

SEROPREVALENCA HEPATITIS E VIRUSNE INFEKCIJE KOD DIVLJIH SVINJA U SRBIJI*

Diana Lupulović¹, Tamaš Petrović, Sava Lazić, Jasna Prodanov-Radulović,
Radoslav Došen, Ivan Pušić

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Kratki sadržaj

Hepatitis E (HEV) pripada jednom od do sada 5 opisanih tipova hepatitisa ljudi izazvanih virusnim agensom (hepatitis A, B, C, D i E). Oboljenje se karakteriše kliničkom i epidemiološkom slikom akutnog hepatitisa, a prenosi se prvenstveno fekalno-oralnim putem preko kontaminirane vode i hrane. Infekcija je pretežno ustanovljena u zemljama u razvoju Srednjeg Istoka, Azije i Afrike, naročito u državama sa nezadovoljavajućim sanitarnim uslovima života. HEV infekcija je kod svinja prvi put zabeležena 1990. god. Brojna ispitivanja koja su usledila, dokazala su da HEV može preskočiti barijeru vrste i preneti se sa svinja na ljude. HEV je dokazan kao novi zoonozni uzročnik. Hepatitis E virusom inficirali su se ljudi u Japanu koji su konzumirali nedovoljno termički obrađeno meso jelena, svinjsku jetru i meso divljih svinja. Kod ljudi su ustanovljena četiri genotipa: I, II, III i IV, dok do sada ispitani svinjski izolati pripadaju genotipovima III i IV. Takođe je važno napomenuti da su HEV izolati svinja iz jednog geografskog područja genetski bliži izolatima poreklom od ljudi sa istog područja nego izolatima poreklom od svinja iz drugog dela sveta. Cilj ovog rada je da se prikaže da li je i koliko HEV infekcija prisutna kod populacije divljih svinja u Srbiji, koje predstavljaju rezervoar ove bolesti izazvane značajnim zoonoznim uzročnikom. Preliminarna serološka ispitivanja obuhvatila su ispitivanje 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja. Kod 32 životinje, odnosno 34,78%, ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv HEV genotip 3. Uzorci krvi sakupljeni su tokom 2009, 2010. i 2011. godine sa lokaliteta 15 lovišta u Srbiji. Laboratorijsko ispitivanje izvršeno je nekomercijalnim ELISA testom (*in-house* ELISA), gde je kao antigen korišćen rekombinantni kapsidni protein – HEV Δ ORF 2 genotip 3, koji je dobijen laboratorijskim postupkom kloniranja. Rezultati ispitivanja prikazali su da je infekcija he-

* Istraživanje je finansirano od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, broj projekta: TR31084.

¹ E-mail: diana@niv.ns.ac.rs

patitis E virusom prisutna kod divljih svinja u Vojvodini, koje predstavljaju potencijalni izvor ne samo ove zaraze, već i mnogobrojnih drugih infekcija različite etiologije.

Ključne reči: hepatitis E infekcija, divlje svinje, *in-house* ELISA

THE SEROPREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN WILD BOARS IN SERBIA

Diana Lupulović¹, Tamaš Petrović, Sava Lazić, Jasna Prodanov-Radulović,
Radoslav Došen, Ivan Pušić
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20, 21000 Novi Sad,

Abstracts

Hepatitis E (HEV) belongs to one of five so far described types of viral hepatitis caused by human agents (hepatitis A, B, C, D and E). The disease is characterized by clinical and epidemiological signs of acute hepatitis and is transmitted primarily by fecal-oral route via contaminated food and water. The infection is mainly detected in the developing countries of the Middle East, Asia and Africa, especially in countries with poor sanitary conditions of life. HEV infection in pigs was first recorded in 1990. Numerous studies that followed proved that HEV can skip species barrier and can be transmitted from pigs to humans. HEV has been demonstrated as a new zoonotic agent. Hepatitis E virus has infected people in Japan who consumed insufficiently cooked meat of deer, pig liver and meat of wild boar. In humans four genotypes have been determined: I, II, III and IV, while so far tested swine isolates belong to genotypes III and IV. It is also important to note that the swine HEV isolates from one geographical region are genetically closer to human isolates from the same area than to the other isolates from pigs in the world. The aim of this paper is to show whether and how much HEV infection is present in the population of wild boars in Serbia, which represent a reservoir of this disease caused by a significant zoonotic agent. Preliminary serological tests included the examination of 92 blood serum samples of wild boars. In 32 animals, or 34.78%, the presence of specific antibodies against HEV genotype was detected. The blood samples were collected during 2009, 2010 and 2011 from 15 hunting sites in Serbia. Laboratory testing was performed by non-commercial ELISA (*in-house* ELISA), where the used antigen was recombinant capsid protein-HEV genotype 3 Δ ORF 2, which was obtained by laboratory cloning procedure. The test results showed that the hepatitis E virus is present in wild boars in

Vojvodina, that are a potential source of this infection, as well as for many other infections of different etiology.

Key words: hepatitis E infection, wild boar, in-house ELISA

UVOD

Hepatitis E virus (HEV) pripada porodici *Hepeviridae* i rodu *Hepevirus*. Virusna partikula je sferičnog oblika, dijametra 32-34 nm. Posедуje jednolančanu RNK od 7.2 kb. Potrebno je istaći da su do sada dokazana 4 genotipa HEV kod ljudi (I, II, III i IV). Genotip I je prisutan u regionima Azije i Afrike, dok je genotip II izolovan u Meksiku. Izolati iz područja koja nisu endemska (SAD, Kanada i zemlje Evrope: Španija, Italija, Grčka, Mađarska, Češka i dr.) svrstani su u grupu genotipa III. Genotipu IV pripadaju izolati iz Kine i drugih zemalja Dalekog Istoka.

Oboljenje kod ljudi se karakteriše kliničkom i epidemiološkom slikom akutnog hepatitisa i simptomima žutice (epigastrični bolovi, povraćanje, groznica, ikterus beonjača i tamna mokraća), a prenosi se prvenstveno feko-oralnim putem preko kontaminirane vode i hrane. Infekcija je pretežno ustanovljena u zemljama u razvoju Srednjeg Istoka, Azije i Afrike, naročito u državama sa nezadovoljavajućim sanitarnim uslovima života. U industrijski razvijenim zemljama Evrope i u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), dijagnostikovani su samo sporadični slučajevi akutnog oblika hepatitisa E (9, 21, 25, 28, 34). Međutim, na osnovu objavljenih rezultata nedavnih istraživanja zapažen je izuzetno visok nivo HEV antitela kod ljudi u industrijski razvijenim zemljama koji može biti čak i viši nego kod ljudi u endemskim područjima. Postavljena je sumnja da rezervoar virusa hepatitisa E mogu biti domaće i divlje životinje.

Usledila su brojna ispitivanja i HEV infekcija kod svinja je prvi put zabeležena 1990. god. (9), a prvi dokaz prisustva virusa kod svinja izvršen je u Americi 1997. godine od strane Meng-a i saradnika (19). Kod svinja bolest protiče asimptomatski, a inkubacioni period traje 1-4 nedelje (9, 25, 34). Kod inficiranih svinja prvo se javlja prolazna viremija, koja traje 1-2 nedelje, a zatim se virus izlučuje još 3-7 nedelja putem fecesa. HEV infekcija se najčešće pojavljuje u uzrastu prasadi od 2 do 3 meseca, kada iz cirkulacije nestanu maternalna antitela. To se takođe poklapa i sa periodom kada se prasad prebacuju u tovilište, međusobno mešaju i menjaju svoju okolinu, što povećava mogućnost zaražavanja. Virus prodire u organizam životinje oralnim putem, umnožava se u gastrointestinalnom traktu i odatle se dalje putem krvi prenosi u jetru, a u spoljašnju sredinu se izlučuje putem fecesa. Makroskopske morfološke promene na jetri svinja nisu zabeležene, a od mikroskopskih lezija se

mogu javiti zapaljenske promene u vidu infiltracije limfocita, pojave makrofaga i vakuolisanih hepatocita (19).

HEV svinja je široko rasprostranjen na farmama u mnogim zemljama, kao što su: Italija (2, 37), Španija (4, 23, 27), Kanada (36), Južna Koreja (6), Japan, Indija, SAD, Australija (5), Grčka (1), Mađarska (26), Češka (31), Francuska (16), Kina (32) i dr. Međutim, seroprevalenca može da varira od 0 do 100% i različiata je od zapata do zapata i od regiona do regiona (4, 16, 19).

Utvrdeno je da HEV izolati svinja pripadaju genotipovima II i IV. Do sada je u Evropi kod svinja bio utvrđen samo genotip III, a nedavno je po prvi put dokazano i prisustvo virusa hepatitisa E u fecesu svinja poreklom iz Belgije koji pripada HEV genotipu 4c (13). Takođe je važno napomenuti da su HEV izolati svinja iz jednog geografskog područja genetski bliži izolatima ljudi sa istog područja nego izolatima svinja iz drugog dela sveta (19, 21, 22).

Prisustvo HEV je dokazano i kod drugih životinjskih vrsta, kao što su: divlje svinje, glodari, magarci, goveda, psi i ptice. Ustanovljeno je da postoji samo jedan serotip virusa hepatitisa E, odnosno nema podataka o serološkoj heterogenosti virusa (19, 25).

Nakon što je infekcija hepatitis E virusom opisana kod svinja, ustanovljeno je da HEV može preskočiti barijeru vrste i preneti se sa svinja na ljude (20). Sprovedena su i epidemiološka ispitivanja kod ljudi koji dolaze u kontakt sa svinjama. Dokazano je da u rizične grupe ljudi spadaju veterinari koji se bave zdravstvenom zaštitom svinja i radnici na farmama svinja (22,8). Virus hepatitisa E je veoma teško izolovati, pošto za sada ne postoji prijemčiva ćelijska kultura. Istraživači iz Japana su nedavno uspeali da ograničeno umnože virus dobijen iz fecesa ljudi na ćelijskoj kulturi karcinoma jetre ljudi PLC/PRF/5 (30). Što se tiče serološke dijagnostike, ona je zasnovana na primeni imunoenzimskog testa (ELISA) za dokazivanje antitela protiv HEV. Molekularnim metodama dobijen je rekombinantni kapsidni protein kojeg kodira ORF-2 fragment genoma HEV genotipa 3, koji se koristi u tzv. „*in-house*“ (nekomercijalnom) ELISA testu. Ovaj ELISA test se uspešno koristi za dokazivanje prisustva antitela protiv antigena hepatitisa E kod svinja i ljudi (14, 15, 17). Pored ELISA testa može se koristiti i Western-blot tehnika, koja predstavlja potvrđnu metodu i «zlatni standard» u serološkoj dijagnostici ove infekcije (15). Za dokazivanje virusnog antigena u tkivima parenhimatoznih organa koristi se imunohistohemijska metoda, a za virusnu RNK *in-situ* hibridizacija. Virusni genom se dokazuje molekularnim metodama *reverzna transkripcija-polimeraza lančana reakcija* (RT-PCR); *RT nested PCR* i *REAL-TIME PCR*. Molekularnim metodama virus se može dokazivati u krvi, fecesu i tkivima životinja. Međutim, viremija traje samo 2 nedelje i ograničena je na akutnu fazu bolesti, pa se često virus može detektovati samo u fecesu i tkivima gde se duže zadržava i izlučuje.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod populacije divljih svinja u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Ukupno su pregledana 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja iz 15 lovišta sa teritorije Srbije. Uzorci su sakupljeni tokom 2009, 2010. i 2011. godine. Starost životinja je iznosila od 1 do 3 godine.

Serološka ispitivanja vršena su nekomercijalnim (*in-house*) ELISA testom, gde je kao antigen korišćen rekombinantni kapsidni protein – HEV Δ ORF 2 genotip 3, dobijen postupkom molekularnog kloniranja u *Trichoplusia ni* larvama (15). Ispitivanja su vršena u saradnji sa Nacionalnim institutom INIA, Madrid, Španija.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijeni rezultati ispitivanja seroprevalence HEV prikazani su u Tabeli 1. Od ukupno pregledanih 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja, kod 36 životinja (34,78%) ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa hepatitis E. Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da je najveći procenat seropozitivnih divljih svinja utvrđen u lovištu Karakuša (75%), Morović (58,3%), Lovište u okolini Šapca i Odžaka (50%), u okolini Valjeva (40%) i lovište Višnjicevo (29,41%). U lovištima Obedska Bara, Fruška gora, Plavna, Valjevo 2, Šabac 2, Mačva, Bašaid i Subotica nije utvrđeno prisustvo HEV infekcije kod divljih svinja.

Tabela 1: Prikaz seroprevalence HEV kod divljih svinja u Srbiji

Lovište	Br. pregl.	Br. pozitivnih	%
Karakuša	20	15	75
Obedska Bara	5	0	0
Višnjičevo	17	5	29,41
Fruška Gora	5	0	0
Plavna	2	0	0
Valjevo 1	5	2	40
Valjevo 2	1	0	0
Šabac 1	2	1	50
Šabac 2	3	0	0
Šabac 3	14	1	7,1
Mačva	1	0	0
Bašaid	1	0	0
Subotica	2	0	0
Odžaci	2	1	50
Morović	12	7	58,3
Σ	92	36	34,78

Na mapi br. 1 prikazana su lovišta i područja na kojima su uzorkovane krvi divljih svinja (sva obojena polja), a tamnom bojom označena su lovišta u kojima su ustanovljene HEV seropozitivne divlje svinje.

Mapa 1: HEV infekcija kod divljih svinja u lovištima Srbije



Hepatitis E virusom inficirali su se ljudi u Japanu koji su konzumirali nedovoljno termički obrađeno meso jelena, svinjsku jetru i meso divljih svinja (18, 29, 35). U Italiji su zabeleženi slučajevi akutnog oblika hepatitisa E na

Siciliji kod ljudi koji su jeli inficirane školjke (25). Svi ovi podaci ukazali su da su domaće i divlje životinje rezervoari infekcije i da postoji realna opasnost da virus hepatitisa E predstavlja zoonoznu infekciju. Pošto se infekcija prenosi putem hrane i vode, virus hepatitisa E predstavlja zagađivača životne sredine i opasnost za proizvodnju zdravstveno bezbedne hrane, kao i za zdravlje ljudi.

Virusna RNK i specifična antitela protiv HEV su utvrđena kod populacije divljih svinja u mnogim zemljama: Japan, Nemačka, Italija, Španija, Holandija, Mađarska. Seropozitivnost kod divljih svinja varira od oblasti do oblasti i iznosi od 12-42 % (Japan 25,5%; Holandija 12%; Nemačka 29,9%; Španija 42,7%). Utvrđeni procenat seropozitivnih životinja u populaciji divljih svinja u našoj zemlji iznosi 34,78%, što najviše odgovara rezultatima istraživanja dobijenih u Španiji i Nemačkoj.

Prva preliminarna ispitivanja HEV kod svinja u Srbiji izvršena su 2008. godine od strane Petrovića i saradnika. Istraživanjem su obuhvaćeni fecesi i parenhimatozni organi svinja poreklom sa farmi i iz seoskih gazdinstava, kao i od divljih svinja. Virus je ustanovljen molekularnom tehnikom reverznom transkripcijom polimeraza lančanom reakcijom (RT-PCR) i naknadnom *nested* PCR reakcijom. Virusna RNK utvrđena je u 30% pregledanih zbirnih uzoraka fecesa i 45% zbirnih uzoraka tkiva svinja sa farmi i iz seoskih gazdinstava. U zbirnim uzorcima fecesa divljih svinja HEV RNK nije utvrđena (24). Nedavno su izvršena i prva serološka ispitivanja prisustva hepatitisa E kod dvorišno uzgajanih svinja u seoskim gazdinstvima u Vojvodini. Prisustvo specifičnih antitela utvrđeno je kod 34,16% (109/315) ispitanih životinja (17). Hepatitis E virus zastupljen je kod divljih svinja u Srbiji u sličnom procentu (34,78%) kao i kod domaćih svinja (34,16%).

ZAKLJUČAK

- Hepatitis E virus prisutan je kod populacije divljih svinja u Srbiji,
- Seroprevalenca HEV infekcije kod divljih svinja iznosi 34,16%,
- Divlje svinje predstavljaju rezervoar HEV, kao i mnogih drugih infektivnih uzročnika.

LITERATURA

1. Asimoula S, Tzika E, Alexopoulos C, Kyriakis SC and Froesner G: First report of serological evidence of hepatitis E virus infection in swine in northern Greece, *Acta Veterinaria*, 59, 2-3, 205-211, 2009.
2. Bartolo I. D., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F. and Rugger FM: Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy, *Vet. Microbiology*, 132, 47-55, 2008.

3. Bouwknegt M, Lodder-Verschuur F, Poel W.H., Rutjes S. Husman A: Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands, *J. Food Protect* 70, 2889-2895, 2007.
4. Casas M, Pujols J., Rosell R., Deus de N., Peralta B., Pina S., Casal J. and Martín M: Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *Vet. Microbiology*, 135, 248-252, 2009.
5. Chandler J. D., Riddell M. A., Li F., Love R.J., Anderson D.A.: Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds, *Vet. Microbiology* 68, 95-105, 1999.
6. Choi IS, Kwon HJ, Shin NR and Yoo HS: Identification of Swine Hepatitis E Virus (HEV) and Prevalence of Anti-HEV Antibodies in Swine and Human Populations in Korea, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8, 3602-3608, 2003.
7. Delić D, Nešić Z., Žerjav S., Pešić I., Popović N., Simonović J.: Hepatitis E virusna infekcija u Srbiji: epidemiologija i klinička slika; *Archives of Gastroenterohepatology*, vol. 22, br. 3-4, str. 53-56 (2003)
8. 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.: Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine, *The Journal of infectious diseases*, 184, 12, 1594-7, 2001.
9. Emerson S.U., Purcell R.H.: Hepatitis E virus, *Rev Med Virol*, 13, 45-154, 2003
10. Engle R. E., C. Yu, Emerson S. U., Meng X.-J., R. H. Purcell: Hepatitis E Virus (HEV) Capsid Antigens Derived from Viruses of Human and Swine Origin Are Equally Efficient for Detecting Anti-HEV by Enzyme Immunoassay, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 12, 4576-4580, 2002
11. Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J.: Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA, *J. Gen. Virol.* 88, 912-917, 2007.
12. Ha S.K., Chae C.: Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver, *Jour of Vir Hep*, 263-267, 2004.
13. Hakze-van der Honing R., Els van Coillie, Wim H.M. van der Poel: Discovery of HEV genotype 4 in swine in Europe through screening of fecal samples, The Netherlands and Belgium, *U. Proceedings, 8th International Congress of veterinary Virology, Budapest (Hungary)*, 2009.
14. Jiménez de Oya N., Galindo I., Romero E.E., Blázquez A.B., Padilla J.A., Halaihel N., Escibano J.M. and Saiz J.C.: Expression and Immunoreactivities of Hepatitis E Virus Genotype 3 Open Reading Frame-2 (ORF-2) Recombinant Proteins Expressed in Insect Cells, *Food and Environmental Virology*, 1, 2, 2009.
15. Jiménez de Oya N., Galindo I., Gironés O., Duizer E., Escibano J.M., Saiz J.C.: Serological Immunoassay for Detection of Hepatitis E Virus on the

- Basis of Genotype 3 Open Reading Frame 2 Recombinant Proteins Produced in *Trichoplusia ni* Larvae, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009.
16. Kaba M, Marié JL, Barthet M, Henry M, Tamalet C, Raoult D, Colson P: Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France, *Journal of Med. Virology*, 81, 1750 – 1759, 2009.
 17. Lupulovic D., Lazic S., Prodanov-Radulovic J., Nereida Jiménez de Oya, Estela Escribano-Romero, Saiz J.C., Petrovic T: First Serological Study of Hepatitis E Virus Infection in Backyard Pigs from Serbia, *J Food and Environmental V.*, DOI. 10.1007/s12560-010-9033-6, 2010
 18. Masuda J., Yano K., Tamada Y., Takii Y., Ito M., Omagari K., Kohno S.: Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, *Japan Hepatology Research*, 31, 3, 178-183, 2005.
 19. Meng X-J, Purcell R.H., Halbur G.P., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Hayns, Brad J., Thacker J.S., Emerson S.U.: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, pp 9860-9865, (1997)
 20. Meng, X.J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. :Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714–9721, 1998.
 21. Meng X.J.: Swine hepatitis E virus: Cross-species infection and risk in xenotransplantation, *Curr Top Microbiol Immunolo*, 278, 85-216, 2003.
 22. Meng X. J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K., Toth T. E, Engle R. E., Emerson S. U., Purcell R. H.: Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries, *J Clin Microbiol*, 40, 117-22, 2002.
 23. Peralta B., Casas M, Deus de N, Martín M., Ortuño A., Martín E.P, Pina S., Mateu E.: Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA 2009, *Vet. Microbiology* 137, 66-73, 2009.
 24. Petrovic T., Prodanov J., Lazic S.: First preliminary results on the presence of hepatitis E virus in swine population in Serbia. U: *Proceedings, Symposium Current Developments in Food and Environmental virology/COST Action 929, A European Network for Environmental ad Food Virology*, Pisa, Italy, 52-53, 2008.
 25. Pinto R., Saiz J.C.: Enteric hepatitis viruses,. *Perspectives in medical virology*, vol. 17. Human viruses in water. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. A. Bosch (ed.), 39-67, 2007.
 26. Reuter G., Fodor D., Forgách P, Kátai A., Szűcs G.: Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary, *Journal of Clinical Virology*, 44, 4, 277-281, 2009.

27. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M.: Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain, *Vet. Journal*, 130-132, 2008.
28. Skidmore, S. J., Yarbrough P.O., Gabor K.A., G.R. Reyes: Hepatitis E virus: the cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J. Med. Virol.* 37, 58-60, 1992.
29. Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings, *Lancet*, 362, 371-373, 2003.
30. Toshinori T., Masaharu T., Eiji K. and Hiroaki O.: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus, *J Gen Virol* 88, 903-911, 2007.
31. Vasickova P., Psikal I., Widen F., Smitalova R., Bendova J., Pavlik I., P. Kra-lik: Detection and genetic characterisation of hepatitis E virus in Czech pig production herds, *Res Vet Sci*, 87, 1, 143-8, 2009.
32. Wang Y.C, Zhang H.Y, Xia N.S., Peng G., Lan H.Y., Zhuang H., Zhu Y.H., Li S.W., Tian K.G., Gu W.J., Lin X.J., Wu X., Li H.M., Harrison J.T.: Prevalence, Isolation, and Partial Sequence Analysis of Hepatitis E Virus From Domestic Animals in China, *Journal of Medical Virology*, 67, 516-521, 2002
33. Wengui L, Ruiping S., Haitao W., Jingyi Z., Yinghua W., Quan S., Yanmei Z., Decheng W and Ruiwen L: Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China, *Veterinary Microbiology*, 133, 75-83, 2009.
34. Worm, H.C., van der Poel W.H.M., Brandstatter G.: Hepatitis E: an overview, *Microbes Infect*, 4, 657-666, 2002.
35. Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y., Okamoto H: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food, *J Gen Virol*, 84, 2351-2357, 2003.
36. Yoo D., Willson P, Pei Y, Hayes MA, Decker A., Dewey C.A., Friendship R.M., Yoon Y., Gottschalk M., Yason C., Giulivi A: Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 1213-1219, (2001).
37. Zanetti A. R.; Schlauder G. G.; Romano L.; Tanzi E.; Fabris P; Dawson G. J.; Mushahwar I. K.: Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy, *J. Med. Virol*, 57, 356-360, 1999.

Primljeno: 25.05.2011.
Odobreno: 20.09.2011.