

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΤΟΥ
ΑΓΡΙΟΧΟΙΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε
ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

ΚΑΤΣΟΓΙΑΝΝΟΥ ΕΛΕΝΗ

Μελέτη συσχέτισης του γενετικού προτύπου του αγριόχοιρου και του ιού της
Ηπατίτιδας Ε σε δείγματα ήπατος στην Ελλάδα

Study of correlation of wild boar's genetic pattern and
Hepatitis E virus in liver samples in Greece

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαμούρης Ζήσης,

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπιλλίνης Χαράλαμπος,

Καθηγητής Ιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κατερίνα Μούτου,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών Ζήση Μαμούρη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Ιολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χαράλαμπο Μπιλλίνη καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, κ. Κατερίνα Μούτου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κώστα Σταμάτη για την βοήθεια που μου πρόσφερε με την καθοδήγησή του στο εργαστήριο της Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καλό μου φίλο Δημήτρη Χατζόπουλο, που βοήθησε ιδιαίτερα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια της Παθολογικής Κλινικής, του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αθανασίου Λαμπρινή, που με τον δικό της τρόπο με στήριξε από την πρώτη στιγμή που αποφάσισα να ξεκινήσω το συγκεκριμένο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Τέλος, χωρίς την στήριξη της οικογενείας μου, δεν θα μπορούσα να τα καταφέρω. Για το λόγο αυτό, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην μητέρα μου Αναστασία και στα αδέρφια μου Ταξιάρχη και Χαρά, καθώς και στην μικρή μου αδερφή Ιωάννα, που πάντα είναι δίπλα μου, με υποστηρίζει και με αντέχει.

Στον πατέρα μου, Γιώργο, που θα ήθελα να είναι εδώ κοντά μου

και στην μητέρα και τα αδέρφια μου, που πάντα είναι

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	10
1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
2 ABSTRACT	12
KEYWORDS	12
4 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
4.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε	13
4.1.1 Ταξινόμηση	13
4.1.2 Μορφολογία του Ιού	15
4.1.3 Παθογένεια	16
4.1.4 Διάγνωση	16
4.1.5 Η ηπατίτιδα Ε του Ανθρώπου	16
4.1.6 Η ηπατίτιδα Ε στα ζώα	18
4.1.7 Η ηπατίτιδα Ε στο χοίρο και τον αγριόχοιρο	20
4.1.8 Η ηπατίτιδα Ε ως ζωοανθρωπονόσος	21
4.2 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	23
4.2.1 Ανοσολογική Απόκριση του Οργανισμού	23
4.2.2 Γενικά για το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας	26
4.2.3 Δομή του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας	27
4.2.4 Η λειτουργία του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας	29
4.2.5 Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας του Αγριόχοιρου	31
5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36

5.1	Σκοπός της μελέτης	36
5.2	Υλικά και Μέθοδοι	36
5.2.2	Απομόνωση RNA	37
5.2.2.1	Απομόνωση ολικού RNA	37
5.2.2.2	Επιλογή του RNA στόχου	37
5.2.2.3	Εφαρμογή της μεθόδου αντίστροφης μεταγραφάσης- αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε ένα βήμα	38
5.2.3	Απομόνωση DNA	41
5.2.3.1	Αντιδραστήρια	41
5.2.4.1	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα	44
5.2.4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	44
5.2.4.3	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	47
5.2.4.4	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	48
5.2.4.6	Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)	50
5.2.4.7	Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP	52
5.2.4.8	Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης	52
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
6.1	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HEV	53
6.2	Απομονωση DNA	54
6.3	PCR	55
6.4	SSCP	56
6.5	Αλληλούχηση	56
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Sus scrofa</i> (από http://animaldiversity.ummz.umich.edu)	33
Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της RT-PCR	37
Πίνακας 3: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της RT-PCR.	39
Πίνακας 4: Μέγεθος προϊόντος PCR (με τους εκκινητές) και ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων του MHC στα <i>Sus Scrofa</i>	45
Πίνακας 5: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στο είδος <i>Sus scrofa</i>	45
Πίνακας 6: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος <i>Sus scrofa</i>	46
Πίνακας 7: Σύσταση πηκτικής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στα είδη <i>Lepus europaeus</i> και <i>Sus scrofa</i>	46
Πίνακας 8 : Σύσταση πηκτικής πολυακρυλαμίδης 8%.....	50
Πίνακας 9: Αποτελέσματα RT- PCR του HEV	53
Πίνακας 10: Οι απλότυποι των γονιδίων DRB και DQA.....	57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA.....	54
Εικόνα 2: ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του εξωνίου 2 του DRB1.....	55
Εικόνα 3: ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του εξωνίου 2 του DQA.....	55
Εικόνα 4-5: Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP DQA (A) και DRB1(B)...	56

1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός της Ηπατίτιδας Έ είναι υπεύθυνος για εξάρσεις οξείας ηπατίτιδας στον άνθρωπο. Ανήκει στο γένος *Hepevirus* της οικογένειας *Hepeviridae* και είναι το μοναδικό είδος του γένους. Ο ιός κατηγοριοποιείται σε 4 γονοτύπους, τους HEV1, HEV 2, HEV 3 και τον HEV 4. Οι δύο πρώτοι προσβάλλουν κυρίως τον άνθρωπο, ενώ οι άλλοι δύο τον άνθρωπο και διάφορα ζωικά είδη. Ο HEV είναι ένας μικρός σε μέγεθος (27-34nm) και χωρίς περίβλημα ιός, ο οποίος περιέχει ένα θετικής κατεύθυνσης μονόκλωνο RNA γονιδίωμα, μεγέθους περίπου 7,2 kb.. Ο ιός HEV μεταδίδεται από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της κατάποσης μολυσμένου από τον ιό νερού ή κρέατος. Η απέκκριση του γίνεται μέσω των κοπράνων. Ένας από τους κύριους φορείς του ιού είναι ο χοίρος και πιθανόν και ο αγριόχοιρος. Ο οργανισμός, ως απάντηση στην λοίμωξη παράγει τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν πεπτιδικά τμήματα του μικροοργανισμού, μόνο όταν αυτά παρουσιάζονται από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Τα πιο αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι τα δενδρικά κύτταρα, πλούσια σε τάξης II MHC. Κάθε ζώο έχει μόνο ένα συγκεκριμένο αριθμό αλληλομόρφων MHC, και τα αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται σε ορισμένα μόρια MHC. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η παρουσία του ιού σε δείγματα αγριόχοιρων στην Ελλάδα με RT-PCR και με την μέθοδο PCR-SSCP προσδιορίστηκε ο αριθμός των αλληλομόρφων των γονιδίων DRB1 και DQA. Δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα στον ιό της Ηπατίτιδας Ε. Όσον αφορά τα γονίδια DQA και DRB, παρατηρήθηκε σχετικά υψηλό ποσοστό ποικιλομορφίας, ενώ τα ποσοστά ετεροζυγωτίας ήταν χαμηλά.. Από την μελέτη αυτή δεν προκύπτει κάποια συσχέτιση μεταξύ του γενετικού προτύπου του αγριόχοιρου και του ιού της Ηπατίτιδας Ε.

ΛΕΞΕΙΣ ΕΥΡΕΤΗΡΙΑΣΗΣ

Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας, ιός της Ηπατίτιδα Ε, αγριόχοιρος

2 ABSTRACT

The hepatitis E virus is responsible for acute hepatitis exacerbations in humans. It belongs to the genus *Hepevirus* of *Hepeviridae* family and is the only species of that genus. The virus is categorized in 4 genotypes, HEV1, HEV 2, HEV 3 and HEV 4. The first two genotypes are mainly affecting human, while the other two, affect both human and animals. HEV is a small (27-34nm), non-enveloped virus that has a positive-sense, single-stranded, 7,2 kb, RNA genome. The HEV virus is transmitted from animals to humans through ingestion of contaminated from virus, water or meat. The excretion is via the faeces. One of the main carriers of the virus is swine and probably the wild boar. The body, in response to the infection, produces T cells, which recognize peptide fragments of the microorganism only when they are presented by the major histocompatibility complex (MHC). The most efficient antigen presenting cells are dendritic cells, which are rich in class II MHC. Each animal has only a certain number of MHC alleles, and antigenic peptides bind to certain MHC molecules. This study examined the presence of the virus in wild boar samples in Greece by RT-PCR and by PCR-SSCP method determined the number of alleles of DRB1 and DQA genes. The samples were HEV negative. Regarding DQA genes and DRB, was observed relatively high rate variability, whereas heterozygosity rates were low. At this study, there is no correlation between the genetic pattern of wild boar and the Hepatitis E virus..

KEYWORDS

Major histocompatibility complex, MHC, Hepatitis E virus, wild boar

4 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε

4.1.1 Ταξινόμηση

Ο ιός της Ηπατίτιδας Ε (Hepatitis E virus, HEV) είναι το μοναδικό είδος του γένους *Hepevirus* της οικογένειας *Hepeviridae*. Η πρώτη φορά που ανιχνεύθηκε ήταν το 1983 από τους Balayan et al σε έναν ασθενή με οξεία non-A, non-B ηπατίτιδα (Emerson and Purcell, 2003), ενώ για πρώτη φορά κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε από τους Tam et al το 1991. Στην αρχή είχε ταξινομηθεί στην οικογένεια *Picornaviridae*, στη συνέχεια στην οικογένεια *Caliciviridae*, από το 1988-1998 λόγω της ομοιότητάς του στη μορφολογία και την οργάνωση του γονιδιώματός του με αυτά των καλυκοϊών (Worm, 2002, Purcell and Emerson, 2003). Μετά, όμως, την φυλογενετική ανάλυση σε μη δομικές περιοχές του ιού, διαπιστώθηκε ότι δεν μπορεί να ανήκει σ' αυτήν την οικογένεια. Το 1998 εντάχθηκαν στο γένος *Hepatitis E-like viruses*, χωρίς να έχει δοθεί ονομασία στην οικογένεια στην οποία ανήκει. Το 2004 άλλαξε η ονομασία του γένους σε *Hepevirus* και το 2009 εντάχθηκε στην οικογένεια *Hepeviridae*. Στην οικογένεια *Hepeviridae*, από το 2009, ανήκει και ένα ακόμα είδος, ο ιός της Ηπατίτιδας Ε των ορνίθων, το γένος του οποίου δεν έχει καθοριστεί ακόμα σύμφωνα με το International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Παλαιότερα, η κατηγοριοποίηση των διαφόρων στελεχών του HEV, γινόταν σύμφωνα με τη μερική αλληλούχιση του γονιδιώματός τους. Για παράδειγμα, αν 2 τύποι HEV διέφεραν πάνω από 20% της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ORF2, τότε ανήκανε σε διαφορετικό γονότυπο. (Worm HC, 2002). Σύμφωνα με το μοριακό χαρακτηρισμό των διαφόρων στελεχών του HEV, ο ιός κατηγοριοποιείται σε 4 γονότυπους. Οι HEV1 και HEV2 προσβάλλουν κυρίως

τον άνθρωπο, ενώ οι HEV3 και HEV4, τον άνθρωπο και τα διάφορα ζωικά είδη. Στον HEV 1 ανήκουν τα στελέχη που προκαλούν εξάρσεις οξείας ηπατίτιδας στον άνθρωπο, στην Ασία. Στον HEV2 ανήκουν μερικά στελέχη που απαντώνται στην Αφρική και ένα στο Μεξικό, τα οποία προκαλούν και αυτά εξάρσεις οξείας ηπατίτιδας στον άνθρωπο. Στον HEV 3 ανήκουν στελέχη που έχουν απομονωθεί από χοίρο και αγριόχοιρο, ελάφι, αρουραίο, κουνέλι και mongoose αλλά και στον άνθρωπο, όπως και ο HEV 4 που έχει βρεθεί στο χοίρο, τον αγριόχοιρο και περιστασιακά στην αγελάδα και το πρόβατο (Wang Y et al,2010, Hu GD et al,2010).

Κάποιοι, όμως, θεωρούν ότι κάποια στελέχη από αγριόχοιρους και κουνέλια θα έπρεπε να αποτελούν διαφορετικό γονότυπο ή υπότυπο (subtype) (Zhao c, 2009, Geng Y, 2011, Takahashi M, 2011, Bouquet J 2012), και άλλοι ότι τα στελέχη των ορνίθων, των νυχτερίδων και των αρουραίων θα έπρεπε να ανήκουν στο ίδιο γένος και ο ιός της πέστροφας σε ξεχωριστό γένος (Smith et al, 2013). Τελευταία πρόταση ταξινόμησης έγινε από τους Smith et al το 2014, οι οποίοι προτείνουν η οικογένεια να χωριστεί σε γένη: Orthohepevirus και Piscihepevirus. Στο πρώτο να ανήκουν τα είδη του ιού από τα θηλαστικά και τις όρνιθες και στο δεύτερο της πέστροφας. Επίσης προτείνουν στο πρώτο γένος να υπάρχουν 4 είδη. Το Orthohepevirus A που θα αποτελείται από στελέχη που προσβάλλουν τον άνθρωπο, το χοίρο, τον αγριόχοιρο, το ελάφι, το κουνέλι, την καμήλα και το mongoose, το Orthohepevirus B, από τα στελέχη των ορνίθων, το Orthohepevirus C από στελέχη του αρουραίου, greater bandicoot, Asian musk shrew, ferret and mink και το Orthohepevirus D από τις νυχτερίδες.

Σύμφωνα με τον Okamoto H. στις περισσότερες χώρες εμφανίζεται ένας μόνο γονότυπος στο σύνολο των ασθενών, ενώ στις χώρες όπου απαντώνται περισσότεροι γονότυποι, ο HEV 1, είναι ο ένας από αυτούς. Υπάρχουν τουλάχιστον 24 υπότυποι, 5 για τον HEV1, 2 για τον HEV2, 10 για τον HEV3 και 7 για τον HEV4 (Ling Lu, 2005)

4.1.2 Μορφολογία του Ιού

Ο HEV είναι ένας μικρός σε μέγεθος (27-34nm) και χωρίς περίβλημα ιός, ο οποίος περιέχει ένα θετικής κατεύθυνσης μονόκλωνο RNA γονιδίωμα, μεγέθους περίπου 7,2 kb (Emerson and Purcell, 2003). Το γονιδίωμά του είναι καλυμμένο στο 5' άκρο και πολυαδενυλιωμένο στο 3' άκρο. Περιέχει 3 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί τη μεγαλύτερη πρωτεΐνη, μεγέθους 1693 αμινοξέων που περιλαμβάνει λειτουργικά μοτίβα και τομείς που παρίστανται σε μη-δομικές πρωτεΐνες άλλων RNA ιών θετικής κατεύθυνσης. Αυτές οι λειτουργικές περιοχές περιλαμβάνουν την μεθυλοτρανσφεράση, Y- domain, papain-like πρωτεάση, την HVR περιοχή, macro domain, RNA ελικάση και RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Το ORF2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του ιϊκού καψιδίου μεγέθους 660 αμινοξέων, η οποία είναι υπεύθυνη για την συναρμολόγηση του ιού, την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα στόχους και την ανοσογονικότητα. Το ORF3 που επικαλύπτει το ORF2, κωδικοποιεί μία μικρή πρωτεΐνη 114-123 αμινοξέων που εμπλέκεται στη μορφογένεση και απελευθέρωση του ιού (Smith, 2014, Nassim Kamar et al, 2012). Το ORF1 περιέχει μία υπερμεταβλητή περιοχή (hypervariable region (HVR)) με μέγεθος από 557 μέχρι 641 αμινοξέα. Η HVR είναι μία πλούσια σε προλίνη αλληλουχία που βρίσκεται ανάμεσα στο N- άκρο της X περιοχής και στο C- άκρο της περιοχής της papain-like πρωτεάσης. Η HVR ποικίλει και σε μέγεθος και στην αλληλουχία ανάμεσα στα διάφορα στελέχη του HEV. (Kumar , 2013). Έρευνες έχουν δείξει ότι μικρές διαγραφές στην περιοχή αυτή δεν επηρεάζουν τη μολυσματικότητα του ιού (Pudupakam,2011, Pudupakam, 2009).

4.1.3 Παθογένεια

Ο ιός πολλαπλασιάζεται στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και από εκεί μεταφέρεται στα κόπρανα, μέσω της χολής, όπου βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ παράλληλα εμφανίζεται ιαιμία. Η ιαιμία και η αποβολή του ιού από τα κόπρανα παρατηρείται πριν εμφανιστούν ανωμαλίες στο ήπαρ και τη χυμική ανοσολογική απόκριση. Το ήπαρ εμφανίζει εστίες νέκρωσης και μέτρια φλεγμονή ενώ συχνή είναι και η χολοστατική ηπατίτιδα (Emerson and Purcell, 2003).

4.1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση της ηπατίτιδας Ε γίνεται με τη χρήση ορολογικών τεστ που ανιχνεύουν την IgM σε περιστατικά με οξεία ηπατίτιδα και ανίχνευση IgG σε χρόνια περιστατικά ενώ για την επιβεβαίωση της ασθένειας απαιτείται η απομόνωση του ιού ή/και η αλληλούχισή του με την χρήση PCR. (Emerson and Purcell, 2003).

4.1.5 Η ηπατίτιδα Ε του Ανθρώπου

Η ηπατίτιδα Ε προκαλεί οξεία ηπατίτιδα, κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες της Ασίας, Αφρικής και Λατινικής Αμερικής όπου οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι οι βέλτιστες, αλλά και σε πολλές βιομηχανικές χώρες των Ηνωμένων Πολιτειών και της Ευρώπης (Meng, 2008). Χρόνια ηπατίτιδα έχει παρατηρηθεί σε άτομα που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία λόγω μεταμόσχευσης οργάνων, που προσβλήθηκαν από τον γενότυπο 3 του HEV (Haagsma,2009). Οι επιδημίες συνήθως σχετίζονται με κατανάλωση νερού μολυσμένο με τον HEV, ενώ οι παράγοντες επικινδυνότητας που σχετίζονται με ενδημίες είναι συνήθως

δύσκολο να προσδιοριστούν παρόλο που η κατανάλωση οστρακοειδών, κρέατος ζώων και η άμεση επαφή με τα μολυσμένα ζώα φαίνεται να σχετίζονται με σποραδικές περιπτώσεις οξείας ηπατίτιδας Ε σε αναπτυσσόμενες και αναπτυγμένες χώρες (Meng, 2002, 2003; Emerson and Purcell, 2003).

Παρόλο που η θνησιμότητα από την Ηπατίτιδα Ε είναι λιγότερο από 1% στον γενικό πληθυσμό, μπορεί να φτάσει το 28% στις προσβεβλημένες έγκυες γυναίκες κυρίως κατά το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τους (Emerson and Purcell, 2003). Μία στις τρεις περιπτώσεις προσβολής εγκύου γυναίκας, υπάρχει κάθετη μετάδοση του ιού στο έμβρυο, ενώ έχει αναφερθεί και η παρουσία του ιού στο πρωτόγαλα (Chibber et al, 2004). Η μετάδοση του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια, αν και έχουν αναφερθεί περιστατικά μετάδοσης του μέσω μετάγγισης αίματος (Matsubayashi K. et al, 2008, Arankalle V. et al, 2000). Η ηπατίτιδα Ε στον άνθρωπο είναι δοσο-εξαρτώμενη. (Yugo, 2013) Αυτό σημαίνει ότι ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε υψηλή δόση του ιού εμφανίζουν συνήθως συμπτώματα, ενώ όσοι εκτεθούν σε χαμηλότερες δόσεις του ιού, έχουν υποκλινική λοίμωξη (Emerson and Purcell, 2003).

Ο χρόνος επώασης του ιού είναι 2 με 10 εβδομάδες σε φυσικά περιστατικά και 4-5 εβδομάδες σε πειραματικό επίπεδο. Σύμφωνα με έρευνες σε πρωτεύοντα υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της δόσης του ιού που χορηγήθηκε και της βαρύτητας της ασθένειας και αντίστροφη σχέση με το χρόνο επώασης (Tsarev, 1992). Σύμφωνα με τους Kumar et al, είναι πιθανό ο υπότυπος του ιού να σχετίζεται με τη βαρύτητα της ασθένειας.

Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι ασθενείς είναι ίκτερος, ηπατομεγαλία και ανορεξία ενώ πιο σπάνια εμφανίζουν ευαισθησία στην κοιλιακή χώρα ή πόνο, ναυτία, έμετο και πυρετό (Emerson and Purcell, 2003).

4.1.6 Η ηπατίτιδα Ε στα ζώα

Ο HEV έχει απομονωθεί από διάφορα ζωικά είδη, όπως χοίρους, αγριόχοιρους, όρνιθες, ελάφια και mongoose, κουνέλια, νυχτερίδες, τρωκτικά (Zhao *c*, 2009, Drexler, 2012, NIDAIRA, 2012, Huang, 2004, Nakamura *et al.*, 2006, Geng *et al.*, 2011, Purcell, 2011). Πρόσφατα απομονώθηκαν και από άλλα είδη ζώων, όπως moose (Lin, J. *et al*, 2014), το mink (Krog *et al*, 2013), την αλεπού (Bodewes *et al*, 2013), το ferret (Li *et al*, 2014), την καμήλα (Woo *et al*, 2014), την αγελάδα (Wang Y *et al*, 2010), και το πρόβατο (Hu GD *et al*, 2010). Σε άλλα είδη (αίγες, άλογα, γάτες, σκύλοι) έχει ανιχνευτεί IgG anti-HEV (Meng, 2006, 2008), χωρίς όμως να έχει απομονωθεί ο ιός ή να έχει αλληλουχηθεί ο ιός που απομονώθηκε ώστε να προσδιοριστεί η ταυτότητά του. Φαίνεται, πάντως, τα τρωκτικά να παίζουν κάποιον ρόλο στην μετάδοση του ιού, δεδομένου ότι έρχονται συχνά σε επαφή με τους ανθρώπους σε αστικές και αγροτικές περιοχές.

Ο ιός HEV των ορνίθων είναι γενετικά όμοιος με τον HEV των θηλαστικών με διατηρημένη την οργάνωση του γονιδιώματος και της λειτουργίας παρόλο την διαγραφή αλληλουχίας 600 bp. Η πρωτεΐνη του καψιδίου του περιέχει μοναδικούς και διατηρημένους επιτόπους σε σύγκριση με την πρωτεΐνη του καψιδίου του ανθρώπινου και του χοίρειου ιού HEV (Haqshenas, G., 2001, Huang, F.F., 2002). Υπάρχουν δύο σύνδρομα που παρατηρούνται σε όρνιθες που προσβάλλονται από διαφορετικά στελέχη του ιού HEV των ορνίθων. Αυτά είναι τα Hepatitis – Splenomegaly (HS) και Big Liver and Spleen Disease (BLSD). Στις Ηνωμένες Πολιτείες το 71% εκτροφών ορνίθων και το 30% των ορνίθων είναι θετικά στον ιό.

Τα ελάφια λειτουργούν και ως φορείς του ιού αλλά μπορούν να προσβάλλουν και τον άνθρωπο άμεσα. Στην Ουγγαρία τα Ευρωπαϊκά ζαρκάδια έχουν ενοχοποιηθεί ως φορείς του ιού και στην Ολλανδία το 5% των κόκκινων ελαφιών βρέθηκαν θετικά σε αντισώματα κατά του ιού. Στο Βόρειο Μεξικό, το

62,7% των White -Tailed deer ήταν θετικά σε αντισώματα κατά του ιού(Medrano,C., 2012). Στην Ιαπωνία το 35 % των ελαφιών ήταν θετικά σε αντισώματα κατά του HEV, με θετική συσχέτιση με τον ιό που προσβάλλει τον άνθρωπο και σχεδόν ίδιος στην αλληλουχία με στελέχη που απομονώθηκαν από αγριόχοιρους της περιοχής(Yugo M. D, 2013).

Στα μηρυκαστικά, παρόλο που δεν έχει απομονωθεί ο ιός, υπάρχουν πιθανότητες να προσβάλλονται και αυτά. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι σε διάφορες έρευνες υπάρχουν θετικά αποτελέσματα στα αντισώματα κατά του ιού. Στην Αίγυπτο, 11 % των αγελάδων, 14 % των βουβαλιών, 4.4 % των προβάτων και 9.4 % των αιγών ήταν θετικά για αντισώματα κατά του HEV(EI-Tras, W.F., 2012). 4.4 %- 6.9% στις αγελάδες στην Ινδία, 1.4 % στις αγελάδες στην Βραζιλία, ενώ στην Κίνα ποικίλει από 6 -93 % στις αγελάδες και 10 -12 % στα πρόβατα. (Arankalle,V.2001, Vitral, C.L., 2005)

Στους αρουραίους, η οροθετικότητα ποικίλει. Στη Λουζιάννα 44%, Χαβάη 90%, Ιαπωνία 13%, Κίνα 23,3%. Στην Ινδονησία 18,1 % των αρουραίων ήταν θετικοί στα αντισώματα κατά του HEV και 14,7 % θετικά στην ανίχνευση του RNA του ιού. Ο γονότυπος 3 του HEV έχει προσδιοριστεί σε αρουραίους και γι' αυτό θεωρείται πιθανό να μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο παρόλο που πειραματικά φαίνεται να είναι ανθεκτικά στον γενότυπο 3 (Li,W.,2013, Mulyanto, 2013, Lack,J., 2012, Li,T.C, 2013)

Τα κουνέλια, πειραματικά, είναι ευαίσθητα στον γενότυπο 4 του HEV, ενώ έχει απομονωθεί από αυτά ο γενότυπος 3 (Izopet,J., 2012, Geng, Y., 2010, Cossaboom,C., 2012), καθιστώντας τα και αυτά υπεύθυνα για την μετάδοση του ιού στον άνθρωπο. Ο ιός των κουνελιών είναι γενετικά και αντιγενετικά παρόμοιος με τα είδη του ιού που προσβάλλει άλλα θηλαστικά. Στην Κίνα, σε εκτροφή κουνελιών, ο επιπολασμός είναι 57% και στην Βιρτζίνια σε δύο εκτροφές, 36,5%, ενώ το RNA του ιού προσδιορίστηκε στο 7,5%, 16,5% και στο

15,3% αντίστοιχα (Geng, Y., 2010, Cossaboom,C., 2012). Στη Γαλλία, ο ιός προσδιορίστηκε στο 7,0% των εκτρεφόμενων κουνελιών και στο 23,0% των άγριων (Izopet,J., 2012)

Στα mongoose η οροθετικότητα κυμαίνεται από 8 έως 23%, στην Ιαπωνία, και έχει ανιχνευτεί ο γενότυπος 3 του ιού(Li,T.C, 2006, Nakamura,M,2006). Στην Ολλανδία, ο ιός που προσβάλλει τα ferret είναι κατά 72,3% όμοιος ως προς την αλληλουχία του, με τον ιό που προσβάλλει τον αρουραίο(Raj. V., 2012). Στη πέστροφα, ο ιός μοιράζεται μόνο το 13- 27% της αλληλουχίας του με τα άλλα στελέχη του ιού που προσβάλλουν τα θηλαστικά και τις όρνιθες(Batts,W ,2011).

4.1.7 Η ηπατίτιδα Ε στο χοίρο και τον αγριόχοιρο

Ο HEV των χοίρων είναι παγκοσμίως διαδεδομένος, ανεξάρτητα από το αν ο ιός είναι ενδημικός στους αντίστοιχους ανθρώπινους πληθυσμούς (Meng, 2003). Οι χοίροι συνήθως μολύνονται στην ηλικία των 2-3 μηνών, η ιαμμία διαρκεί περίπου 1- 2 εβδομάδες, αποβάλλουν τον ιό με τα κόπρανα για περίπου 3 – 7 εβδομάδες και συνήθως είναι ασυμπτωματικοί. Οι περισσότεροι ενήλικοι χοίροι δεν αποβάλλουν τον ιό, παρόλο που είναι θετικοί για IgG- anti HEV. Η μετάδοση του ιού φαίνεται να γίνεται μέσω κοπράνων – στόματος, αφού τα κόπρανα μολυσμένων χοίρων περιέχουν μεγάλη ποσότητα ιϊκού φορτίου. Πιστεύεται ότι η μόλυνση των χοίρων γίνεται με την άμεση επαφή με τους μολυσμένους χοίρους ή με την κατανάλωση νερού ή τροφής που έχει επιμολυνθεί με κόπρανα (Bouwknegt et al., 2008).

Πρώτη φορά απομονώθηκε από τον χοίρο το 1997. Στην Ιαπωνία, το 93% των εκτροφών χοίρων ήταν θετικά στην ανίχνευση των αντισώματα κατά του HEV. Οι γονότυποι που απομονώθηκαν ήταν ο 3 ή ο 4 (Takahashi, M., 2011, Takahashi, M., 2013, Sato, Y., 2011, Takahashi,M., 2005). Στους αγριόχοιρους, ο επιπολασμός

κυμαίνεται από 4,5 – 34,3% των αντισωμάτων κατά του ιού και μεταξύ 1,1 -13,3% είναι τα θετικά στο RNA του ιού (Takahashi,M., 2013). Στη Ολλανδία, το 55% των εκτροφών ήταν θετικό στον ιό, ο οποίος βρέθηκε στα κόπρανα, ενώ στον Καναδά ήταν το 86,2 και το 47,1% στα κόπρανα και στον ορό αντίστοιχα (Leblanc, D., 2007, Rutjes, S.A., 2007). Στην Ισπανία, ο επιπολασμός των εκτροφών των αντισωμάτων ήταν 98%, στην Νέα Ζηλανδία 90%, στη Βραζιλία 81% (Pavio, N., 2010, Seminati,C., 2008, Garkavanko,O., 2001, Dos Santos, 2009). Στους αγριόχοιρους, το ποσοστό των αντισωμάτων κατά του ιού, κυμαίνεται από 17-50,3% και από αυτούς, περισσότεροι από το 25% ήταν θετικοί στην παρουσία του ιού σε Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία, Αυστραλία, Ουγγαρία (De Deus, N. 2008, Martelli, F., 2008, Kaba, M., 2010, Reuter, G.B., 2009, Schielke, A., 2009, Forgach, P., 2010). Στην Πολωνία, ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά του ιού, στους αγριόχοιρους είναι 44, 4%.

4.1.8 Η ηπατίτιδα Ε ως ζωοανθρωπονόσος

Ο ιός HEV είναι υπερ- ενδημικός σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες (Ινδία, Αίγυπτος, Μεξικό, Κίνα, κ.α.), όπου εμφανίζεται επιπολασμός στο 25% όλων των περιστατικών non- A non –B οξείας ηπατίτιδας ή έχει παρουσιαστεί ξέσπασμα ηπατίτιδας Ε σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών. Ο ιός HEV είναι ενδημικός όταν ο επιπολασμός είναι κάτω από 25% όλων των περιστατικών non- A non –B οξείας ηπατίτιδας. Είναι ενδημικός σε χώρες όπως της δυτικής Ευρώπης, των Ηνωμένων Πολιτειών, Νέα Ζηλανδία, Νότιας Αμερικής, σε αρκετές χώρες της Ασίας και Μέση Ανατολή (Teo C.G.,2009). Στην Ιαπωνία έχουν αναφερθεί σποραδικές ή ομαδικές περιπτώσεις οξείας ηπατίτιδας Ε μετά από κατανάλωση ωμού ή ατελώς μαγειρεμένου χοίρειου ήπατος. Μετά την αλληλούχιση του ιού από το ήπαρ των χοίρων, βρέθηκε ότι ο ιός ήταν ίδιος ή σχεδόν ίδιος με τους ιούς που απομονώθηκαν από τους ασθενείς

(Yazaki et al., 2003). Αντίστοιχα, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις οξείας ηπατίτιδας Ε μετά την κατανάλωση κρέατος αγριόχοιρου όπως το 2005 στην Ιαπωνία, με μία γυναίκα που μολύνθηκε από τον HEV και διαπιστώθηκε ότι ο ιός στο κρέας ήταν όμοιος με τον ιό στην γυναίκα κατά 99,95%. (Li et al., 2005b,) Άλλη περίπτωση είναι με 4 ασθενείς που κατανάλωσαν ατελώς μαγειρεμένο κρέας ελαφιού. Η αλληλούχισή τους έδειξε ότι ήταν όμοιοι κατά 99,7%. (Takahashi, 2004). Αυτά τα στοιχεία παρέχουν αρκετές αποδείξεις ότι η ηπατίτιδα Ε είναι ζωνόσος, και ότι οι χοίροι και οι αγριόχοιροι είναι οι αποθήκες του ιού. Στην Αμερική 2 στελέχη του ιού που απομονώθηκαν από 2 διαφορετικούς ασθενείς είχαν 92% ομοιότητα με στέλεχος του ιού των χοίρων (Erker, 1999)

Αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου φαίνεται να έχουν όσοι έρχονται σε επαφή με τους χοίρους και τους αγριόχοιρους, μιας και αυτοί είναι οι κύριες αποθήκες του ιού, όπως είναι οι χοιροτρόφοι και οι κτηνίατροι. Στις ΗΠΑ, οι κτηνίατροι των εκτροφών χοίρων, 27% οροθετικότητα έναντι του 16% του γενικού πληθυσμού. (Meng, X.J, 2002) Αντίστοιχα, στη Σουηδία, το 11% των κτηνιάτρων που ασχολούνται με τους χοίρους είναι θετικό, ενώ στους άλλους κτηνιάτρους είναι 6% και 2% στον γενικό πληθυσμό (Meng, X.J, 1999). Στη Μολδαβία, το 51% των κτηνοτρόφων με χοίρους είναι θετικό σε σύγκριση με το 25% των άλλων κτηνοτρόφων. Στη Βόρεια Καρολίνα, η οροθετικότητα είναι 4,5 φορές υψηλότερη στους κτηνοτρόφους με χοίρους, έναντι των άλλων (Withers, M, 2002).

Οι περιπτώσεις επιδημιών οφείλονται, κυρίως, στην κατανάλωση, μολυσμένου από τον ιό, νερού. Τόσο στις βιομηχανικές, όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, τα μη επεξεργασμένα λύματα, περιέχουν στελέχη του ιού HEV, που είναι αρκετά όμοια με αυτά που προσβάλλουν τον άνθρωπο (γενότυπος 1 και 2) ή άλλα ζώα (γενότυπος 3 και 4) (Clemente-Casares, P, 2003, Ippagunta, S.K, 2007, Jothikumar, N, 1993, Pina, S, 2000, Pina, S, 2003)

4.2 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

4.2.1 Ανοσολογική Απόκριση του Οργανισμού

Σε ένα ευαίσθητο είδος που μολύνεται από ένα συγκεκριμένο στέλεχος ενός ιού, υπάρχουν εντυπωσιακές διαφορές ανάμεσα στα άτομα, σε επίπεδο ανθεκτικότητας. Οι καθοριστικοί παράγοντες της μολυσματικότητας του ιού είναι συνήθως πολυγονιδιακοί και οι παράγοντες που καθορίζουν την ανθεκτικότητα/ ευαισθησία του ξενιστή είναι πολυπαραγοντικοί. (Ferren J. Frank, 1993). Μέσα στα άτομα ενός ευαίσθητου είδους, η ευαισθησία ποικίλει όχι μόνο λόγω γονιδιακής σύστασης αλλά και λόγω ηλικίας, διατροφής, στρες και άλλων παραγόντων.

Ο οργανισμός μπορεί να προστατευτεί από την εισβολή μικροοργανισμών μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, αναγνωρίζοντας και απαντώντας στα αντιγόνα. Τα αντιγόνα είναι πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων, ιών, βακτηρίων και μυκήτων. Το σώμα πρέπει να είναι σε θέση να αναγνωρίζει άμεσα τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν και να είναι σε θέση να γνωρίζει ότι αυτοί είναι ξένοι και επικίνδυνοι, ώστε να διεγερθεί μία ανοσοαντίδραση.

Η ανοσία του οργανισμού ενάντια διαφόρων λοιμωδών νοσημάτων, μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο ειδική. Η λιγότερο ειδική ανοσία, φυσική ανοσία, είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι της λοίμωξης. Σημαντικό ρόλο στην φυσική ανοσία παίζουν τα φαγοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, οι φραγμοί όπως το δέρμα και μία ποικιλία αντιμικροβιακών ουσιών που συντίθενται από τον ξενιστή. Αυτός ο μηχανισμός άμυνας είναι κοινός για οποιονδήποτε μικροοργανισμό προσπαθήσει να εισέλθει στον οργανισμό.

Αντίθετα, για την επίκτητη ανοσία είναι απαραίτητο το αντιγονικό ερέθισμα. Τυπικά η επίκτητη ανοσία ανταποκρίνεται ενάντια στο αντιγόνο μέσα σε 5 -6 μέρες μετά την αρχική έκθεση σ' αυτό. Σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο, η απόκριση του οργανισμού είναι πιο άμεση, λόγω μνήμης. Τα κυριότερα κύτταρα που παίζουν ρόλο στην επίκτητη ανοσία είναι τα λεμφοκύτταρα, καθώς και τα αντισώματα και άλλα μόρια που παράγουν.

Αντίθετα με την φυσική ανοσία, η επίκτητη ανοσία δεν είναι η ίδια σε όλα τα μέλη ενός είδους αλλά είναι αντιδράσεις σε ειδικά αντιγονικά ερεθίσματα. Η επίκτητη ανοσία εμφανίζει 4 χαρακτηριστικές ιδιότητες: i) ειδικότητα αντιγόνου, ii) ποικιλομορφία, iii) ανοσολογική μνήμη και iv) αναγνώριση εαυτού/ ξένου (Goldsby et al., 2003).

Υπάρχουν δύο τύποι επίκτητης ανοσίας, η χυμική ανοσία και η κυτταρική ανοσία. Στη χυμική ανοσία εξουδετερώνονται οι εξωκυττάριοι μικροοργανισμοί από τις πρωτεΐνες που ονομάζονται αντισώματα και παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα εκκρίνονται στα σωματικά υγρά και εξουδετερώνουν τους μικροοργανισμούς και τις τοξίνες τους. Στην κυτταρική ανοσία εξουδετερώνονται οι ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί και στη διαδικασία αυτή μεσολαβούν τα Τ-λεμφοκύτταρα. Μεταξύ των λεμφοκυττάρων, τα CD4⁺ Τ-λεμφοκύτταρα (Th) ονομάζονται βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα επειδή βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα και τα φαγοκύτταρα να καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς που έχουν ήδη φαγοκυτταρώσει. Τα CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα ονομάζονται κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (Tc) επειδή φονεύουν κύτταρα που φέρουν ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς (προκαλούν λύση των κυττάρων) (Abbas & Lichtman, 2004).

Τα λεμφοκύτταρα, με τους ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, είναι το κλειδί στην ανοσολογική ειδικότητα. Κάθε Τ και Β λεμφοκύτταρο κατέχει υποδοχείς ειδικούς για συγκεκριμένο επίτοπο. Όταν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα

συνδεθούν με αντιγόνο, ανταποκρίνονται με διαίρεση για τον σχηματισμό κλώνων των κυττάρων. Τα Β λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασμακύτταρα, που εκκρίνουν ειδικά αντισώματα. Τα Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες γνωστούς ως λεμφοκίνες ή ιντερλευκίνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη οικογένεια ορμονών, γνωστές ως κυτταροκίνες, οι οποίες ρυθμίζουν τη δράση άλλων κυττάρων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Μερικά από τα Τ και Β λεμφοκύτταρα επανέρχονται σε μικρά κύτταρα, τα οποία ζουν για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και είναι υπεύθυνα για την ανοσολογική μνήμη. (Ferren J. Frank,1993)

Οι επίκτητες ανοσοαπαντήσεις ξεκινούν με την αναγνώριση του αντιγόνου από τους αντιγονικούς υποδοχείς των λεμφοκυττάρων. Οι αντιγονικοί υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων (τα αντισώματα) αναγνωρίζουν μία μεγάλη ποικιλία μακρομορίων (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα) αλλά και μικρομοριακές χημικές ουσίες. Τα περισσότερα Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνικών αντιγόνων και μόνο όταν παρουσιάζονται από εξειδικευμένα μόρια παρουσίασης που βρίσκονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ξενιστή (APCs, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα) και παρουσιάζονται από αυτά (Abbas & Lichtman, 2004, Klein, 1986, Ferren J. Frank,1993).

Αυτοί οι υποδοχείς παρουσίασης του αντιγόνου ονομάζονται μόρια ιστοσυμβατότητας ή αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (histocompatibility antigens). Είναι εξειδικευμένοι υποδοχείς γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίοι κωδικοποιούνται από γονίδια που απαντώνται σε ένα γονιδιακό σύμπλεγμα με την ονομασία μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Επομένως οι υποδοχείς ονομάζονται μόρια MHC. Τμήματα αντιγόνου μπορούν να διεγείρουν μία ανοσοαντίδραση μόνο εάν συνδεθούν στα μόρια MHC. Αυτή η προϋπόθεση λέγεται περιορισμός του MHC. (κτηνιατρική ανοσολογία, Goldsby et al., 2003). Μιας και τα γονίδια MHC ελέγχουν ποια μόρια MHC θα παραχθούν

από ένα άτομο, ελέγχουν και ποια αντιγόνα μπορούν να παρουσιαστούν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως το MHC μπορεί να θεωρηθεί ως μία οργανωμένη ομάδα γονιδίων που ελέγχει την παρουσία του αντιγόνου στο ανοσοποιητικό σύστημα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα γονίδια MHC ελέγχουν την ευαισθησία ή ανθεκτικότητα ενός οργανισμού στα διάφορα λοιμώδη ή αυτοάνοσα νοσήματα. (κτηνιατρική ανοσολογία)

4.2.2 Γενικά για το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

Ο όρος μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας προκύπτει από προηγούμενη έρευνα στην αποδοχή ή στην απόρριψη ιστών, την ιστοσυμβατότητα, που μεταμοσχεύτηκαν μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους (Gorer, 1937)

Όλα τα σπονδυλωτά, από τα χονδρόψαρα έως τα θηλαστικά, έχουν γονίδια MHC. Τα γονίδια αυτά απαντώνται σχεδόν πάντα στο γονιδίωμα ως μία ομάδα σύνδεσης ή σύμπλεγμα γονιδίων (κτηνιατρική ανοσολογία)

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας είναι η πιο πολυμορφική περιοχή των σπονδυλωτών, που έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα, και κωδικοποιεί για τα μόρια που παρουσιάζουν τα αντιγόνα που προέρχονται από το παθογόνο, στα T κύτταρα και προάγει την επίκτητη ανοσοαπόκριση. (Klein 1986).

Το MHC είναι η πλέον πυκνή περιοχή του γονιδιώματος των θηλαστικών (Xie et al., 2003) και κωδικοποιεί ένα σύνολο από γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Benacerraf, 1981, Snell, 1981) καθώς και γονίδια που δε σχετίζονται με αυτό (MHC Sequencing Consortium, 1999). Περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία μπορούν να χωριστούν με βάση τη λειτουργία τους σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: 1) τα γονίδια τάξης I και II που κωδικοποιούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια, 2) τα γονίδια που συμμετέχουν στην επεξεργασία των αντιγόνων όπως το LMP και TAP, 3) τα γονίδια με

ανοσολογική λειτουργία που δε σχετίζονται όμως εξελικτικά και λειτουργικά με τα γονίδια τάξης I και II (συστατικά του συμπληρώματος C4, C2 και παράγοντας B), 4) γονίδια που δεν έχουν λειτουργική σχέση με την ανοσοαπάντηση (Kasahara, 1997).

Το MHC των θηλαστικών χωρίζεται σε 3 τάξεις: περιοχές I, II και III. Η περιοχή τάξης I κωδικοποιεί τα πολυμορφικά, κλασικά γονίδια τάξης I (ή τάξης Ia), δύο σειρές από μη κλασικά γονίδια τάξης I (ή τάξης Ib) και άλλα γονίδια που δε σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Flajnik & Kasahara, 2001). Η περιοχή τάξης II περιέχει τα πολυμορφικά τάξης II α και β γονίδια, όπως επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν τη γ-ιντερφερόνη, επαγώγιμα συστατικά του πρωτεασώματος (LMP2 και LMP7) και μεταφορείς που σχετίζονται με την επεξεργασία των αντιγόνων (TAP1 και TAP2) που εμπλέκονται στην παραγωγή και μεταφορά των πεπτιδίων που προσδένονται στα μόρια τάξης Ia, αντίστοιχα. Η αποκαλούμενη «εκτεταμένη περιοχή τάξης II» περιλαμβάνει κυρίως γονίδια μη σχετιζόμενα με την ανοσοποίηση αλλά κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που προσδένεται στην TAP (TAPBP) η οποία είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση της τάξης Ia, και την RXRB, ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση της τάξης I. Η κεντρική περιοχή τάξης III είναι η πιο πυκνή σε γονίδια και το πιο καλά συντηρημένο τμήμα του MHC στα θηλαστικά, με την παρουσία διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στη φυσική/επίκτητη ανοσία όπως το συστατικό του συμπληρώματος C4 και τον παράγοντα B (Bf), τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), και την HSP70 (Flajnik & Kasahara, 2001).

4.2.3 Δομή του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια της τάξης I βρίσκονται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων. Είναι ετεροδιμερή και αποτελούνται από δύο συνδεδεμένες γλυκοπρωτεϊνικές

αλυσίδες. Η α αλυσίδα (45kDa) συνδέεται με μία πολύ μικρότερη αλυσίδα, την β_2 -μικροσφαιρίνη (β_2M) (12kDa). Η αλυσίδα α εισέρχεται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής επιφάνειας. Αποτελείται από 5 περιοχές, τρεις εξωκυτταρικά, τις α_1 , α_2 και α_3 , που αποτελούνται από 100 αμινοξέα η καθεμία, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή. Η θέση σύνδεσης του αντιγόνου στο μόριο της Ia απαντάται στην περιοχή της αναδίπλωσης των περιοχών α_1 και α_2 . Η β_2M αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή, η οποία μάλλον προσδίδει την σταθερότητα της δομής του μορίου. (κτηνιατρική ανοσολογία).

Τα μόρια του MHC II παρουσιάζονται κυρίως στα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα/ μονοκύτταρα, δένδριτικά, B λεμφοκύτταρα) και αποτελούνται από δύο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες, τις α (31 έως 34 kDa) και τις β (25 έως 29kDa). Κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωκυτταρικές περιοχές, ένα συνδετικό πεπτίδιο, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή. (κτηνιατρική ανοσολογία)

Στο περιφερικό άκρο κάθε πρωτεΐνης MHC υπάρχει μία αύλακα, μέσα στην οποία ποικιλία καταλοίπων παρέχουν ενός βαθμού ειδικότητας για συγκεκριμένη περιοχή των πεπτιδίων που μπορούν να συνδεθούν (**P**eptide **B**inding **R**egion-PBR). Τα πεπτίδια που ανακτώνται από τα μόρια της τάξης I έχουν συνήθως μήκος 8-9 αμινοξέα., ενώ τα πεπτίδια που συνδέονται στις πρωτεΐνες της τάξης II κυμαίνονται από 13 έως 17 αμινοξέα. Το σύμπλεγμα πεπτιδίου- MHC αναγνωρίζεται, με πολύ μεγαλύτερου βαθμού ειδικότητα, από τον υποδοχέα TCR από τον κατάλληλο κλώνο των T κυττάρων. (Ferren J. Frank,1993)

Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων MHC διαφορετικών ατόμων, εντοπίζονται στις περιοχές α_1 και α_2 της α αλυσίδας (Coico et al., 2003, Goldsby et al., 2003, Abbas &

Lichtman, 2004). Η περιοχή α3 είναι σταθερή και περιέχει τη θέση σύνδεσης για το συνυποδοχέα CD8 των T κυττάρων. Επομένως, τα CD8+ T κύτταρα μπορούν να απαντήσουν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I, από τα μόρια δηλαδή με τα οποία συνδέεται ο συνυποδοχέας CD8, αντίθετα οι λειτουργίες των μη κλασικών γονιδίων τάξης I είναι διάφορες (O'Callaghan & Bell, 1998, Williams et al., 2002).

Το εξωκυτταρικό τμήμα φέρει περιοχές που μοιάζουν με την Ig, ενώ τα μόρια MHC τάξης II είναι μέλη της υπερικογένειας Ig. Η μη πολυμορφική περιοχή β2 περιέχει τη θέση σύνδεσης του συνυποδοχέα CD4 των T κυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια MHC τάξης II, τα CD4+ T κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II (Villadangos, 2001). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα πεπτίδια που συνδέονται σε διαφορετικά μόρια MHC τάξης II επιδεικνύουν μοτίβα, και συνήθως τα αντιγονικά πεπτίδια είναι πιο μεγάλα και πολυμορφικά από αυτά που συνδέονται στα μόρια MHC τάξης I. Έτσι, το μοτίβο παρατηρείται στην κεντρική περιοχή του πεπτιδίου, την περιοχή που ταιριάζει μέσα στην αύλακα πρόσδεσης του MHC τάξης II (Coico et al., 2003, Goldsby et al., 2003, Abbas & Lichtman, 2004).

4.2.4 Η λειτουργία του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας

Τα πιο αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι τα δενδρικά κύτταρα, πλούσια σε τάξης II MHC. Αντίθετα με τα δενδρικά κύτταρα, τα μακροφάγα είναι φαγοκυτταρικά, εκφράζουν λίγες τάξης II MHC πρωτεΐνες όταν βρίσκονται σε αδράνεια, αλλά διεγείρονται ώστε να αυξηθούν οι πρωτεΐνες μόλις ενεργοποιηθούν.

Εφόσον η λειτουργία των μορίων του MHC είναι η παρουσίαση των αντιγόνων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα γονίδια MHC ρυθμίζουν τις

ανοσολογικές αποκρίσεις. Ένα ξένο μόριο που δεν μπορεί να συνδεθεί σε μία αύλακα ενός τουλάχιστον μορίου MHC δεν θα διεγείρει την επίκτητη ανοσία, συνεπώς τα αλληλόμορφα του MHC καθορίζουν την ευαισθησία σε νοσήματα, στα οποία οι ανοσολογικές αποκρίσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Κάθε ζώο έχει μόνο ένα συγκεκριμένο αριθμό αλληλομόρφων MHC, και τα αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται σε ορισμένα μόρια MHC. Εάν το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC είναι απαραίτητο για την πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης σε μία σοβαρή ιϊκή μόλυνση, τα άτομα που έχουν τις κατάλληλες MHC πρωτεΐνες θα είναι γενετικά πιο ανθεκτικά σ' αυτήν την ασθένεια. Μία επιπλέον αιτία που αυξάνει την ανθεκτικότητα βρίσκεται στην πιθανή απώλεια των λεμφοκυττάρων που φέρουν τους κατάλληλους υποδοχείς για ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο MHC – πεπτιδίου. (Ferren J. Frank, 1993)

Τα ετερόζυγα ως προς το MHC ζώα πλεονεκτούν επειδή μπορούν να ανταποκριθούν σε περισσότερα αντιγόνα και, επομένως, είναι σε θέση να επιβιώνουν σε λοιμώξεις. Η περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου στα μόρια του MHC τάξης Ia και II είναι επίσης μη ειδική (ή εκφυλισμένη) και υπολογίζεται ότι ένα μόριο MHC μπορεί να συνδεθεί με περίπου 2500 διαφορετικά πεπτίδια.

Γενικά, στην υπεροχή του ετεροζυγώτη, τα ετερόζυγα άτομα είναι καλύτερα προσαρμοσμένα από τα ομόζυγα. Έτσι, τα σπάνια αλληλόμορφα ευνοούνται από την αυξημένη αντιπροσώπευσή τους στα ετερόζυγα άτομα. Αυτό το είδος επιλογής θεωρήθηκε ότι συμβάλλει στη διατήρηση του αλληλομορφικού πολυμορφισμού στο MHC. Επειδή τα πολυμορφικά αμινοξέα καθορίζουν ποια πεπτίδια θα παρουσιαστούν από κάθε μόριο MHC, η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον κάποιο μέλος του πληθυσμού θα μπορεί να παρουσιάσει πρακτικά οποιοδήποτε αντιγόνο μικροοργανισμού. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός έχει δημιουργηθεί εξελικτικά για να εξασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός δε θα υποκύψει σε ένα νέο μικροοργανισμό ή

σε ένα παλαιό μικροοργανισμό που έχει μεταλλαχθεί, γιατί τουλάχιστον κάποια άτομα θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές ανοσοαπαντήσεις κατά οποιουδήποτε πεπτιδίου (Doherty & Zinkernagel, 1975).

Ένα χαρακτηριστικό του MHC είναι η απουσία ενός «αγρίου τύπου». Αυτό παρατηρείται για κάθε χωριστό γονίδιο, όπου πολλαπλά αλληλόμορφα είναι παρόντα σε οποιαδήποτε συχνότητα και πιο εκτεταμένα στο επίπεδο των απλοτύπων και στους κατά ζεύγη συνδυασμούς τους για να σχηματίσουν τους φαινοτύπους (Parham, 1999). Αυτές οι ιδιότητες συνεισφέρουν στο ότι τα γονίδια του MHC είναι ένα από τα λίγα συστήματα των θηλαστικών όπου μπορεί η Δαρβινική φυσική επιλογή να είναι ευαπόδεικτη (Yeager & Hughes, 1999). Συγκεκριμένα, οι τόποι του MHC παρουσιάζουν ένα πολύ μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού που κανένας άλλος τόπος ο οποίος κωδικοποιεί πρωτεΐνες στο γονιδίωμα των θηλαστικών δεν τον παρουσιάζει (Nei & Hughes, 1991a). Για το λόγο αυτό, το MHC έγινε ένα από τα καλύτερα μελετημένα γενετικά συστήματα στα γναθοστόματα που παρέχει ενδείξεις για τη μακροπρόθεσμη δράση της φυσικής επιλογής .

4.2.5 Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας του Αγριόχοιρου

Το *Sus scrofa* (πίνακας 1) εμφανίζει την ευρύτερη γεωγραφική κατανομή, σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας των χοίρων. Έχουν συνολικό μήκος 900mm έως 1800mm και το βάρος τους ποικίλλει από 50 έως 350 κιλά. Η περίοδος του ζευγαρώματος είναι συχνά βίαιη καθώς τα αρσενικά μάχονται για την πρόσβαση στα θηλυκά. Το σύστημα ζευγαρώματος είναι πολύγυνο (polygynous). Σε εύκρατα κλίματα τα θηλυκά γεννούν ένα νεογνό την άνοιξη. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα μέσα σε

οκτώ έως 10 μήνες, αν και τα θηλυκά δε ζευγαρώνουν μέχρι τους 18 μήνες και τα αρσενικά δεν έχουν το επιθυμητό μέγεθος για μάχη μέχρι τα πέντε έτη (Hopf, 1979, Nowak, 1991). Τα θηλυκά είναι πολύ προστατευτικά με τα μικρά τους, αν και μόνο τα μισά θα ωριμάσουν καθώς συνήθως γίνονται λεία θηρευτών ή αναπτύσσουν ασθένειες (Nowak, 1991). Ο αγριόχοιρος στην Ευρώπη συχνά βρίσκεται σε μεγάλες αγέλες μέχρι 100 άτομα, αν και ο πιο αντιπροσωπευτικός αριθμός είναι το 20. Οι αγέλες σχηματίζονται από τα θηλυκά και τα μικρά τους, και μπορεί να μετακινούνται μαζί σε μεγάλο εύρος αλλά δε μεταναστεύουν. Όταν τα αρσενικά ωριμάσουν αφήνουν την αγέλη και ζουν μόνα τους. Οι αγριόχοιροι είναι κατά κανόνα νυχτόβια ζώα (Hopf, 1979, vanLoon, 1979, Nowak, 1991). Ο πρωταρχικός θηρευτής των ώριμων αγριόχοιρων είναι ο άνθρωπος ενώ άλλοι θηρευτές τους είναι οι αρκούδες και οι αγριόγατες ενώ οι χοίροι είναι εξαιρετικά επιθετικοί και ατίθασοι όταν νιώθουν ότι απειλούνται. Οι εισαχθέντες ημιάγριοι (feral) πληθυσμοί του *S. scrofa* είναι υπεύθυνοι για περιβαλλοντικές καταστροφές παγκοσμίως ενώ προκαλούν ή φέρουν ασθένειες των οικόσιτων ζώων. Το *S. scrofa* δεν είναι γενικά απειλούμενο αν και πληθυσμοί αγριόχοιρων είχαν αφανιστεί εξαιτίας της θήρευσής τους. Υπάρχουν ακόμη αρκετοί πληθυσμοί φυλών του εξημερωμένου χοίρου οι οποίοι κινδυνεύουν με εξαφάνιση και είναι ο στόχος προσπαθειών για συντήρηση (Porter, 1993, Nowak, 1991).

Αρχικά, υπήρχαν στην Ευρώπη, την Ασία, τη Βόρεια Αφρική και το Αρχιπέλαγος Μαλάι ενώ υπήρχαν και νησιωτικοί πληθυσμοί, στη Βρετανία, την Κορσική, τη Σαρδηνία, την Ιαπωνία, τη Σρι Λάνκα και άλλα μικρότερα νησιά. Στη συνέχεια εισήχθη σε όλο τον κόσμο και πλέον μπορεί να βρεθεί παντού (Hopf, 1979, Storer, 1992, Nowak, 1991). Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος έχει υποστεί τοπικές εξαφανίσεις και μετεγκαταστάσεις στο παρελθόν, ενώ πλέον επεκτείνεται ανησυχητικά και ευρέως σε κάποιες περιοχές, όπου απαιτούνται προγράμματα διαχείρισης. Ο αγριόχοιρος ήταν σημαντικό θήραμα για τους κυνηγούς από

πολύ παλιά, σε όλη την περιοχή της Ευρασίας, μέχρι που εξημερώθηκε. Μία εκτεταμένη ζωοαρχαιολογική μελέτη θεωρεί ότι οι χοίροι εξημερωθήκανε περίπου πριν από 9.000 χρόνια στην Εγγύς Ανατολή, ενώ νεότερα μοριακά και αρχαιολογικά στοιχεία υποδεικνύουν μία δεύτερη, ανεξάρτητη εξημέρωση στην Άπω Ανατολή. (Larson G.) Παρόλο που έχει προταθεί η άποψη ότι οι αγριόχοιροι υπέστησαν ανεξάρτητη εξημέρωση στην Ευρώπη, άλλοι υποστηρίζουν ότι όπως τα βοοειδή και τα πρόβατα, έτσι και οι χοίροι προέρχονται από το γενετικό απόθεμα της Εγγύς Ανατολής που μεταφέρθηκαν στην Ευρώπη από τους Νεολιθικούς αγρότες. (Larson G.) Τελευταίες έρευνες έχουν δείξει ότι υπήρχαν πολλά κέντρα εξημέρωσης των χοίρων σε όλη την Ευρασία (Larson G.) και ότι η εξημέρωσή τους δεν επηρεάζει τον πολυμορφισμό του MHC II (Moutou K. , 2013)

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους *Sus scrofa* (από <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>)

Βασίλειο	Ζώων
Φύλο	Χορδωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Θηλαστικά
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα
Οικογένεια	Suidae
Γένος	<i>Sus</i>
Είδος	<i>scrofa</i>

Στον χοίρο, το σύμπλεγμα MHC (SLA, Swine Leucocyte Antigen) απαντάται στο χρωμόσωμα 7 και διαιρείται από το κεντρομερίδιο. Οι περιοχές της τάξης I και III απαντώνται στον κοντό βραχίονα και η περιοχή της τάξης II στον μακρύ βραχίονα του μορίου MHC. Το MHC των χοίρων είναι το μικρότερο μεταξύ αυτών των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί (περίπου 2 mb). Έχουν

προσδιοριστεί πάνω από 150 τόποι σε όλη την έκταση του SLA και εκτιμάται ότι τουλάχιστον 121 γονίδια είναι λειτουργικά. (Renard et al, 2006) Ο αριθμός των εκφρασμένων γονιδίων ποικίλει μεταξύ των απλοτύπων. Από τα γονίδια της τάξης II, μερικά κωδικοποιούν DR και DQ ετεροδιμερή, ενώ δεν υπάρχουν προϊόντα του DP.

Το γονίδιο MHC I αποτελείται από 8 εξώνια. Το εξώνιο 1 κωδικοποιεί την κύρια αλληλουχία, τα εξώνια 2 -4 κωδικοποιούν τους τόπους (domains) α1, α2 και α3 αντίστοιχα, το εξώνιο 5 την διαμεμβρανική περιοχή και τα εξώνια 6 – 8 τον κυτταροπλασματικό τόπο.

Τα γονίδια DRA και DQA της τάξης II αποτελούνται από 4 εξώνια, από τα οποία το 1 κωδικοποιεί την κύρια αλληλουχία, τα εξώνια 2 και 3 τους τομείς α1 και α2, αντίστοιχα και το εξώνιο 4 τον διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τομέα. Τα γονίδια της τάξης II της αλυσίδας β έχουν ουσιαστικά την ίδια μοριακή δομή με των γονιδίων της α αλυσίδας, εκτός του ότι τα γονίδια DQB1 και DRB1 έχουν 1 και 2 επιπλέον εξώνια, αντίστοιχα, που κωδικοποιούν το κυτταροπλασματικό τομέα.

Δεν αποκλείεται να υπάρχει ποικιλομορφία στον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων στους απλοτύπους όπως αναφέρεται και στην περίπτωση της HLA περιοχής τάξης II (Ando & Chardon, 2006) και στην περίπτωση της περιοχής DRB1 (Barbisan F., 2009). Στην υποπεριοχή DR υπάρχουν τέσσερα ψευδογονίδια SLA-DRB και στην υποπεριοχή DQ ένα ψευδογονίδιο DQB. Τα γονίδια τάξης II είναι είτε μονομορφικά, όπως το DRA, είτε ολιγομορφικά όπως το DQA είτε φέρουν αξιόλογο πολυμορφισμό όπως το DRB1 και το DQB (Chardon et al., 2000).

Για το SLA-DQA μέχρι στιγμής έχει καταγραφεί μέτριος πολυμορφισμός ενώ το SLA-DRB1 είναι το πιο πολυμορφικό γονίδιο του SLA-MHC (Chardon et al., 1999, Ando & Chardon, 2006). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο περιορισμένος πολυμορφισμός στο MHC ερμηνεύεται ως το αποτέλεσμα μιας στενωπού του

πληθυσμού (Axtner & Sommer, 2007). Είναι παραδεκτό, ότι στους μικρούς πληθυσμούς και στα απειλούμενα είδη παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού και η θνησιμότητα από παθογόνα και παράσιτα μπορεί να είναι μια σημαντική απειλή (Hedrick *et al.*, 2000). Μια τέτοια εξήγηση φαίνεται να ταιριάζει με την εξελικτική ιστορία του αγριόχοιρου. Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος είναι ένα σημαντικό θήραμα το οποίο έχει υποστεί στο παρελθόν μετεγκαταστάσεις και τοπικούς αφανισμούς εξαιτίας της αδιάκριτης θήρευσης που κατέληξε σε μεγάλη δημογραφική μείωση (Vernesi *et al.*, 2003, Scandura *et al.*, 2008).

5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της παρουσίας του ιού της ηπατίτιδας Ε (HEV) στους αγριόχοιρους στην Ελλάδα και του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας της τάξης II (MHC II).

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Βιολογικό υλικό

Συλλέχθηκαν 23 δείγματα αγριόχοιρων κατά τη διάρκεια της τριών κνηγετικών περιόδων (μέσα Σεπτεμβρίου έως αρχές Ιανουαρίου, 2005-2008) από διάφορες κνηγετικές οργανώσεις στην Ελλάδα. Οι μυϊκοί και ηπατικοί ιστοί διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα αυτά αντιστοιχούν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 9).

5.2.2 Απομόνωση RNA

5.2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Μετά την απόψυξη των δειγμάτων ήπατος πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού RNA, από ομογενοποιημένα ιστών βάρους 30mg, με τη χρήση του QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

5.2.2.2 Επιλογή του RNA στόχου

Η επιλογή του επιθυμητού τμήματος RNA έγινε με σκοπό την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας Ε. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών (Πιν. 2) για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του γονιδιώματος της ηπατίτιδας Ε, 196 ζευγών βάσεων το οποίο είναι μέρος του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ORF2.

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της RT-PCR

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΣΗ*	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ
ORF2-S1	5'-GACAGAAATTRATTTTCGTCGGCTGG-3'	6298-6321	196 bp
ORF2-a1	5'-AGCATGTCTTCYGTBGTCCATCCAYT-3'	6494-6470	
*Γονιδιακή θέση για το στέλεχος Burmese (M73298)			

Στόχος ήταν ο εντοπισμός του συμπληρωματικού DNA του συγκεκριμένου τμήματος RNA.

5.2.2.3 Εφαρμογή της μεθόδου αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε ένα βήμα

Η μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA και ακολούθως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH). Συγκεκριμένα για κάθε μίγμα αντίδρασης χρειάστηκαν (Πιν. 3):

- α) Απομονωθέν RNA
- β) Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM MgCl₂
- γ) Ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια κάθε αζωτούχου βάσεως (dNTPs)
- δ) Ανασυνδυασμένη RNasin-αναστολέας ριβονουκλεασών (Promega, Madison, WI)
- ε) Εκκινητής ORF2-S1
- στ) Ανίστροφος εκκινητής ORF2-a1
- ζ) Enzyme mix
- η) DEPC-treated water

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 25 μL.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της RT-PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ - ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
RNA	2,5 μ L
5X ρυθμιστικό διάλυμα (2,5 mM MgCl ₂)	5 μ L
dNTPs	0,4 mM
recombinant RNasin	10 U
Εκκινητής ORF2-S1	20 pmole
Ανίστροφος εκκινητής ORF2-a1	20 pmole
Enzyme mix	1 μ L
DEPC-treated water	14,6 μ L

Για την μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου ακολουθήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

- α) Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε θερμοκρασία 50 °C για 30 λεπτά
- β) Αρχική αποδιάταξη του σχηματισθέντος DNA σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά
- γ) Θερμική αποδιάταξη του σχηματισθέντος DNA σε θερμοκρασία 94 °C για 1 λεπτό
- δ) Υβριδισμός των εκκινητών σε θερμοκρασία 55 °C για 90 δευτερόλεπτα
- ε) Πολυμερισμός του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για ένα λεπτό

Ο κύκλος που αναφέρεται στα τρία τελευταία στάδια επαναλήφθηκε διαδοχικά 40 φορές.

Η όλη διαδικασία ολοκληρώθηκε με την παραμονή του μίγματος αντίδρασης για 10 λεπτά στους 72 °C με σκοπό την τελική επιμήκυνση του DNA.

Στη συνέχεια, μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ποσότητας 18 μL προϊόντος PCR στο οποίο προστέθηκε 2 μL χρωστικής (bromophenol blue). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volt για 30 λεπτά. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε γέλη αγαρόζης 2% στην οποία προστέθηκε 0,05% βρωμιούχο εθίδιο (7,5 $\mu\text{L}/100\text{ml}$).

Η αντίδραση της OneStep RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή DNA Engine της BioRad.

Για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της PCR και τη σαφέστερη απεικόνιση και κατανόηση τους, χρησιμοποιήθηκε γνωστό θετικό και αρνητικό δείγμα και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ήπαρ από θετικό αγριόχοιρο το οποίο μας στάλθηκε από το Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό. Η επεξεργασία του αρνητικού μάρτυρα ήταν ακριβώς η ίδια όπως για τα κλινικά δείγματα.

Τέλος, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε σε ειδικό μηχάνημα υπεριώδους ακτινοβολίας προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA.

5.2.3.1 Αντιδραστήρια

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Ammonium persulfate

2-propanol

Bromophenol Blue

Boric acid

Xylene Cyanol

Chloroform

NaCl

SDS

dNTPs

EDTA

Ethidium bromide

EtOH

Proteinase K

Glycerol

HCl 37%

Formamide

NaOH

Formaldehyde

MgCl₂ x 6H₂O

NaBH₄

Phenol

Potassium Acetate

TEMED

Tris Base

AgNO₃

100bp Ladder

ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ DNA

Taq (Bioline)

5.2.4 Απομόνωση του DNA

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle, (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,5M (200ml)

- 8,20 gr CH₃COONa
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 0,5ml CH₃COONa 0,5M, 20μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10mg/ml.
2. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55° C για μια ώρα.
3. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά

5. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
8. Προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
10. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
11. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε ήπια.
12. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 20 λεπτά.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα που εμφανίζεται.
15. Προσθέτουμε 1ml αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
16. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά.
17. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
18. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37°C , ώστε να ξηρανθεί το ίζημα από τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
19. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4°C) είτε στην κατάψυξη (-20°C).

Μετά το βήμα 11, υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν ινίδια DNA, τα οποία μπορούμε να τα συλλέξουμε με τη βοήθεια μιας λαβίδας και να συνεχίσουμε τη διαδικασία από το βήμα 15.

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και αυτή προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων,

πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε $\text{pH} > 7$ ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

5.2.4.1 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί παρακάτω.

5.2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του εξωνίου 2 του γονιδίου DRB1 και του εξωνίου 2 του γονιδίου DQA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (Πίνακας 4):

Πίνακας 4: Μέγεθος προϊόντος PCR (με τους εκκινητές) και ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων του MHC στα *Sus Scrofa*

Όνομα είδους	Όνομα εκκινητή	Περιοχή	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Ακολουθία εκκινητών
<i>Sus scrofa</i>	DRB1.Fw	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)	240	5'CGACCATGTTGCCTCCTATG 3'
	DRB1.Rv	<i>DRB1</i> (εξώνιο 2)		5'GGCACCAGGAATGTATCCAA 3'
	DQA.Fw	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)	230	5'CGACCATGTTGCCTCCTATG 3'
	DQA.Rv	<i>DQA</i> (εξώνιο 2)		5'TGTTGGAGCGTTTAGTCACG 3'

Πίνακας 5: Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων του MHC τάξης II στο είδος *Sus scrofa*

Συστατικά	Ενισχυμένα τμήματα	
	<i>DRB</i> (<i>Sus scrofa</i>)	<i>DQA</i> (<i>Sus scrofa</i>)
Ρυθμιστικό διάλυμα	1x	1x
MgCl ₂	2mM	2mM
dNTPs	0,8mM	0,8mM
Εκκινητές	1 pmole	1 pmole
Πολυμεράση	1 unit	1 unit
Μητρικό DNA	300ng	300ng

Πίνακας 6: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων MHC τάξης II στο είδος *Sus scrofa*

<i>DRB1</i>		<i>DQA</i>	
	95°C – 4 min		95°C – 4 min
35 κύκλοι	95°C – 40 sec	35 κύκλοι	95°C – 40 sec
	57°C – 50 sec		58°C – 50 sec
	72°C – 40 sec		72°C – 40 sec
	72°C – 10 min		72°C – 10 min

Πίνακας 7: Σύσταση πηκτής και ηλεκτροφορητικές συνθήκες για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στα είδη *Lepus europaeus* και *Sus scrofa*

	<i>DRB1</i> (<i>Sus scrofa</i>)	<i>DQA</i> (<i>Sus scrofa</i>)
Σύσταση πηκτής	10%w/v	10%w/v
Θερμοκρασία	Θερμοκρασία δωματίου	4 °C
Τάση ηλ. πεδίου	200 V	180 V

5.2.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 35ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται. Για την ηλεκτροφόρηση

των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer.

Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορεύεται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

5.2.4.4 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

5.2.4.5 Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer), η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5-7μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλιωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλιωνα κατάσταση.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδη 75gr

Bis-acrylamide 2gr

ddH₂O έως τα 200ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 121 gr

Boric acid 81,5gr

EDTA 0,5M 80ml

ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 8%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 8% αναγράφονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 8 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

	10%
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	12,5ml
Glycerol 50%	8ml
TBE 10x	5ml
TEMED	50μl
APS 20%	350μl
H ₂ O	Έως τα 50ml
Συνολικός όγκος	50ml

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες περίπου.

5.2.4.6 Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΰδη,

παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH₂O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μία. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στο πήκτωμα.

5.2.4.7 Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαχθούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε τις επιθυμητές αλληλουχίες των διαφορετικών προτύπων SSCP που επιλέχθηκαν.

5.2.4.8 Ανάλυση χρωματογραφήματων αλληλούχησης

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al, 1997). Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HEV

Η ανίχνευση του επιλεγμένου τμήματος του γονιδιώματος της ηπατίτιδας με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δε κατέστη δυνατή σε κανένα από τα 23 δείγματα που εξετάστηκαν (Πιν. 9).

Τόσο ο θετικός μάρτυρας και ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκαν όσο και ο αρνητικός μάρτυρας λειτούργησαν κανονικά. Ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε μια ευδιάκριτη ζώνη στο αναμενόμενο, βάση του μοριακού δείκτη, μέγεθος (196 bp), ενώ καμία ζώνη δεν εμφάνισε αντίστοιχα ο αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα RT- PCR του HEV

Δείγματα	Θετικό/αρνητικό
1	
Άρτα Πουρνάρι 1	-
Κόνιτσα 1	-
Μουργκάνα 3	-
Πρέβεζα 1	-
Εκτροφείο 9	-
Καλάβρυτα 1	-
Βέροιο Βέροια 1	-
Σέρρες 1 συκωτι	-
Δράμα 1	-
Δράμα 3	-
Δράμα 5	-
Πετρίτσι 1	-
Πετρίτσι 2	-
Πετρίτσι 3	-

Πετρίτσι 4	-
Πετρίτσι 6	-
Πετρίτσι 9	-
Πετρίτσι 10	-
Πετρίτσι 14	-
Πετρίτσι 17	-
Πετρίτσι 18	-
Πετρίτσι 20	-
Πετρίτσι 21	-

6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

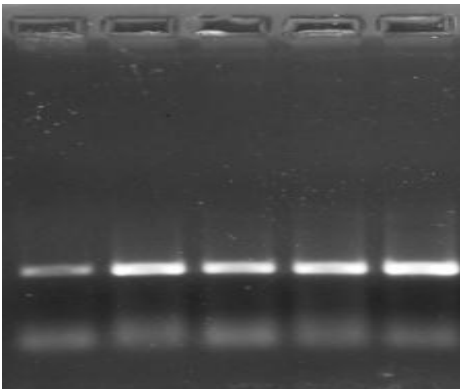
Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτική αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA (εικ 1).



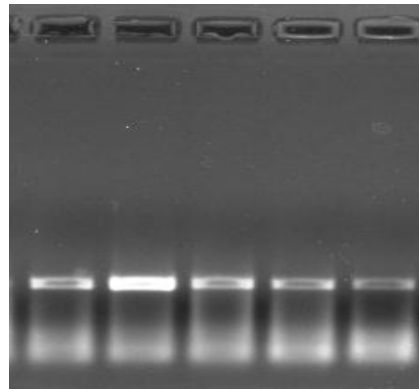
Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

6.3 PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών ενισχύθηκαν τα τμήματα των γονιδίων DRB1 και DQA. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μήκος περίπου 240 ζευγών βάσεων για το DRB1 και 230 ζευγών βάσεων για το DQA. (εικ 2-3)



**Εικόνα 2: ηλεκτροφόρηση
προϊόντων PCR
του εξωνίου 2 του DRB1**

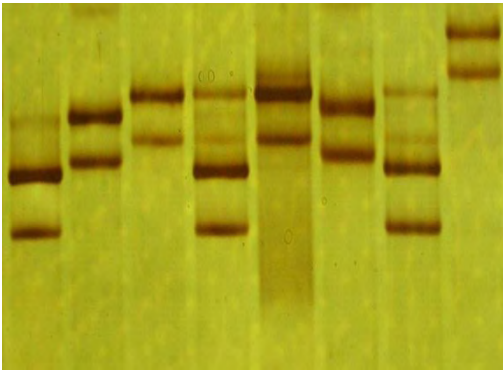


**Εικόνα 3: ηλεκτροφόρηση
προϊόντων PCR
του εξωνίου 2 του DQA**

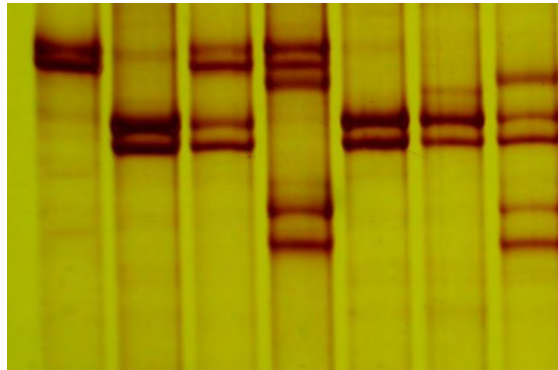
6.4 SSCP

Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 10%, για 20 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων με χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 9 διαφορετικά πρότυπα για το DRB1 και 7 διαφορετικά πρότυπα για το DQA .(εικ.4-5).

A.



B.



Εικόνα 4-5: Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP DQA (A) και DRB1(B)

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο για να σταλούν για αλληλούχηση, αφού πρώτα καθαρίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου kit της Qiagen. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen στην Κορέα.

6.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές για την αντίδραση του sequencing. Τα δυο χρωματογραφήματα που λήφθηκαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Οι αλληλουχίες που

προέκυψαν, για κάθε δείγμα, από τους διαφορετικούς απλότυπους παρουσιάζονται στον πίνακα 10 :

Πίνακας 10: Οι απλότυποι των γονιδίων DRB και DQA

Δείγματα	DRB	DQA
Άρτα Πουρνάρι 1	9	5
Κόνιτσα 1	8	2+6
Μουργκάνα 3	10	5
Πρέβεζα 1	9	6
Εκτροφείο 9	10	5
Καλάβρυτα 1	1+8	5
Βέρμιο Βέροια 1	1+9	5+9
Σέρρες 1	3	5
Δράμα 1	3	9
Δράμα 3	3+8	9
Δράμα 5	8	5
Πετρίτσι 1	8	5
Πετρίτσι 2	1	5+8
Πετρίτσι 3	8	5
Πετρίτσι 4	8	5+9
Πετρίτσι 6	1+8	9
Πετρίτσι 9	8	5
Πετρίτσι 10	8	5
Πετρίτσι 14	3	5+8
Πετρίτσι 17	8	5
Πετρίτσι 18	8	5
Πετρίτσι 20	8	5
Πετρίτσι 21	3	5

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι :

A. DQA

```
          10      20      30      40      50      60      70      80
          |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
SLA-DQA*02  GGCTTAAATGCTACCAGTCTTACGGTCCCAGGGCTATTATACCCATGAATTTGATGGCGACGAGGAATTCTACGTGGA
SLA-DQA*05  .....T.....
SLA-DQA*06  .....T.....
SLA-DQA*08  .....T.....C.....
SLA-DQA*09  .....T.....

          90      100     110     120     130     140     150     160
          |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
SLA-DQA*02  CCTGGAGAAGAAGGAGACTGTCTGGCGGCTGCCTCTGTTTAGTGAATTTACAAGTTTGAACCCGAGGGTGCACCTGAGGA
SLA-DQA*05  .....A.....CA.....
SLA-DQA*06  .....
SLA-DQA*08  .....A.....CA.....
SLA-DQA*09  .....A.....AA.....G.....

          170     180     190
          |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
SLA-DQA*02  ATATAGCTACGTTAAACATAACTTGAACATC
SLA-DQA*05  .C.....
SLA-DQA*06  .....GG...TC.T..
SLA-DQA*08  .C.....GC.....T.....
SLA-DQA*09  .C.....
```

B. DRB

```
          10      20      30      40      50      60      70      80
          |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
SLA-DRB1*01  GGGACCGAGCGGGTGAGGTTATTGGAGAGGCAGTACTATAACGGAGAGGAGTTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGCGCA
```

SLA-DRB1*03A.G.....

SLA-DRB1*08C.A.....CA.G.....

SLA-DRB1*09A.....

SLA-DRB1*10C.T.....A.T.....T.....

90 100 110 120 130 140 150 160

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

SLA-DRB1*01 GTACCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACGCCAAGGACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCAGAGACGGG

SLA-DRB1*03G.....C.....G.....

SLA-DRB1*08T.....C.....TG.....

SLA-DRB1*09C.....G.....

SLA-DRB1*10T.....A.....G.....A.....G.....

170 180 190

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

SLA-DRB1*01 CGGCGGTGGACACGTACTGCAGACACAACCTACAGGATC

SLA-DRB1*03 ...A.....C.

SLA-DRB1*08|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

SLA-DRB1*09 ...A.....C.....

SLA-DRB1*10 ...A.....

7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή τη μελέτη θέλαμε να ελέγξουμε την ύπαρξη ή όχι συσχέτισης μεταξύ της προσβολής των αγριόχοιρων από τον ιό της Ηπατίτιδας Ε και της ποικιλομορφίας του ΜΗC II.

Στην έρευνα αυτή, κανένα από τα είκοσι τρία δείγματα δε βρέθηκε θετικό στον ιό της Ηπατίτιδας Ε. Το γεγονός ότι δε βρέθηκαν θετικά δείγματα, μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό αγριόχοιρων που εξετάστηκαν. Ένας ακόμα λόγος μπορεί να είναι ότι η PCR ανιχνεύει πάνω από ένα συγκεκριμένο αριθμό αντιγράφων. Επομένως, εάν ένα ζώο είχε μόλις προσβληθεί από τον ιό, πιθανόν να μην μπορούσε να ανιχνευθεί μέσω της PCR, όπως, επίσης και εάν είχε προσβληθεί και ο οργανισμός του ζώου είχε αντιμετωπίσει τη λοίμωξη. Σε ανάλογες μελέτες, το ποσοστό προσβολής των αγριόχοιρων στην Ηπατίτιδα Ε που παρατηρήθηκε στην γειτονική Ιταλία ήταν 25% και στην Γαλλία 2,5%.

Από την ανάλυση των γονιδίων DRB και DQA, το ποσοστό ποικιλομορφίας που παρατηρήθηκε, κυμάνθηκε από 34,7% για το γονίδιο DRB έως 26,1% για το γονίδιο DQA (από τα 23 άτομα προέκυψαν οκτώ και έξι διαφορετικοί συνδυασμοί αλληλομόρφων για τα δύο γονίδια, αντίστοιχα). Αντιθέτως παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας και για τα δύο γονίδια, 26,1% για το γονίδιο DRB και 21,8% για το γονίδιο DQA.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ο περιορισμένος πολυμορφισμός στο ΜΗC ερμηνεύεται ως το αποτέλεσμα μιας στενωπού του πληθυσμού (Axtner & Sommer, 2007). Είναι παραδεκτό, ότι στους μικρούς πληθυσμούς και στα απειλούμενα είδη παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού και η θνησιμότητα από παθογόνα και παράσιτα μπορεί να είναι μια σημαντική απειλή (Hedrick *et al.*, 2000). Μια τέτοια εξήγηση φαίνεται να ταιριάζει με την εξελικτική ιστορία του

αγριόχοιρου. Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος είναι ένα σημαντικό θήραμα το οποίο έχει υποστεί στο παρελθόν μετεγκαταστάσεις και τοπικούς αφανισμούς εξαιτίας της αλόγιστης θήρευσης που κατέληξε σε μεγάλη δημογραφική μείωση (Vernesi *et al.*, 2003, Scandura *et al.*, 2008). Είδη τα οποία έχουν υποστεί πληθυσμιακές στενωπούς διατηρούν κάποια επίπεδα του πολυμορφισμού τους στο MHC μέσω της ισοζυγούσας επιλογής.

Από την έρευνα αυτή, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ του γενετικού προτύπου του αγριόχοιρου και του ιού της Ηπατίτιδας Ε. Θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, με τεχνικές που ανιχνεύουν και μικρό αριθμό αντιγράφων του ιού, ώστε να μην έχουμε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον, θα πρέπει να αναλυθεί μεγαλύτερο μήκος των γονιδίων DQA και DRB καθώς επίσης και μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσοποιητική απόκριση.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ando, A & Chardon, P. 2006. Gene organization and polymorphism of the swine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 77:127–137.

Arankalle, V.; Chobe, L. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: Evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox. Sang.* 2000, 79, 72–74. Kumar, A.; Beniwal, M.; Kar, P.; Sharma, J.; Murthy, N. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J.Gynecol. Obstet.* 2004, 85, 240–244.

Arankalle, V.; Joshi, M.; Kulkarni, A.; Gandhe, S.; Chobe, L.; Rautmare, S.; Mishra, A.; Padbidri, V. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral Hepat.* 2001, 8, 223–227.

Axtner, J & Sommer, S. 2007. Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Immunogenetics* 5:417-26.

Balayan, M.S., Andjaparidze, 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, 23–31

Barbisan, F, Savio, C, Bertorelle, G, Patarnello, T & Congiu, L. 2009. Duplication polymorphism at MHC class II DRB1 locus in the wild boar (*Sus scrofa*). *Immunogenetics* 61(2):145-151.

Batts, W.; Yun, S.; Hedrick, R.; Winton, J. A novel member of the family hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 2011, 158, 116–123.

Benacerraf, B. 1981. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212:1229–1238

Bodewes, R., van der Giessen, J., Haagmans, B. L., Osterhaus, A. D. M. E. & Smits, S. L. (2013). Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J Virol* 87, 7758–7764.

Bondinas P George., Antonis K. Moustakas ,George K. Papadopoulos, The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function, *Immunogenetics* (2007) 59:539–553

Bouquet J 2012, Genetic characterization and codon usage bias of full-length Hepatitis E virus sequences shed new lights on genotypic distribution, host restriction and genome evolution

Bouwknegt et al., 2008, Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res.* 2008 Sep-Oct;39(5):40

Brunette, G.W., Kozarsky, P., Magill, A.J., Shliml, D.R., Whatley, A.D., Eds; Mosby: St. Louis, MO, USA, 2009; pp. 335–337.

Caron M, Enouf V, Than SC, Dellamonica L, Buisson Y, Nicand E. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 2006;44:3440–2.

Chardon, P, Renard, C, Gaillard, CR & Vaiman, M. 2000. The porcine major histocompatibility complex and paralagous regions: a review. *Genet Sel Evol.* 32:109–128.

Chibber, R.; Usmani, M.; Al-Sibai, M. Should HEV infected mothers breast feed? *Arch.Gynecol. Obstet.* 2004, 270, 15–20.

Clemente-Casares P1, Pina S, Buti M, Jardi R, MartIn M, Bofill-Mas S, Girones R., 2003, Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries., *Emerg Infect Dis.* ;9(4):448-54

Clemente-Casares, P.; Pina, S.; Buti, M.; Jardí, R.; Martín, M.; Bofill-Mas, Girones, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9, 448–454.

Coico, R, Sunshine, G & Benjamini, E. 2003. Immunology, a short course. 5th ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc.

Cossaboom, C.; Córdoba, L.; Dryman, B.; Meng, X.J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 17, 2047–2049

Danielle M. Yugo and Xiang-Jin Meng Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10

Danielle M. Yugo and Xiang-Jin Meng, Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 4507-4533

De Deus, N.; Peralta, B.; Pina, S.; Allepuz, A.; Mateu, E.; Vidal, D.; Ruiz-Fons, F.; Martín, M.; Gortazar, C.; Segales, J. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet. Microbiol.* 2008, 129, 163–170

Donald B. Smith, Peter Simmonds, members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Shahid Jameel, Suzanne U. Emerson, Tim J. Harrison, Xiang-Jin Meng, Hiroaki Okamoto, Wim H. M. Van der Poel⁷ and Michael A. Purdy, Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae, *logy* (2014), 95, 2223–2232

dos Santos DR1, 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

Drexler, Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family *Hepeviridae*, *Journal of Virology*, September 2012, Volume 86, Number 17 p. 9134–9147

El-Tras, W.F.; Tayel, A.A.; El-Kady, N.N. Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses Public Health* 2012, *60*, 244–251.

Emerson SU, Purcell RH.,2003, Hepatitis E virus., *Rev Med Virol.*;13(3):145-54. Review.

Emerson, S.; Purcell, R. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* **2003**, *13*, 145–154.

Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, et al. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 1999; *80*: 681–690

Ferren J. Frank, Gibbs J. Paul, Murphy A. Frederick, Studdert J. Rudolf Rott Michael, White O. David, 1993, *Veterinary Virology*, second edition.

Flajnik, MF & Kasahara, M. 2001. Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* *15*:351–362.

Forgach, P.; Nowotny, N.; Erdelyi, K.; Boncz, A.; Zentai, J.; Szucs, G.; Reuter, G.; Bakonyi, T. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet. Microbiol.* 2010, *143*, 106–116

Garkavenko, O.; Obriadina, A.; Meng, J.; Anderson, D.A.; Benard, H.J.; Schroeder, B.A.; Khudyakov, Y.E.; Fields, H.A.; Croxson, M.C. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J. Med. Virol.* 2001, *65*, 525–529

Geng Y, 2011, The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China,

Geng, Y.; Wang, C.; Zhao, C.; Yu, X.; Harrison, T.J.; Tian, K.; Wang, Y. Serological prevalence of hepatitis E virus in domestic animals and diversity of genotype 4 hepatitis E virus in China. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 2010, *10*, 765–770

Goldsby, R, Kindt, T, Osborne, B & Kuby, J. 2003. *Immunology*. 5th ed. New York: Freeman and Company.

Goldsby, R, Kindt, T, Osborne, B & Kuby, J. 2003. Immunology. 5th ed. New York: Freeman and Company.

Gorer, PA. 1937. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol.* 44:691–697

Gorer, PA. 1937. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol.* 44:691–697.

Haagsma B. Elizabeth, Hubert G. M. Niesters, Arie P. van den Berg, Annelies Riezebos-Brilman, Robert J. Porte, Harry Vennema, Johan H. J. Reimerink, and Marion P. G. Koopman Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Liver Transplant Recipients , *LIVER TRANSPLANTATION* 15:1225-1228, 2009

Haqshenas, G.; Shivaprasad, H.; Woolcock, P.; Read, D.; Meng, X.J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 2449–2462.

Hedrick, PW & Kim, TJ. 2000. Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of the major histocompatibility complex variation. In: *Evolutionary Genetics. From Molecules to Morphology* (eds. R. S. Singh & C. B. Krimbas), pp. 204-234. Cambridge University Press, Cambridge.

Hopf, A. 1979. *Pigs: Wild and Tame*. Holiday House, NY.

Hu GD, Ma X., Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region, *Bing Du Xue Bao*. 2010 Jan;26(1):27-32.

Huang F. F., Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV, *Journal of General Virology* (2004), 85, 1609–1618

Huang, F.F.; Haqshenas, G.; Shivaprasad, H.L.; Guenette, D.K.; Woolcock, P.R.; Larsen, C.T.; Pierson, F.W.; Elvinger, F.; Toth, T.E.; Meng, X.J. Heterogeneity and seroprevalence

of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4197–4202.

Ippagunta, S.K.; Naik, S.; Sharma, B.; Aggarwal, R. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: Frequency and seasonal pattern. *Med. Virol.* 2007, 79, 1827–1831.

Izopet, J.; Dubois, M.; Bertagnoli, S.; Lhomme, S.; Marchandeu, S.; Boucher, S.; Kamar, N.; Abravanel, F.; Guerin, J.L. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 1274–1281

Jay Lin, Helene Norder, Henrik Uhlhorn, Sandor Belak and Frederik Widen, Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose, *Journal of General Virology* (2014), 95, 557–570

Jothikumar, N.; Aparna, K.; Kamatchiammal, S.; Paulmurugan, R.; Saravanadevi, S.; Khanna, P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59, 2558–2562.

Kaba, M.; Davoust, B.; Marié, J.L.; Colson, P. Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. *Vet. J.* 2010, 186, 259–261.

Karina Acevedo-Whitehouse and Andrew A. Cunningham, 2006 Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics?, *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.21 No.8

Kasahara, M. 1997. New Insights into the Genomic Organization and Origin of the Major Histocompatibility Complex: Role of Chromosomal (genome) Duplication in the Emergence of the Adaptive Immune System. *Hereditas* 127:59-65.

Klein, J, Sato, A, Nagl, S & O'hUigin, C. 1998. Molecular transspecies polymorphism. *Ann Rev Ecol Systemat.* 29, 1–21

Klein, J. 1986. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. *Wiley, New York.*

Klein, J. 1986. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley, New York.

Krog JS, Breum S, Jensen TH, Larsen LE, Hepatitis E virus variant in farmed mink, Denmark, *Emerg Infect Dis.* 2013 Dec;19(12):2028-30

Kumar S, Pujhari SK, Chawala Y, Chakraborti A, Ratho RK. Molecular detection and sequence analysis of hepatitis E virus in patients with viral hepatitis from North India. *Diag Microbiol Infect Dis* 2011;71:110–7.

Lack, J.; Volk, K.; van den Bussche, R. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 1268–1273.

Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A.,2005, Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science.* 11;307(5715):1618-21.

Leblanc, D.; Ward, P.; Gagné, M.J.; Poitras, E.; Müller, P.; Trottier, Y.L.; Simard, C.; Houde, A. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 117, 160–166.

Li TC, 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

Li TC, Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Takaji W, Maeda K.,2015, Ferret hepatitis E virus infection in Japan., *Jpn J Infect Dis.*;68(1):60-2

Li, T.-C., Yang, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Asanuma, H., Takeda, N. & Takaji, W. (2014). Complete genome of hepatitis E virus from laboratory ferrets. *Emerg Infect Dis* 20, 709–712.

Li, T.C.; Ami, Y.; Suzaki, Y.; Takeda, N.; Takaji, W. No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 1343–1345.

- Li, T.C.; Saito, M.; Ogura, G.; Ishibashi, O.; Miyamura, T.; Takeda, N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006, 74, 932–936.
- Li, W.; Guan, D.; Su, J.; Takeda, N.; Wakita, T.; Li, T.C.; Ke, C.W. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet. Microbiol.* 2013, 165, 275–280.
- Lin J, Norder H, Uhlhorn H, Belák S, Widén F.,2014, Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose., *J Gen Virol.*;95(Pt 3):557-70
- Ling Lu, 2005, Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis Emerson SU, Purcell RH. *Hepatitis E virus. Rev Med Virol* 2003; 13: 145–154.
- Martelli, F.; Caprioli, A.; Zengarini, M.; Marata, A.; Fiegna, C.; di Bartolo, I.; Ruggeri, F.; Delogu, M.; Ostanello, F. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 2008, 126, 74–81
- Matsubayashi, K.; Kang, J.H.; Sakata, H.; Takahashi, K.; Shindo, M.; Kato, M.; Sato, S.; Kato, T.; Nishimori, H.; Tsuji, K.; *et al.* A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 2008, 48, 1368–1375.
- Medrano, C.; Boadella, M.; Barrios, H.; Cantu, A.; Garcia, Z.; de la Fuente, J.; Gortazar, C. Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 1372–1374.
- Meng et al. ,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.
- Meng, X.J. Swine hepatitis E virus: Cross-species infection and risk in xenotransplantation. In *Xeno-transplantation*; Salomon, D.R., Wilson, C., Eds; Springer: Berlin, Germany, 2003; pp. 185–216.
- Meng, X.J., Shivaprasad, H.L., Payne, C., 2008. Hepatitis E virus infections. In: Saif, M., et al. (Eds.), *Diseases of Poultry*. 12th ed. Blackwell Publishing Press, pp. 443–452.

Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006. Swine hepatitis E virus. In: Straw, B.E., et al., (Eds.), Diseases of Swine. 9th ed. Blackwell Publishing Press, pp. 537–545.

Meng, X.J.; Dea, S.; Engle, R.E.; Friendship, R.; Lyoo, Y.S.; Sirinarumitr, T.; Urairong, K.; Wang, D.; Wong, D.; Yoo, D.; *et al.* Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.* 1999, *59*, 297–302.

Meng, X.J.; Wiseman, B.; Elvinger, F.; Guenette, D.; Toth, T.; Engle, R.; Emerson, S.; Purcell, R. 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.* 2002, *40*, 117–122.

Moutou KA1, Koutsogiannouli EA, Stamatis C, Billinis C, Kalbe C, Scandura M, Mamuris Z., 2013, Domestication does not narrow MHC diversity in *Sus scrofa*. *Immunogenetics*. 2013 Mar;65(3):195-209

Mulyanto; Depamede, S.N.; Sriasih, M.; Takahashi, M.; Nagashima, S.; Jirintai, S.; Nishizawa, T.; Okamoto, H. Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch. Virol.* 2013, *158*, 87–96.

Nakamura, M.; Takahashi, K.; Taira, K.; Taira, M.; Ohno, A.; Sakugawa, H.; Arai, M.; Mishiro, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 2006, *34*, 137–140

Nakamura M, Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatology Research* 34 (2006) 137–140

Nassim Kamar et al, 2012, Hepatitis E, *Lancet* 2012; 379: 2477–88

Nei, M & Hughes, AL. 1991a. Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In: Selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds) *Evolution at the molecular level*. Sinauer, Sunderland, Mass: 222-247.

NIDAIRA , Detection and Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Viruses from Mongooses in Okinawa, Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 74(12): 1665–1668, 2012

Nowak, R. 1991. *Walker's Mammals of the World*, 5th ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.

O'Callaghan, CA & Bell, JI. 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Immunol Rev.* 163:129–138. Parham, P. 1999. Virtual reality in the MHC. *Immunol Rev.* 167: 5-15.

Pavio, N.; Meng, X.J.; Renou, C. Zoonotic hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* 2010, 41, 46, doi:10.1051/vetres/2010018.

Pina, S.; Buti, M.; Cotrina, M.; Piella, J.; Girones, R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.* 2000, 33, 826–833.

Porter, V. 1993. *Pigs - A Handbook to the Breeds of the World*. Cornell University Press, NY.

Pudupakam R. S., Scott P. Kenney, Laura Co'rdoba, Yao-Wei Huang, Barbara A. Dryman, Tanya LeRoith, F. William Pierson, and Xiang-Jin Meng, Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis E virus reveals It's involvement in the efficiency of viral RNA replication, *JOURNAL OF VIROLOGY*, Oct. 2011, p. 10031–10040, Vol. 85, No. 19

Pudupakam R. S., Y. W. Huang, T. Opriessnig, P. G. Halbur, F. W. Pierson, and X. J. Meng, Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo., *JOURNAL OF VIROLOGY*, Jan. 2009, p. 384–395 Vol. 83, No. 1

Purcell, Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 12, December 2011

Rachana M. Chibber · M. Assad Usmani, Mohammed H. Al-Sibai, Should HEV infected mothers breast feed , *Arch Gynecol Obstet* (2004) 270:15–20

Raj, V.; Smits, S.; Pas, S.; Provacia, L.; Moorman-Roest, H.; Osterhaus, A.; Haagmans, B. Novel hepatitis E virus in ferrets, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 1369–1370.

Renard C, The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex., *Genomics* 88 (2006) 96–110

Renard, C, Hart, E, Sehra, H, Beasley, H, Coggill, P, Howe, K, Harrow, J, Gilbert, J, Sims, S, Rogers, J, Ando, A, Shigenari, A, Shiina, T, Inoko, H, Chardon, P & Beck, S. 2006. The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. *Genomics* 88:96-110.

Reuter, G.B.; Fodor, D.; Forgách, P.; Kátai, A.; Szucs, G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.* 2009, 44, 277–281.

Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; Bouwknegt, M.; de Roda Husman, A.M. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 2007, 143, 112–116.

Sato, Y.; Sato, H.; Naka, K.; Furuya, S.; Tsukiji, H.; Kitagawa, K.; Sonoda, Y.; Usui, T.; Sakamoto, H.; Yoshino, S.; *et al.* A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: Identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch. Virol.* 2011, 156, 1345–1358.

Scandura, M, Iacolina, L, Crestanello, B, Pecchioli, E, Di Benedetto, MF, Russo, V, Davoli, R, Apollonio, M & Bertorelle, G. 2008. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Mol Ecol.* 7:1745-1762.

Schielke, A.; Sachs, K.; Lierz, M.; Appel, B.; Jansen, A.; Johne, R. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Viol. J.* 2009, 6, doi:10.1186/1743-422X-6-58.

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. J.* 2008, 175, 130–132.

sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004;330:505–10.

Smith, D. B., Purdy, M. A. & Simmonds, P. (2013). Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* 87, 4161–4169.

Snell, GD. 1981. Studies in histocompatibility. *Science* 213:172–178.

Storer, P. 1992. *Miniature Pigs*. Barron's Educational Series, Inc. NY.

Subrat Kumar, Subhra Subhadra, Bhupinder Singh, B.K. Pan, Hepatitis E virus: the current scenario, *International Journal of Infectious Diseases* 17 (2013) e228–e233

Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near complete nucleotide

Takahashi M, 2011, Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype

Takahashi M, Nishizawa T, Gotanda Y, Tsuda F, Komatsu F, Kawabata T, Hasegawa K, Altankhuu M, Chimedregzen U, Narantuya L, Hoshino H, Hino K, Kagawa Y, Okamoto H., 2004, High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia., *Clin Diagn Lab Immunol.*;11(2):392-8.

Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., Suzuki, T., Yamamoto, S., Shigemoto, K. & other authors (2014). Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in

Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 180, 59–69

Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Sato, H.; Sato, Y.; Jirintai, S.; Nagashima, S.; Okamoto, H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 2011, 92, 902–908

Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Tanaka, T.; Tsatsralt-Od, B.; Inoue, J.; Okamoto, H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 1807–1813

Takahashi, M.; Okamoto, H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol. Res.* 2013, doi:10.1111/hepr.12175

Takahashi, M.; Okamoto, H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan, *Hepatology Research* 2014; 44: 43–58

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 185: 120–131.

Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K.E., Reyes, G.R., 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120–131

Teo, C.G. Hepatitis E. In *CDC Health Information for International Travel 2010*;

Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA, et al. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:559–63.

Vaidya, S.; Tilekar, B.; Walimbe, A.; Arankalle, V. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J. Occup. Environ. Med.* 2003, 45, 1167–1170.

vanLoon, D. 1979. *Small-Scale Pig Raising*. Garden Way Publishing, Vermont.

- Vernes, C, Crestanello, B, Pecchioli, E, Tartari, D, Caramelli, D, Hauffe, H & Bertorelle, G. 2003. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Mol Ecol.* 3:585-595.
- Villadangos, JA. 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol.* 38:329–346.
- Vitral, C.L.; Pinto, M.A.; Lewis-Ximenez, L.L.; Khudyakov, Y.E.; dos Santos, D.R.; Gaspar, A.M. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2005, 100, 117–122.
- Wang Y, Ma X. Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region, *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2010 Jul;50(7):937-41
- Williams, A, Peh, CA & Elliott, T. 2002. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59:3–17.
- Withers, M.; Correa, M.; Morrow, M.; Stebbins, M.; Seriwatana, J.; Webster, W.; Boak, M.; Vaughn, D. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002, 66, 384–388
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tsang, A. K., Joseph, M., Wong, E. Y., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J. & other authors (2014). New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis* 20, 1044–1048.
- Worm HC , 2002, *Microbes and Infection* 4 (2002) 657–666
- Xie, T, Rowen, L, Aguado, B, Ahearn, ME, Madan, A, Qin, S, Campbell, RD & Hood L. 2003. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* 13:2621–2636.
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be foodborne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 2003;84:2351–7

Yeager, M & Hughes, A. 1999. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination and convergent evolution. *Immunol Rev.* 167:45-58.

Yugo DM, Meng XJ.,2013, Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission., *Int J Environ Res Public Health.*;10(10):4507-33

Zhao c, 2009, A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China

Zinkernagel RM, Dunlop MB, Doherty PC.,1975, Cytotoxic T cell activity is strain-specific in outbred mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus., *J Immunol.* ;115(6):1613-6.