformiše bilirubin iz krvi. Izračunavanjem deskriptivnih statističkih parametara ustanovljeno je da je prosečna koncentracija ukupnog bilirubina bila najveća kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja ( $11,01 \pm 0,59 \mu\text{mol/l}$ ), a najniža kod svinja sa prvim stepenom oštećenja jetre ( $6,15 \pm 1,18 \mu\text{mol/l}$ ). Između grupa ponaosob ustanovljena je vrlo značajna

razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa trećim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Prosečne vrednosti ukupnih proteina, albumina i AST u krvnom serumu svinja inficirane i kontrolne grupe u ovom ispitivanju bile su u opsegu fizioloških vrednosti. Mada su prosečne vrednosti ukupnih proteina i AST u grupi inficiranih svinja bile u opsegu fizioloških vrednosti, ipak je ustanovljena vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti ukupnih proteina i AST kod grupe inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za AST kod grupe inficiranih svinja sa drugim stepenom oštećenja i grupe svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre. Prosečna koncentracija albumina bila je najveća kod svinja sa prvim stepenom oštećenja ( $2,90 \pm 0,62$  g/dl), a najniža kod svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre ( $2,07 \pm 0,22$  g/dl), iako nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,01$ ) između ispitivanih stepena oštećenja jetre ukupno.

Eksperimentalna infekcija virusom hepatitisa E rezus majmuna (*Macaca mulatta*) potvrdila je vezu između vrednosti alanin transaminaze i histopatoloških promena u jetri što dodatno ukazuje na reakciju hepatocita na ovaj virus (Ji i sar., 2008). U eksperimentalnoj infekciji Balb/c SPF miševa virusom svinjskog hepatitisa E, u serumu je ustanovljeno povećanje vrednosti aspartat-aminotransferaze (AST) i to za 2,6 puta i alkalne fosfataze (AP) u grupama miševa inficiranih peroralno i intravenski, dok vrednosti za ukupni bilirubin i ALT nisu bile značajno povećane u odnosu na kontrolnu grupu (Huang i sar., 2009). Kod ljudi sa virusnim hepatitisom E povećanje aktivnosti jetrinih enzima se javlja u dva navrata tokom trajanja kliničkih simptoma sa jednim međuperiodom od oko nedelju dana u kome se njihova aktivnost normalizuje.

Svinje, kako je već naglašeno, kod kojih je RT-PCR metodom u uzorku rektalnog brisa utvrđena nukleinska kiselina virusa hepatitisa E, upućene su na redovno klanje. Makroskopskim pregledom jetre svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E je ustanovljeno blago povećanje što je u skladu sa opisima i drugih autora (Lee i sar., 2007). Pri proceni ovog nalaza treba biti jako obazriv s obzirom da povećanje jetre može nastati kao posledica povećane količine krvi i oštećenja jetre živim agensima (PCV2 i bakterije) što je isključeno PCR i bakteriološkom analizom. Izrazito dilatirana žučna kesa se ne može dovesti u vezu sa HEV infekcijom, s obzirom na činjenicu da se ovakva patološka promena najčešće javlja u slučaju opstrukcije žučnih puteva i u slučajevima kada životinje ne konzumiraju



hranu pa nema nadražaja za lučenje žuči. Uočeno povećanje portnih limfnih čvorova je posledica reaktivne hiperplazije (Bouwknegt i sar., 2009).

Analizom histoloških rezultata jetre poreklom od prirodno inficiranih svinja proističe da je kod svih (100%) mononuklearni ćelijski infiltrat bio prisutan u portnim prostorima, gde je blago do umereno zastupljen, dok je u 10 uzoraka (83,33%) uočen multifokalno u parenhimu jetre. Iz evaluacije histopatoloških promena prema Halbur i sar. (2001) proističe da je u ispitivanim uzorcima jetre sa prvim stepenom promene bilo 5 uzoraka jetre (41,67%), sa drugim stepenom oštećenja tri uzorka (25%), a sa trećim i četvrtim stepenom oštećenja po 2 uzorka jetre (16,67%).

Dominantnu ćelijsku populaciju u mononuklearnom ćelijskom infiltratu čine CD3 pozitivni limfociti. Populacija CD79 pozitivnih limfocita manje je zastupljena. Infiltrat ovakvog sastava u svih 12 uzoraka (100%) lokalizovan je u portnim prostorima jetre, a u 10 uzoraka (83,33%) i multifokalno u parenhimu jetre. Oštećenja hepatocita se kreću od blagog intracelularnog edema, preko vakuolarne degeneracije sve do hepatocelulolize. Sličan nalaz je ustanovljen kod ljudi obolelih od hepatitisa E (Zhao i sar., 2001). Kao posebno interesantan nalaz ističe se prisustvo apoptoze hepatocita kod inficiranih svinja. Apoptoza je ustanovljena i u eksperimentalnoj infekciji svinja svinjskim i humanim sojem virusa hepatitisa E (Halbur i sar., 2001). Poznato je da je apoptoza aktivni fiziološki proces u regulaciji populacije različitih ćelija, koja se karakteriše specifičnim biohemijskim i morfološkim promenama. Razni signali unutar ćelije ili signali izvan ćelije mogu aktivirati biohemijske reakcije u ćeliji koje će rezultirati apoptozom. U ovaj složeni proces su uključene cistein proteinaze, enzimi iz familije kaspaza koji igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze (Salvesen i Dixit, 1997; Roulston i sar., 1999). Mnogi virusi uključuju apoptozu ćelije domaćina kao deo njihovog životnog ciklusa. S druge strane, apoptoza ne indukuje inflamaciju, a samim tim smanjuje se i stepen oštećenja ćelija (Roulston i sar., 1999). S obzirom na ovu činjenicu može se samo pretpostaviti da se kod infekcije virusom hepatitisa E u jetri svinja sa apoptozom nalazi umereno zastupljen mononuklearni infiltrat. Masivne nekroze hepatocita u centrolobularnom i srednjezonalnom području bile su praćene gustim mononuklearnim infiltratom. Može se pretpostaviti da je broj limfocita u direktnoj povezanosti sa nastalim nekrotičnim procesom. Ovakav nalaz ukazuje da oštećenje hepatocita nastaje kao posledica imunoreaktivnosti odnosno, ukazuje na značaj prisutnih limfocita u patogenezi oštećenja (Meng i sar., 1997; Halbur i sar., 2001; Lee i sar., 2007; de Deus i sar., 2007; de Deus i sar., 2008; Lee i sar., 2008). Istraživanja hepatitisa E kod ljudi su pokazala da je oštećenje jetre imunski posredovano i da nastaje najverovatnije kao posledica delovanja

citotoksičnih T limfocita i ćelija prirodnih ubica (NK ćelije) (Prabhu i sar., 2011). Prisustvo većeg broja aktiviranih Kupferovih ćelija je posledica povećane sinteze proinflamatornih citokina. Povećanje broja Kupferovih ćelija je ustanovljeno i u jetri ljudi obolelih od hepatitisa E (Zhao i sar., 2001). Ustanovljena fibroza kod inficiranih svinja je posledica hroničnog oštećenja jetre. Vrlo je moguće da se radi o hroničnom hepatitisu E opisanom kod ljudi (Wendum i sar., 2005), mada ne treba isključiti i druge štetne agense.

Prisustvo TGF- $\beta_1$  pozitivnih ćelija smeštenih u mononuklearnom ćelijskom infiltratu parenhima jetre može se dovesti u vezu sa apoptozom hepatocita, koja je bila prisutna kod trećine ispitanih svinja, i smanjenim inflamatornim odgovorom. Ova hipoteza je bazirana na činjenici da TGF- $\beta_1$  indukuje apoptozu ćelija jetre i žučnih kanalića kod različitih bolesti jetre (Takiya i sar., 1995; Quaresma i sar., 2006). Nadalje, prisustvo TGF- $\beta_1$  pozitivnih ćelija je u vezi sa razvijenom fibrozom ustanovljenom kod inficiranih svinja, imajući u vidu da su receptori za TGF- $\beta_1$  smešteni na miofibroblastima.

## 7. Zaključci

Na osnovu sprovedenih istraživanja, dobijeni su sledeći zaključci:

1. Oštećenja i svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre; utvrđena je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i svinja sa trećim stepenom oštećenja jetre RT-PCR analizom 233 rektalna brisa od klinički zdravih svinja, različitih uzrasnih kategorija utvrđena je prevalencija virusa hepatitisa E od 5,15% od čega kod prasadi u odgoju 14,75% i kod svinja u tovu 3,26%.
2. Istovremeno prisustvo virusa hepatitisa E u rektalnom brisu i jetri utvrđeno je RT-PCR metodom kod pet svinja (41,67%).
3. Utvrđena je statistički veoma značajna razlika za vrednost ALT između inficiranih svinja i kontrolne grupe ( $p < 0,01$ ), dok je za vrednosti GGT i ukupnog bilirubina razlika bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Nije utvrđena statistička značajnost razlike za vrednosti ukupnih proteina, albumina i AST.
4. Histopatološkom analizom u uzorcima jetre inficiranih svinja utvrđen je mononuklearni ćelijski infiltrat u portnim prostorima jetre u 100% pregledanih uzoraka; multifokalni mononuklearni ćelijski infiltrat u parenhimu jetre u 83,33%; hidropsna degeneracija hepatocita u 83,33%; povećani broj Kupferovih ćelija u 58,33%; acidofilna apoptotska tela u 33,33% i masivna nekroza u 16,67% uzoraka.
5. Evaluacijom histopatoloških rezultata je utvrđen prvi stepen oštećenja jetre kod 41,67%, drugi stepen kod 25%, treći stepen kod 16,67% i četvrti stepen kod 16,67% svinja prirodno inficiranih virusom hepatitisa E.
6. Imunohistohemijskom analizom utvrđen je statistički veći broj CD3 pozitivnih ćelija ( $p < 0,05$ ) u uzorcima jetre inficiranih svinja, dok je broj CD79 pozitivnih ćelija bio statistički značajno veći ( $p < 0,01$ ).
7. Ćelije koje ekspimiraju TGF- $\beta_1$  su se nalazile u zapaljenskom infiltratu smeštenom u parenhimu jetre. Intenzivnu pozitivnu reakciju na TGF- $\beta_1$  pokazale su ćelije infiltrata u uzorcima jetre sa apoptozom hepatocita.

8. Ispitani odnos između stepena histoloških lezija i biohemijskih parametara krvi inficiranih svinja je pokazao statistički vrlo značajnu razliku ( $p < 0,01$ ) između prosečnih vrednosti za ukupne proteine, AST, ALT i ukupni bilirubin kod inficiranih svinja sa prvim stepenom oštećenja i svinja sa četvrtim stepenom oštećenja jetre, kao i između prosečnih vrednosti za AST i ALT kod inficiranih svinja sa drugim stepenom.

## 8. Literatura

1. Adjei A.A., Aviyase J.T., Tettey Y., Adu-Gyamfi C., Mingle J.A., Ayeh-Kumi P.F., Adiku T.K., Gyasi R.K., 2009, Hepatitis E virus infection among pig handlers in Accra, Ghana, East. Afr. Med. 86(8): 359-63.
2. Aggarwal R., Jameel S., 2008, Hepatitis E vaccine, Hepatol. Int., 2 (3): 308-15.
3. Aggarwal R., Kamili S., Spelbring J., Krawczynski K., 2001, Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques, J. Infect. Dis., 184 (11): 1380-5.
4. Aggarwal R., Krawczynski K., 2000, Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research, J. Gastroenterol. Hepatol., 15(1): 9-20.
5. Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., 2000, Immunostimulation, PCV2 and PMWS, Vet. Rec., 147(6): 170-1.
6. Asimoula S., Elena T., Alexopoulos C., Kyriakis S.C., Froesner G., 2009, First report of serological evidence of hepatitis E virus infection in swine in Northern Greece, Acta. Vet., 59(2-3): 205-11.
7. Bachlein C., Grummer B., 2010, Hepatitis E – a new zoonotic disease in Germany?, Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 123(5-6): 198-204.
8. Balayan M.S., 1997, Type E hepatitis: State of the art, Int. J. Infect. Dis., 2(2): 113-20.
9. Balayan M.S., Andjaparadize A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M., Savinov A.P., Poleschuk V.F., 1983, Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route, Intervirology, 20(1): 23-31.
10. 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(1): 58-9.
11. Becskei Z., Aleksić-Kovačević Sanja, Rusvai M., Balka G., Jakab C., Petrović T., Knežević Milijana: Distribution of porcine circovirus 2 cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by postweaning multisystemic wasting syndrome, Acta Vet. Hung. 58(4): 483-98.
12. Bertoletti A., Ferrari C., Fiaccadori F., Penna A., Margolskee R., Schlicht H.J., Fowler P., Guilhot S., Chisari F.V., 1991, HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. 88(23): 10445-9.
13. Bertoletti A., Maini M.K., 2000, Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection?, Cur. Opin. Immunol., 12(4): 403-8.
14. Blazek K., Schramlova J., Hulinska D., 1985, Pathology of the migration phase of *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766) larvae, Folia Parasitol., 32(2): 127-37.
15. Bouwknegt M., Rutjes S.A., Reusken C BEM., Stockhofe-Zurwieden N., Frankena K., de Jong M. CM., de Roda Husman M., van der Poel W. Hm., 2009, The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation, BMC Vet. Res., 2009, 5: 7.

16. Bruzinskaite R., Sarkunas M., Torgerson P.R., Mathis A., Deplazes P., 2009, Echinococcosis in pigs and intestinal infection with Echinococcus spp. in dogs in southwestern Lithuania, *Vet. Parasitol.*, 160(3-4): 237-41.
17. Caron M., Enouf V., Than S.C., Dellamonica L., Buisson Y., Nicand E, 2006, Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia, *J. Clin. Microbiol.*, 44(9): 3440-2.
18. Casas M., Pina S., de Deus N., Peralta B., Martin M., Segales J., 2008, Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels, *Proceedings of the 20th IPVS Congress, 22-26 June 2008., Durban, South Africa*, 6.
19. Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martin M., 2009, Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *Vet. Microbiol.*, 135(3-4): 248-52.
20. Chandler J.D., Riddell M.A., Li F., Love R.J., Anderson D.A., 1999, Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds, *Vet. Microbiol.*, 68(1-2): 95-105.
21. Clark E.G., 1997, Post-weaning wasting syndrome, *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, 28: 499-501..
22. Clayson E.T., Myint K.S., Snitbhan R., Vaughn D.W., Innis B.L., Chan L., Cheung P., Shrestha M.P., 1995, Viremia, fecal shedding and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E, *J. Infect. Dis.*, 172(4): 927-33.
23. Cvetnić Ž., Špičić S., Marjanović S., 2005, Bruceloza, leptospiroza i tuberkuloza svinja: klasične bolesti i nove spoznaje, *Praxis Veterinaria*, 53 (1-2): 47-58.
24. Dalton H.R., Bendall R.P., Keane F.E., Tedder R.S., Ijaz S., 2009, Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection, *N. Engl. Med.* 361(10): 1025-7.
25. 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, *Vet. Microbiol.*, 129(1-2): 163-70.
26. 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, *Vet. Microbiol.*, 119(2-4): 105-14.
27. Delbem A.C.B., de Freitas J.C., Bracarense A.P.F.R.L., Muller E.E., de Oliveira R.C., 2002, Leptospirosis in slaughtered sows: Serological and histopathological investigation, *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2): 174-77.
28. Delić D., Hepatitis E, In Delić D., Nikolić P., Božić M, *Virusni hepatitisi, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd*, 1998., 260-83.
29. Delić D., Nešić Z., Žerjav S., Pešić I., Popović N., Simonović J., 2003, Hepatitis E virus infection in Serbia: Epidemiology and clinical features, *Arch. gastroenterohepatol.*, 22 (3-4): 53-6.
30. Di Bartolo I, Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M., 2008, Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy, *Vet. Microbiol.*, 132(1-2): 47-55.

31. Di Martino B., Di Profio F., Martella V., Di Felice E., Di Francesco C.E., Ceci C., Marsilio F., 2010, Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy, *Arch. Virol.*, 155(1): 103-6.
32. dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, Saddi TM, Júnior NC, Guimarães Fde R, Júnior JG, Ximenes LL, Souto FJ, Pinto MA., 2009, Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil, *Vet. J.*, 182(3): 474-80.
33. Drobeniuc J., Favorov M.O., Shapiro C.N., Bell B.P., Mast E.E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B.H., Margolis H.S., 2001, Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine, *J. Infect. Dis.*, 184(12): 1594-7.
34. Ellis j., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G.M., 2004, Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field, *Vet. Microbiol.*, 98(2): 159-63
35. Emerson S.U., Anderson D., Arankalle A., Meng X.J., Purdy M., Schlauder G.G., Tsarev S.A., 2004, Hepatitis E virus. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., (Eds), *Virus Taxonomy: VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, Elsevier, Academic Press, London, United Kingdom, 851-5.
36. Emerson S.U., Purcell R.H., 2003, Hepatitis E virus, *Rev. Med. Virol.*, 13(3): 145-54
37. Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J., 2008, Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States, *Int. J. of Food Microbiol.*, 123(1-2): 32-7.
38. Fernandez-Barredo S., Galiana C., Garcia A., Gomez-Munoz M.T., Vega S., Rodriguez-Iglesias M.A., Perez-Garcia M.T., 2007, Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs, *The Can. J. Vet. Res.*, 71(3): 236-40.
39. Fernandez-Barredo S., Galiana C., Garcia A., Vega S., Gomez M.T., 2006, Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18(5): 462-5.
40. Forgach P., Nowotny N., Erdelyi 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(2-4): 106-16.
41. Friedman S. L., 1999, Cytokines and fibrogenesis, *Semin. Liver Dis.*, 19(2): 129-40.
42. 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, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78 (6): 1012-5.
43. Garcia A., Ayuso D., Benitez J.M., Garcia W.L., Martinez R., 2009, Clostridium novyi infection causing sow mortality in an Iberian pig herd raised in an outdoor rearing system in Spain, *J. Swine Health Prod.*, 17 (5): 264-68.
44. Gjestvang M., Liem B., Gamlem H., Gjerde B., 2004, Fatal infection with *Ascaris suum* in finishing pigs – a case report, *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, 27 June – July 1. 2004, Hamburg, Germany, 2: 610.

45. Ha S.K., Chae C., 2004, Immunohistochemistry for detection of swine hepatitis E virus in the liver, *J. Viral Hepat.*, 11 (3): 263-67.
46. Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., Emerson S.U., Toth M.E., Meng X.J., 2001, Comparative pathogenesis of infection pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human, *J. Clin. Microbiol.*, 39(3): 918-23.
47. Hibiva K., Kasumi Y., Suqawara I., Fujita J., 2008, Histopathological classification of systemic Mycobacterium avium complex infections in slaughtered domestic pigs, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31 (4): 347-66.
48. Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., Galli A., Bochaton-Piallat M.-L., Gabbiani G., 2007, The myofibroblast – one function, multiple origins, *Am. J. Pathol.*, 170(6): 1807-16.
49. Hosmillo M., Jeong Y.J., Kim H.J., Park J.G., Nayak M.K., Alfajaro M.M., Collantes T.M., Park S.J., Ikuta K., Yunoki M., Kang M.I., Park S.I., Cho K.O., 2010, Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows, *Arch. Virol.* 155(7): 1157-61.
50. Hu G.D., Ma X., 2010, Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region, *Bing. Du. Xue. Bao.* 26(1): 27-32.
51. Huang F., Zhang W., Gong G., Yuan C., Yan Y., Yang S., 2009, Experimental infection of Balb/c nude mice with hepatitis E virus, *BMC Infect. Dis.*, 9: 93.
52. Huang F.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J., 2002, Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States, *J. Clin. Microbiol.*, 40(4): 1326-32.
53. Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H., Shivaprasad H.L., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J., 2004, Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV, *J. Gen. Virol.*, 85 (Pt 6): 1609-18.
54. Ivetić V., Sudarić F., 1987, Biserasta tuberkuloza (perlsucht) kod divlje svinje, *Veterinaria*, 36 (1): 121-25.
55. Jameel S., 1999, Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus, *Expert Rev. Mol. Med.*, 1999: 1-16.
56. Ji Y., Zhu Y., Liang J., Wei X., Yang X., Wang L., Li L., Chang Y., Tang R., Zhuang H., 2008, Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), *J. Gastroenterol.*, 43(7): 565-70.
57. Kaba M., Davoust B., Marie J-L., Colson P., 2010, Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers, *Vet. J.*, 186(2): 259-61.
58. Kaci S., Nöckler K., Johne R., 2008, Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples, *Vet. Microbiol.*, 128(3-4): 380-85.
59. Kamar N., Silves J., Mansuy J.M., Ouezzani L., Peron J.M., Guitard J., Cointault O., Esposito L., Abravanel F., Danjoux M., Durand D., Vinel J.P., Izopet J., Rostaing L., 2008, Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients, *N. Engl. J. Med.* 358(8): 811-7.



60. Kanai Y., Tsujikawa M., Yunoki M., Nishiyama S., Ikuta K., Hagiwara K., 2010, Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies, *J. Med. Virol.*, 82(1): 69-76.
61. Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G., 2004, Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs, *J. Clin Microbiol.*, 42(11): 5047-52.
62. Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng X.J., 2003, Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus, *Can. J. Vet. Res.*, 67(4): 303-06
63. Kelley K.W., 1980, Stress and immune function: a bibliographic review, *Ann. Rech. Vet.*, 11(4): 445-478.
64. Khuroo M.S., Kamili S., Jameel S. 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus, *Lancet* 345 (8965): 1025-26.
65. Kim S.E., Kim M.Y., Kim D.G., Song Y.J., Jeong H.J., Lee S.W., Lee J.B., Park S.J., Song C.S., Oh S.J., Yoo H.S., Choi I.S., 2008, Determination of fecal shedding rates and genotypes of swine hepatitis E virus (HEV) in Korea, *J. Vet. Med. Sci.*, 70 (12): 1367-71.
66. Kisseleva T., Brenner D. A., 2008, Mechanisms of fibrogenesis, *Exp. Biol. Med.*, 233(2): 109-22.
67. Koziel M.J., Dudley D., Afdhal N., Choo Q.L., Houghton M., Ralston R., Walker B.D., 1993, Hepatitis C virus (HCV) – specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV, *J. Virol.* 67(12): 7522-32.
68. Krakowka S., Ellis J.A., Mc Neilly F., Meehan B., Oglesbee M., Alldinger S., Allan G., 2004, Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristics of porcine circovirus-2 associated postweaning multisystemic wasting disease, *Vet Pathol*, 41(5): 471-81.
69. Krawczynski K., Aggarawal R., Kamili S., 2000, Infection of the liver: Hepatitis E, *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 14(3): 1-18.
70. Kumar A., Beniwal M., Kar P., Sharma J.B, Murthy N.S., 2004, Hepatitis E in pregnancy, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 85(3), 240-44.
71. Kume T., Tainaka M., Saito H., Hiruma M., Nishio S., Kashiwazaki M., Mitani K., Nakajima Y., 1983, Research on experimental *Corynebacterium pyogenes* infections in pigs, *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 56(4): 119-35.
72. Leblanc D., Ward P., Gagne M.J., Poitras E., Muller P., 2007, Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter, *Int. J. Food Microbiol.*, 117(2): 160-66.
73. Lee S.H., Kang S.C., Kim D.Y., Bae J.H., Kim J.H., 2007, Detection of swine hepatitis E virus in the porcine hepatic lesion in Jeju Island, *J. Vet. Sci.*, 8(1): 51-55.
74. Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Chae C., 2008a, Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs, *Vet. J.*, 179(3): 417-21
75. Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Cho K.D., Lee B.H., Kim S.H., Chae C., 2008b, Comparison of a new synthetic, peptide-derived, polyclonal antibody-based, immunohistochemical test with in

- situ hybridisation for detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Vet. J.*, 182(1): 131-35
76. Li S.W., Zhang J., Li Y.M., Ou S.H., Huang G.Y., He Z.Q., Ge S.X., Xian Y.L., Pang S.Q., Ng M.H., Xia N.S., 2005, A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates, *Vaccine*, 23(22): 2893-901.
  77. 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(12): 1958-60.
  78. Li W., She R., Wei H., Zhao J., Wang Y., Sun Q., Zhang Y., Wang D., Li R., 2009a, Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China, *Vet. Microbiol.*, 133(1-2): 75-83.
  79. Li W., Sun Q., Wang D., Duan X., Yin J., Ding Y., 2009b, Experimental infection of Mongolian gerbils by genotype 4 strain of swine hepatitis E virus, *J. Med. Virol.*, 81(9): 1591-96.
  80. Li X., Kamili S., Krawczynski K., 2006, Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection, *J. Viral hepat.*, 13(12): 835-9.
  81. Long J.R., Dukes T.W., 1972, Listeriosis in newborn swine, *Can. Vet. Jour.* 13 (2): 49-52.
  82. Lu L., Li C., Hagedorn CH., 2005, Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis, *Rev. Med. Virol.*, 16 (1): 5-36.
  83. Lu Y.H., Zheng Y.J., Hu A.Q., Zhu J.F., Wang F.D., Wang X.C., Jiang Q.W., 2009, Seasonal pattern and phylogenetic analysis with human isolates of genotype-IV hepatitis E virus in swine herds, eastern China, *Zhonghua Yu Fang Xue Za Zhi*, 43(6): 504-8.
  84. Maneerat Y., Clayson E.T., Myint K.S., Young G.D., Innis B.L., 1996, Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus, *J. Med. Virol.*, 48(2): 121-8.
  85. Marianneau P., Steffan A.M., Royer C., Drouet M.T., Kirn A., Deubel V., 1998, Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line, *J. Infect. Dis.*, 178: 1270-8.
  86. Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Inglese N., Caprioli A., Ruggeri F.M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F., 2008, Epidemiology of hepatitis E virus (HEV) strains identified in Italian pigs affected by different pathological conditions, *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, 22-26 June 2008., Durban, South Africa*, 1: 5.
  87. Martin M., Segales J., Huang F.F., Guenette D.K., Mateu E., de Deus N., Meng X.J., 2007, Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs, *Vet. Microbiol.*, 122(1-2): 16-24.
  88. Mast E.E., Krawczynski K., 1996, Hepatitis E: An overview, *Annu. Rev. Med.*, 47: 257-66.
  89. McCreary C., Martelli F., Grierson S., Ostanello F., Nevel M., Banks M., 2008, Age-related prevalence of hepatitis E virus in pigs and presence of the virus in slurry stores in the UK, *Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June, 2008*, 3.
  90. Meng X.J., 2003, Swine hepatitis E virus: Cross species infection and risk in xenotransplantation, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 278: 185-216.

91. Meng X.J., 2010, Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk, *Vet Microbiol.*, 140(3-4): 256-65.
92. Meng X.J., Halbur P.G., 2006, Swine hepatitis E virus, In: *Diseases of swine*, Straw B. E., Zimmerman J.J., D Allaire S., Taylor D.J., ninth edition, Blackwell Publishing, Oxford, 537-545.
93. Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H., Emerson S.U., 1998, Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus, *J. Virol.*, 72(12): 9714-21.
94. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsarevam 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(18): 9860-65
95. Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U., 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(1): 117-22.
96. Milošev-Žilović D., Marković M., Maksin J., 2003, Fulminantni tok hepatitisa E – prikaz bolesnika, *Praxis Medica*, 31(1-2): 83-85.
97. Munne M.S., Vlaimirsky S., Otegui L., Castro R., Brajterman L., Soto S., Guarnera E., Molina V., Monfellano M., Schlauder G.G., Gonzales J.E., 2007, Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-Hev antibodies in swine in Argentina, *J. Med. Virol.*, 78(12): 1579-83.
98. Murakami S., Ogawa A., Kinoshita T., Matsumoto A., Ito N., Nakane T., 2006, Occurrence of swine salmonellosis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs concurrently infected with porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV), *J. Vet. Med. Sci.*, 68(4): 387-91.
99. Nakai I., Kato K., Miyazaki A., Yoshii M., Li T-C., Takeda N., 2006, Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(6): 1171-77.
100. Nakamura K., Yokomizo Y., Okutomo M., Nishimori K., Yugi H., Shoya S., 1984, Light and electron microscopic observations on granulomatous lesions in pigs dosed with *Mycobacterium intracellulare*, *J. Comp. Pathol.*, 94(4): 509-19.
101. Ohba T., Shibahara T., Kobayashi H., Takashima A., Nagoshi M., Osanai R., Kubo M., 2008, Multifocal granulomatous hepatitis caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs, *J. Comp. Pathol.*, 139 (2-3): 61-66.
102. Okamoto H., 2007, Genetic variability and evolution of hepatitis E virus, *Virus Res.*, 127(2): 216-28.
103. Ollier L., Tieulie N., Sanderson F., Heudier P., Giordanengo V., Fuzibet J.G., Nicand E., 2009, Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab, *Ann. Intern. Med.* 150(6): 430-1.
104. Panda S.K., Thakral D., Rehman S., 2007, Hepatitis E virus, *Rev. Med. Virol.*, 17(3): 151-80.

- 105.Pavio N., Meng X.J., Renou C., 2010, Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks, *Vet. Res.* 41(6): 46.
- 106.Perez-Garcia M.T., Mateos M.L., Galiana C., Fernandez-Barredo S., Garcia A., Gomez M.T., Moreira V., 2007, Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77 (5): 893-96.
- 107.Petrović T., Prodanov J., Došen R., Lazić S., 2008, Hepatitis E virusna infekcija kao potencijalna nova zoonoza, *Zbornik radova i kratkih sadržaja 20. Savetovanja veterinara Srbije (sa međunarodnim učešćem)*, 24.-27. septembar 2008. godine, Zlatibor, 150-151.
- 108.Petrović T., Velhner M., Petrović J., Stojanov I., Grgić Ž., Lazić S., 2009, Savremene metode laboratorijske dijagnostike u veterinarskoj medicini i mogućnosti njihove primene, *Zbornik referata 8. Kongresa veterinara Srbije (sa međunarodnim učešćem)*, 15.-19. Septembar 2009., Beograd, 230-241.
- 109.Pischke S., Potthoff A., Hauröder B., Schlue J., Manns M.P., Cornberg m., Wedemeyer H., 2010, Hepatitis E virus infection: a paradigm shift?, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 135(22): 1129-33.
- 110.Pourpongporn P., Samransurp K., Rojanasang P., Wiwattanakul S., Srisurapanon S., 2009, The prevalence of anti-hepatitis E in occupational risk groups, *J. Med. Assoc. Thai.*, 92(3): 38-42.
- 111.Prabhu S.B., Gupta P., Durgapal H., Rath S., Gupta S.D., Acharya S.K., Panda S.K., 2011, Study of cellular immune response against hepatitis E virus (HEV), *J. Viral. Hepat.*, 18(8): 587-94.
- 112.Quaresma J.A.S., Barros Vera L.R.S., Pagliari C., Fernandes E.R., Guedes F., Takakura C.F.H., Andrade J.H.F., Vasconcelos P.F.C., Duarte M.I.S., 2006, Revisiting the liver in human yellow fever: Virus induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NK cells activity, *Virology* 345(1): 22-30.
- 113.Reuter G., Fodor D., Forgach P., Katai A., Szucs G., 2009, Characterization an zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary, *J. Clin. Virol.*, 44(4): 277-81.
- 114.Romig T., Dinkel A., Mackenstedt U., 2006, The present situation of echinococcosis in Europe, *Parasitol. Int.*, 55, Suppl: S187-91.
- 115.Rosell C., Segales J., Domingo M., 2000, Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2, *Vet Pathol.*, 37(6): 687-92.
- 116.Roulston A., Marcellus R.C., Branton P.E., 1999, Virus and apoptosis, *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 577-628.
- 117.Rutjes S.A., Lodder W.J., Lodder-Verschoor F., van den Berg H.H.J.L., Vennema H., Duizer E., Koopmans M., de Roda Husman A.M., 2009, Sources of hepatitis E virus genotype 3 in the Netherlands, *Emerg. Infect. Dis.*, 15(3): 383-87.
- 118.Saad M.D., Hussein H.A., Bashandy M.M., Kamel H.H., Earhart K.C., Fryauff D.J., Younan M., Mohamed A.H., 2007, Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt, *Infect. Genet. Evol.*, 7(3): 368-73.

119. Salvesen G.S. and Dixit M.V., 1997, Caspase: intracellular signaling by proteolysis, *Cell*, 91(4): 443-6.
120. Sanford S.E., Josephson G., Palmer N., 1991, Severe parasitic hepatitis in pigs, *Can. Vet. J.*, 32(8): 500
121. Satou K., Nishiura H., 2007, Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection, *BMC Vet. Res.* 10; 3:9.
122. Savić B., Milićević V., Bojkovski J., Kureljušić B., Ivetić V., Pavlović 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(7): 641-8.
123. Segales J., Domingo M., Chianini F., Majo N., Dominguez J., Darwich L., Mateu E., 2004, Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs, *Vet. Microbiol.*, 98(2): 151-8.
124. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M., 2008, Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain, *Vet. J.*, 175(1): 130-2.
125. Shata M.T., Navaneethan U., 2008, The mystery of hepatitis E seroprevalence in developed countries: Is there subclinical infection due to hepatitis E virus, *Clin. Infect. Dis.*, 47(8): 1032-4.
126. Smith J.L., 2001, A review of hepatitis E virus, *J. Food Prot.*, 64(4): 572-86.
127. Song Y.J., Jeong H.J., Kim Y.J., Lee S.W., Lee J.B., Park S.Y., Song C.S., Park H.M., Choi I.S., 2010, Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea, *J. Med. Virol.* 82(4): 583-91.
128. Srivastava R., Aggarwal R., Jameel S., Puri P., Gupta V.K., Ramesh V.S., Bhatia S., Naik S., 2007, Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein, *Viral. Immunol.*, 20(1): 56-65.
129. Steyer A., Naglič T., Močilnik T., Poljšak-Prijatelj M., Poljak M., 2011, Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage, *Infect. Genet. Evol.*, 11(7): 1732-7
130. Suwannakarn K., Tongmee C., Theamboonlers A., Komolmit P., Poovorawan Y., 2010, Swine as the possible source of hepatitis E virus transmission to humans in Thailand, *Arch. Virol.*, 155(10): 1697-9.
131. Tahir S.S., Sheikh-Omar A.R., 1985, An abattoir survey on the pathology of swine livers, *Pertanika*, 8(2): 259-63.
132. Takahashi K., Kitajima N., Abe N., Mishiro S., 2004, Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer, *Virology*, 330(2): 501-5.
133. Takahashi M., Nishizawa T., Miyajima H., Gotanda Y., Lita T., Tsuda F., Okamoto H., 2003, Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus, *J. Gen. Virol.*, 84(Pt4), 851-62.

134. Takeuchi S., Azuma R., Suto T., 1979, Purification and some properties of hemolysin produced by *Corynebacterium pyogenes*, *Jap. J. Vet. Sci.*, 41(5): 511-16
135. Takiya S., Tagaya T., Takahashi K., Kawashima H., Kamiya M., Fukuzawa Y., Kobayashi S., Fukatsu A., Katoh K., Kakumu S., 1995, Role of transforming growth factor  $\beta$ 1 on hepatic regeneration and apoptosis in liver diseases, *J. Clin. Pathol.*, 48(12): 1093-7.
136. Tei S., Kitajima N., Tukahashi K., Mishiro S., 2003, Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings, *Lancet* 362 (9381): 371-3.
137. Teo C.G., 2010, Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E, *Clin. Microbiol. Infect.*, 16(1): 24-32
138. Vallbracht A., Gabriel P., Maier K., Hartmann F., Steinhardt H.J., Muller C., Wolf A., Manncke K.H., Flehmig B., 1986, Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection, *Hepatology* 6(6):1308-14.
139. van der Poel W.H.M., Verschoor F., van der Heide R., Herrera M-I., Vivo A., Kooreman M., de roda Husman A.M., 2001, Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands, *Emerging Infectious disease*, 7(6): 970-6.
140. Vasickova P., Psikal I., Wide 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(1): 143-8.
141. Vitral C.L., Pinto M.A., Lewis-Ximenez L.L., Khudyakov Y.E., dos Santos D.R., Gaspar A.M.C., 2005, Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from Southeast of Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 100 (2): 117-22.
142. Wang YC., Zhang HY., Xia NS., Peng G., Lan HY., Zhuang H., Zhu YH., Li SW., Tian KG., Gu WJ., Lin JX., Wu X., Li HM., Harrison TJ., 2002, Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China, *J. Med. Virol.*, 67(4): 516-21.
143. Wendum D., Nachury M., Yver M., Lemann M., Flejou J.F., Janin A., Bertheau P., 2005, Acute hepatitis E: A cause of lymphocytic destructive cholangitis, *Hum. Pathol.*, 36(4): 436-8.
144. Williams T.P., Kasornrorkbua 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(9): 3040-6.
145. Withers M.R., Correa M.T., Morrow M., Stebbins M.E., Seriwatana J., Webster W.D., Boak M.B., Vaughn D.W., 2002, Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine and murids, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(4): 384-8.
146. Worm H.C., Schlauder G.G., Brandstatter, 2002, Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas, *Wien Klin. Wochenschr.*, 114(15-16): 663-70.
147. Wu J.C., Chen C.M., Chiang T.Y., Tsai W.H., Jeng W.J., Sheen I.J., Lin C.C., Meng X.J., 2002, Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two year survey in Taiwan, *J. Med. Virol.*, 66(4): 488-92.
148. Yoo D., Willson P., Pei Y., Hayes A., Deckert A., Dewey CE., Friendship R.M., Yoon Y., Gottschalk M., Yason C., Giulivi A., 2001, Prevalence of hepatitis E virus antibodies in

- Canadian swine herds and identification of a novel variant of hepatitis E virus, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(6): 1213-9.
149. Zhao C., Ma Z., Harrison T.J., Feng R., Zhang C., Qiao Z., Fan J., Ma H., Li M., Song A., Wang Y., 2009, A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China, *J. Med. Virol.* 81(8):1371-9.
150. Zhao J., Wang S., Zhang T., Liu P., Zhou G.D., Sun Y.L., Yin T.Y., 2001, Pathological and virological studies of the liver tissues from the patients with sporadic hepatitis E, *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 15(3): 205-7.
151. Zheng Y, Ge S., Zhang J., Guo Q., Ng M.H., Wang F., Xia N., Jiang Q., 2006, Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China, *J. Infect. Dis.*, 193(12): 1643-9.
152. Žurić M., Stanković Helena, 1991, Aktivnost AST, ALT i GGT u krvnom serumu svinja u intenzivnoj proizvodnji u pogledu patohistoloških promjena u jetri, *Vet. Stanica*, 22(4):195-204.

## Biografija

Branislav I. Kureljušić, po zanimanju diplomirani veterinar, rođen je 01.06.1981. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu, a potom i gimnaziju završio je u Zrenjaninu. Školske 2000/2001 upisao je prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom studija bio je stipendista Ministarstva prosvete i Vlade Republike Srbije, kao i Univerzitetske fondacije „Dragoljub Marinković“. Kao student treće i četvrte godine studija, bio je pohvaljivan od strane Naučno-nastavnog veća Fakulteta za uspeh postignut tokom studija. Novembra 2006. godine, diplomirao je kao student generacije sa prosečnom ocenom 9,54. Školske 2006/2007 upisao je doktorske akademske studije na istom fakultetu, i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom. Od 2006. do 2008. godine kao istraživač doktorant i kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj radio je na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Od 04. februara 2008. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na Odeljenju za patološku morfologiju Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije gde se bavi specijalističkim poslovima i istraživačkim radom. 21. februara 2011. godine od strane Naučnog veća Instituta izabran je u zvanje istraživač saradnik. Učestvovao je na više međunarodnih skupova, uključujući i simpozijume organizovane 2007. i 2010. u Beogradu od strane američke fondacije za obuku veterinarskih patologa „Charles Louis Davis“. Kao stipendista Ministarstva poljoprivrede SAD, a po predlogu Instituta, boravio je na katedri za patologiju na Koledžu veterinarske medicine u Ajovi na jednomesečnoj obuci iz oblasti veterinarske patologije. Od 2007. godine, kao istraživač angažovan je na projektima koje finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U toku svog istraživačkog rada objavio je 41 naučni i stručni rad. Član je Srpskog veterinarskog društva i Veterinarske komore Srbije.



**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани Бранислав Курељушић  
број уписа \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање имунофенотипа мононуклеарног ћелијског инфилтрата у јетри свиња природно инфицираних вирусом хепатитиса Е

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 07.05.2012.

\_\_\_\_\_

**Прилог 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора : Бранислав Курељушић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм: докторске академске студије

Наслов рада: Испитивање имунофенотипа мононуклеарног ћелијског инфилтрата у  
јетри свиња природно инфицираних вирусом хепатитиса Е

Ментор: Проф. Др Милијана Кнежевић

Потписани \_\_\_\_\_ Бранислав Курељушић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији  
коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума  
Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања  
доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.  
Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у  
електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 07.05.2012.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање имунофенотипа мононуклеарног ћелијског инфилтрата у јетри свиња природно инфицираних вирусом хепатитиса Е

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 07.05.2012.

---