

Obiectivul 3. *Examenul virusologic pentru detecția infecției cu virusul hepatitei E (VHE) la porcii din crescătorii în Estul României*

Virusul hepatitei E (HEV) este un virus lipsit de anvelopă de aproximativ 27-34 nm în diametru încadrat familia Hepeviridae, genul Hepevirus. HEV prezintă un genom ARN monocatenar de polaritate pozitivă, cu o lungime de aproximativ 7,2 kb (Tam A.W. și col., 1991). Virusul hepatitei E conține 3 cadre deschise de citire (ORF - open reading frame) parțial suprapuse relevând un organism genetic complex (Jameel S. și col., 1996). ORF2 codifică poliproteinele capsidei, în timp ce ORF3, care se suprapune peste ORF1 și ORF2 codifică o mică fosfoproteină imunogenică asociată citoscheletului (Zafrullah M., și col., 1997).

Tulpinile de virusul hepatitei E sunt încadrate în patru mari genotipuri, suinele fiind susceptibile la infecția cu genotipul 3 și 4. Din punct de vedere genetic tulpinile suine sunt foarte asemănătoare cu cele umane.

Activitatea 3.1. *Testarea și validarea de tehnici de biologie moleculară pentru identificarea genomului viral*

Activitatea 3.2. *Prelevarea de probe de fecale individuale de la porci, condiționarea și stocarea acestora*

Activitatea 3.3. *Detecția virusului hepatitei E la animale prin tehnici de biologie moleculară*

Activitatea 3.4. *Secvențializarea produșilor PCR obținuți*

REZULTATE

Obiectivul acestei cercetări a fost studierea prezenței virusului hepatitei E în crescătoriile de suine și posibilul pe care acestea îl joacă ca și rezervor de HEV.

Probele recoltate de la suine au fost reprezentate de fecale, ce ulterior au fost analizate prin RT-PCR pentru a studia viremia și excreția virusului hepatitei E pe categorii de vârstă. 19 eșantioane de fecale de porci au recoltate din 6 unități diferite. Probele de fecale au fost recoltate din adăposturi (pools) unde erau cazate suine cu vârsta cuprinsă între 2 și 4 luni.

Identificarea probelor de fecale de porc analizate

Crescătoria	Identificarea probelor	Vârsta animalelor
A	IS1	4 luni
	IS4	3 luni
B	IS2	2, 5 luni
	IS3	2 luni
C	EF1	3 luni
	EF2	3 luni
	EF3	3,5 luni
	EF4	3,5 luni
	EF5	3 luni
	EF6	3 luni
D	FPR1	3 luni
	FPR2	3 luni
	FPR3	3,5 luni
	FPR4	4 luni
E	FP1	3 luni
F	BTA1	4 luni
	BTA2	5 luni
	BTA3	3 luni
	BTA4	3,5 luni

Din analiza date obținute după amplificarea secvenței terminale a ORF2 (5996 - 6343) a virusului hepatitei E am identificat șase probe de fecale pozitive, în toate crescătoriile identificându - se probe pozitive. Talia așteptată a secvenței amplificate este de 348 nucleotide.

Rezultatul RT-PCR pentru detecția virusul hepatitei E

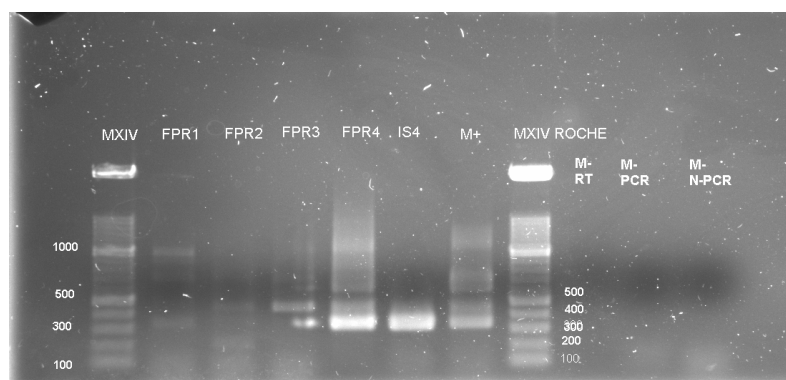
Crescătoria	Identificarea probelor	Vârsta animalelor	Rezultatul RT-PCT pentru HEV
A	IS1	4 luni	Negativ
	IS4	3 luni	Pozitiv
B	IS2	2, 5 luni	Pozitiv
	IS3	2 luni	Negativ
C	EF1	3 luni	Negativ
	EF2	3 luni	Pozitiv
	EF3	3,5 luni	Pozitiv
	EF4	3,5 luni	Negativ
	EF5	3 luni	Pozitiv
	EF6	3 luni	Pozitiv
D	FPR1	3 luni	Negativ
	FPR2	3 luni	Negativ
	FPR3	3,5 luni	Negativ
	FPR4	4 luni	Pozitiv
E	FP1	3 luni	In lucru
F	BTA1	4 luni	In lucru
	BTA2	5 luni	In lucru
	BTA3	3 luni	In lucru
	BTA4	3,5 luni	In lucru

În urma rezultatelor amplificării genice pentru virusul hepatitei E se observă identificarea de porci excretori de virus atât la vârsta de 2 luni și jumătate (în ferma B), în jurul vârstei de 3 luni (în ferma C și A) și la vârsta de 4 luni (în ferma D). Șase probe de fecale (42,85%) din cele 14 examinate au fost pozitive pentru ARN HEV. Rezultatele obținute în acest studiu sunt asemănătoare celor descrise în literatura de specialitate.

În condiții naturale infecția cu virusul hepatitei E se produce la vârsta de 10-12 săptămâni.

Acest lucru a fost demonstrat în urma unui studiu efectuat în SUA, unde majoritatea porcelor se infectau între vârsta de 2 și 4 luni.

Cel mai mare număr de animale viremice și excretoare de virus prin fecale s-a observat la vârsta de 3 luni (Takahashi M. și col., 2005), rezultat observat în urma unui studiu în Japonia. În același studiu în urma testării a 136 de animale cu vârsta de 6 luni nici unul nu a fost identificat viremic.

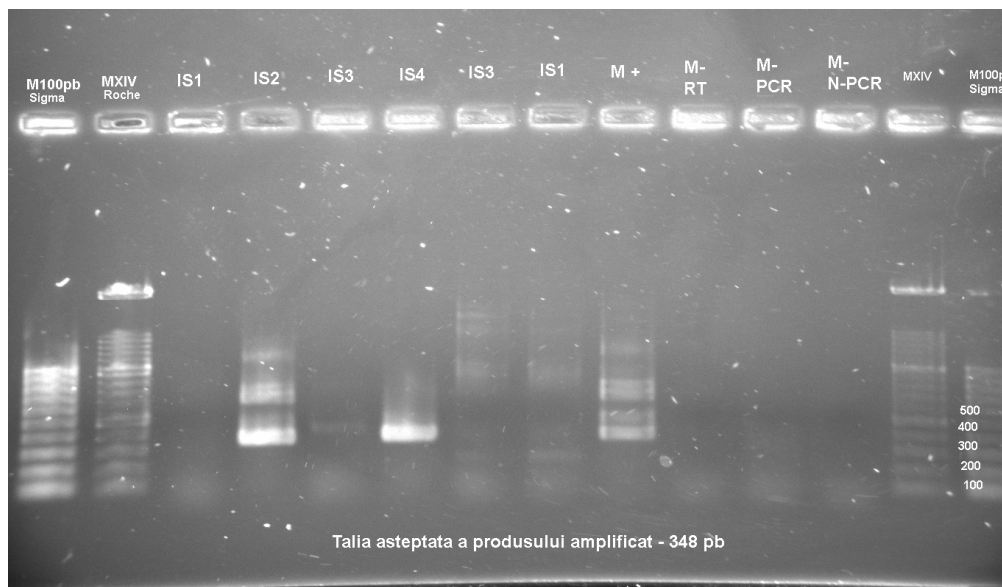


Rezultatele RT-PCR pentru virusul hepatitei E în ferma D

Excreția prin fecale a virusului hepatitei E se pare a fi în mare măsură dependentă de vârsta animalelor, observându-se un procent mare de pozitivitate la vârsta de 12-15 săptămâni, ca ulterior valorile să scadă după vârsta de 4 luni. Rezultate similare au fost obținute în urma unui studiu realizat în Canada (Leblanc D. și col., 2007) unde numărul porcii testați și identificați ca excretori de HEV prin fecale să se reducă la jumătate în apropierea vârstei de sacrificare.

În concordanță cu aceste date sunt și rezultatele obținute în Spania (Fernandez-Barredo S. și col., 2006) unde cel mai mare număr de porci pozitivi (12/20) excretori de virusul hepatitei E prin fecale s-a înregistrat la vârsta de 13-16 săptămâni, și cu rezultatele din Marea Britanie (McCreary C. și col., 2008) ce arată că cel mai mare număr de animale cu excreție de virus prin fecale s-a înregistrat la vârsta de 10-13 săptămâni (22%), ca apoi procentul lor să descrească la 4% după vârsta de 22 de săptămâni.

De Deus N. și colaboratorii (2008) demonstrează în urma rezultatelor obținute în Spania că procentul de porci viremici este în creștere de la vârsta de 9 săptămâni până la 15 săptămâni, ca apoi să scadă treptat până la vârsta de sacrificare.



Rezultatele amplificării genice pentru HEV în fermele A și B

Probele de fecale (*pools*) au fost recoltate din fermele unde în urma studiului serologic s-au identificat suine pozitive față de IgG anti-virusul hepatitei E. Coroborarea rezultatelor serologice cu cele virusologice atestă prezența și circulația virusului în fermele de porci din Romania. Importanța acestor rezultate este reprezentată de evidențierea potențialului risc de transmitere zoonotică ale tulpinilor de virus hepatic E.

Secvențierea a doi produși PCR obținuți în urma amplificării regiunii terminale a ORF2 a virusului hepatitei E a demonstrat existența de secvențe diferite, și deci de tulpini virale diferite, în probele de fecale (*pools*) din cele două ferme.

Produșii PCR secvențiați sunt reprezentați de EF5 identificat în ferma C și FPR4 identificat în ferma D.

Secvențierea s-a realizat pentru fiecare catenă din secvența de ADN dublu catenar a produsului PCR obținut, după care cele două catene complementare obținute pentru fiecare produs amplificat au fost suprapuse, obținându-se secvența de acid nucleic cu lungime de 348 nt pentru tulpina EF5 și de 341 nt pentru tulpina FPR4.

În momentul de față este în lucru secvențierea și analiza a încă doi produși PCR: IS2 și IS4.

În urma introducerii celor două secvențe obținute: EF5 și FPR4 în programul BLAST, au fost recunoscute automat ca secvențe ale virusului hepatitei E și încadrate în genotipul 3. Aceste două tulpini sunt primele

identificate la porc în România. Recunoașterea și suprapunerea nucleotidelor cu celelalte secvențe existente în baza de date a fost în proporție de 99-100% pentru ambele tulpini. Identitatea genetică (omologia genetică) dintre secvențele identificate în România și cele existente în baza de date a fost de maxim 93% pentru FPR4 și maxim 90% pentru EF5.

În urma analizei filogenetice efectuate pentru secvența FPR4/România procentul maxim de omologie a fost de 93% cu tulpina HUN-E69 umană izolată din ser din Ungaria (Reuter.G și col., 2009) și HE-JAS3 izolată din ser uman din Japonia (Yamamoto,T., 2004).

Recunoaștere și suprapunere a poziției nucleotidelor de 100%, dar cu omologie genetică de 92% s-a observat față de patru tulpini suine izolate în Quebec, Canada (Ward J. și col.).

Marea majoritate a tulpinilor cu identitate genetică, de 92%, față de FPR4 provin din Japonia și Korea și se referă atât la tulpini din genotipul 3 de origine porcină cât și umană.

În ceea ce privește secvența EF5/România maximul de suprapunere și recunoaștere a nucleotidelor cu celelalte tulpini din baza de date a fost de 97%. Omologia genetică cu alte tulpini la nivelul secvenței terminale a ORF2 a virusului hepatitei E a fost de 90%, cu tulpina porcină swJR-N6 din Japonia.

O omogenitate de 89% prezintă cu tulpina umană 8210642 izolată din ser de la o persoană din sudul Franței (Kaba M., 2009).

Omogenitate de 88% se observă cu tulpini izolate de la suine din sistem intensiv din Mongolia (Lorenzo F.R. și col., 2007).

Cu o recunoaștere (query coverage) de 85% a secvenței EF5, se observă o omogenitate de 91% cu tulpina TLS41 de origine umană izolată în Franța (Legrand-Abravanel F. și col., 2009).

O suprapunere a secvențelor de 97% și o omogenitate de 88% se observă cu 3 tulpini identificate la oameni în Japonia, de către Tei S. și colaboratorii (2003) de la persoane (cu semne clinice de hepatită acută) ce s-au infectat cu virusul hepatitei E după consum de carne de căprioară.

Pentru o mai precisă identificare a diferențelor dintre cele două tulpinile izolate de la suinele domestice din România și tulpinile existente în bazele de date internaționale (NCBI) s-a realizat o aliniere a secvențelor cu identificarea modificărilor de la nivelul nucleotidelor.

Astfel au fost selectate un număr de 20 de secvențe ale proteinei capsidei (ORF2) a virusului hepatitei E cu origine suină și umană, existente în baza de date GenBank (NCBI). Toate tulpinile fac parte din genotipul 3 al HEV și au fost alinate pe o lungime de 341 nt a secvenței ce codifică proteina capsidei - ORF2 (5997 → 6341). Secvențele utilizate pentru comparare sunt reprezentate de 7 tulpini izolate din Mongolia de la suine, o tulpină suină din Coreea, 3 tulpini

identificate în România.

Majority	G	A	A	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A			
	110										120										130										140										150											
AB105903.1	A	A	A	T	C	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A			
AB107368.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A	
AB177363.1	G	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	A	T	A	T	A	C	T	A	G	T	A	
AB177364.1	G	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	A	T	A	T	A	C	T	A	G	T	A	
AB177365.1	G	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	A	T	A	T	A	C	T	A	G	T	A	
AB290032.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	Y	A	C	A	A	G	C	A	
AB290045.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	A	G	C	A	
AB290046.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	A	G	C	A	
AB290062.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	Y	A	C	A	A	G	C	A	
AB290064.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	A	G	C	A	
AB290077.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	A	G	C	A	
AB290091.1	G	A	A	C	C	T	A	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	A	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	A	G	C	A	
AB471948.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	A	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	T	A
AB471950.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	A	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	T	A
AB471951.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	A	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	A	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	T	A
DQ832262.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A	
DQ860008.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A	
DQ860011.1	A	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A	
EF530663.2	A	A	A	T	C	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A		
GQ385078.1	A	A	A	C	C	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	G	C	A			
EF5	G	A	A	T	T	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	T	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	C	A	C	A	G	T	A		
FPR4	A	A	A	T	C	T	G	A	C	A	C	C	C	G	G	G	A	A	C	A	C	T	A	A	C	A	C	C	C	C	G	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	A	T	A	C	C	A	G	C	A	

Alinierea celor 22 de tulpini la nivelul nucleotidelor 101 -150

În cazul secvenței 101-150 de nucleotide se observă identificare a patru modificări în cazul tulpinii EF5 față de secvența majoritară și de 3 nucleotide diferite în cazul tulpinii FPR4. Nucleotida 117 (timină) din cadrul secvenței tulpinii EF5 este complet diferită față de celelalte 21 tulpini din aliniere unde este reprezentată de adenină.

Majority	C	A	G	C	C	C	G	C	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
	160										170										180										190										200									
AB105903.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	Y	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB107368.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C		
AB177363.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	G	A	C	T	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T		
AB177364.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	G	A	C	T	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T		
AB177365.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	G	A	C	T	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T		
AB290032.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290045.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290046.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290062.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290064.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290077.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB290091.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	C	G	G	T	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
AB471948.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T	
AB471950.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T	
AB471951.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	T	
DQ832262.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	A	C	T	T	A	C	T	
DQ860008.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	A	C	T	T	A	C	T	
DQ860011.1	C	A	G	C	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	T	G	G	G	A	C	C	G	C	T	G	A	A	C	T	T	A	C	T	
EF530663.2	C	A	G	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	C	G	A	T	G	G	G	A	C	T	G	C	T	G	A	G	C	T	T	A	C	C	
GQ385078.1	C	A	G	C	A	C	C	G	T	C	A	C	C	G	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	G	G															

Majority A C C A C A G C A G C C A C G C G T T T T A T G A A G G A T C T G C A T T T T A C T G G C A C G A A

210 220 230 240 250

AB105903.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	A	C	A	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A						
AB107368.1	A	C	C	A	C	A	C	G	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	T	A	C	T	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A		
AB177363.1	A	C	C	A	C	G	G	C	C	C	A	C	G	C	C	A	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
AB177364.1	A	C	C	A	C	G	G	C	C	C	A	C	G	C	C	A	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
AB177365.1	A	C	C	A	C	G	G	C	C	C	A	C	G	C	C	A	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
AB290032.1	A	C	C	A	C	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A						
AB290045.1	A	C	C	A	C	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A						
AB290046.1	A	C	C	A	C	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A						
AB290062.1	A	C	C	A	C	Y	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A					
AB290064.1	A	C	C	A	C	C	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A					
AB290077.1	A	C	C	A	C	Y	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A					
AB290091.1	A	C	C	A	C	T	G	G	C	A	G	C	C	A	C	C	G	C	G	T	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	C	T	G	G	C	A	C	A	A	A						
AB471948.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	A	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
AB471950.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	A	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
AB471951.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	A	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A					
DQ832262.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A	
DQ860008.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A
DQ860011.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	T	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A
EF530663.2	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	A	C	C	T	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A
GQ385078.1	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	A	C	C	T	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A
EF5	A	C	C	A	C	A	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	A	C	C	T	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A
FPR4	A	C	C	A	C	T	G	C	A	G	C	C	A	C	C	A	C	A	C	C	G	T	T	A	T	G	A	A	G	G	A	T	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	A	C	T	T	T	A	C	T	G	G	C	A	C	G	G	A	A

*Alinierea celor 22 de tulpini la nivelul
nucleotidelor 201 -250*

Din analiza celor 250 de nucleotide aliniate se observă că modificările apărute la nivelul celor două tulpini identificate la suinele din România sunt complet distincte ca poziție și ca număr.

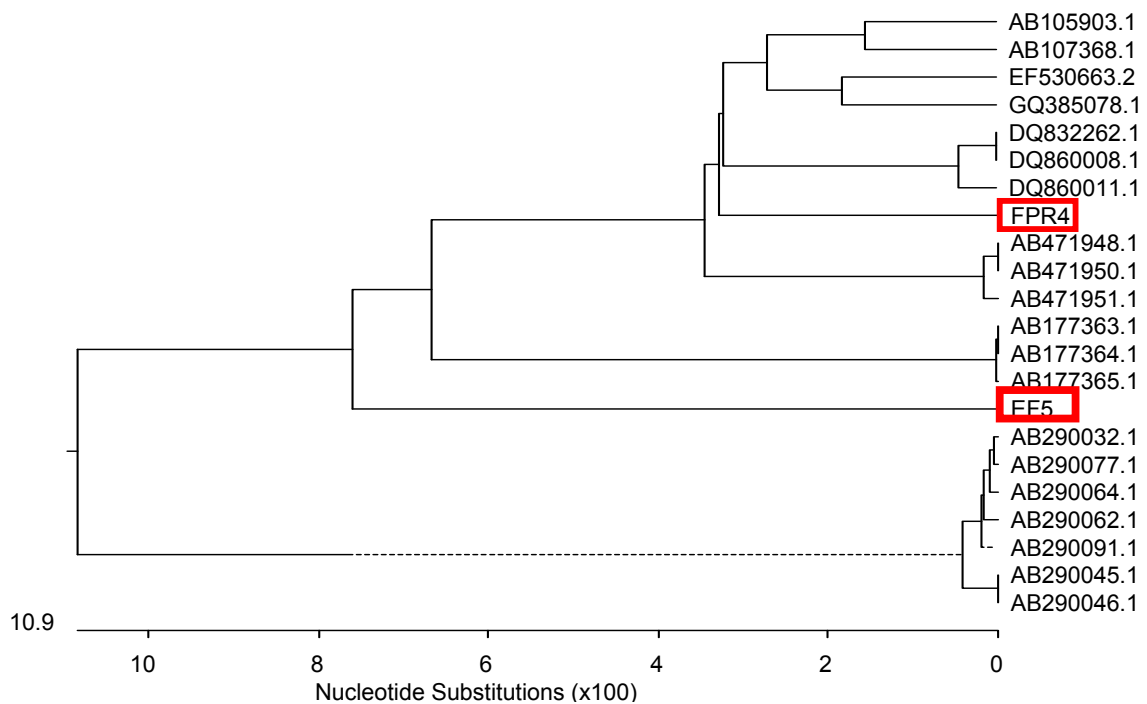
Majority C G G C G T T G G T G A G G T G G G C C G T G G T A T C G C T C T G A C A T T G T T T A A T C T T G

260 270 280 290 300

AB105903.1	Y	G	G	T	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	G	G	G	T	C	G	T	G	G	C	A	T	C	G	C	Y	C	T	G	A	C	A	T	T	G	T	T	T	A	A	T	C	T	C	G				
AB107368.1	C	G	G	T	T	G	T	G	A	G	G	T	G	G	G	T	C	G	T	G	G	C	A	T	C	G	C	T	C	T	G	A	C	A	T	T	T	G	T	T	T	A	A	T	C	T	T	G						
AB177363.1	C	G	G	A	G	T	T	G	G	A	G	A	G	G	T	G	G	G	C	C	G	T	G	G	C	A	T	T	G	C	T	C	T	R	A	C	G	T	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G					
AB177364.1	C	G	G	A	G	T	T	G	G	A	G	A	G	G	T	G	G	C	C	G	T	G	G	C	A	T	T	G	C	T	C	T	R	A	C	G	T	T	G	T	T	T	A	A	T	C	T	T	G					
AB177365.1	C	G	G	A	G	T	T	G	G	A	G	A	G	G	T	G	G	C	C	G	T	G	G	C	A	T	T	G	C	T	C	T	R	A	C	G	T	T	G	T	T	T	A	A	T	C	T	T	G					
AB290032.1	T	G	G	G	S	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290045.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290046.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290062.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290064.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290077.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB290091.1	T	G	G	G	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	T	A	T	C	G	C	T	C	T	A	A	C	T	T	T	A	A	T	C	T	T	T	G							
AB471948.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	T	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G	
AB471950.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	T	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G	
AB471951.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	T	G	C	C	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G	
DQ832262.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	C	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	C	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G
DQ860008.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	C	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	C	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G
DQ860011.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	C	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	C	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G
EF530663.2	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	C	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	T	G	C	T	C	T	G	A	C	A	T	T	T	T	A	A	T	C	T	T	G	
GQ385078.1	C	G	G	C	G	T	T	G	G	T	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	C	G	T	G	G	T	C	G	T	G	A	T	T	G	C	T	C	T	G	A	C	A	C	T	G	T	T	A	A	T	C	T	T	G
EF5	T	G	G	C	G																																																	

Din această reprezentare procentuală a diferențelor dintre tulpinile izolate de la suine din România și tulpinile existente în bazele de date internaționale se observă că divergența cea mai mare (17,5%) se înregistrează între tulpina EF5 și tulpina suină identificată în Japonia (AB107368.1), iar cea mai redusă (6.3%) se observă în cazul tulpinii FPR4 cu tulpina umană din Ungaria, cea suină din Canada și din Japonia. Pentru tulpina EF5 valorile procentuale ale divergenței nucleotidelor variază de la 12,1% la 17,5% ceea ce denotă o diferență crescută din punct de vedere filogenetic.

Diferența exprimată procentual între secvențele celor două tulpini: EF5 și FPR4 identificate în cele două ferme din România este de 16.7%, ceea ce evidențiază o circulație de tulpini virale HEV distincte în populațiile de suine din țara noastră, demonstrând o heterogenitate a acestora.



Arborele filogenetic realizat pentru o secvență de 341 nucleotide a regiunii ORF2 a virusului hepatitei E

În urma analizei arborelui filogenetic realizat pentru 20 de tulpini de virusul hepatitei E suine și umane din genotipul 3 și cele două tulpini suine secvențiate în cadrul cercetărilor întreprinse în fermele din România se observă asemănarea mai mare a tulpinii FPR4 cu tulpinile suine izolate în Canada și Japonia și inclusiv cu tulpina de origine umană identificată în Ungaria, cu care formează o ramură comună.

Genotipul 3 al virusul hepatitei E este aproape ubicvitar în fermele de porcine din Europa, America de nord și Asia, fiind responsabil de apariția de cazuri sporadice la om în Europa, suinele reprezentând o sursă potențială de transmitere zoonotică a infecției.