



**KOYUN VE SIĞIRLARDA HEPATİT E VİRÜSÜNÜN
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ DNA DİZİ ANALİZİ**

Fadime TONBAK

Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa ATASEVER

Doktora Tezi-2019

**T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUN VE SIĞIRLARDA HEPATİT E VİRÜSÜNÜN
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ DNA DİZİ ANALİZİ**

Fadime TONBAK

**Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER**

**ERZURUM
2019**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**KOYUN VE SIĞIRLARDA HEPATİT E VİRÜSÜNÜN SEROLOJİK
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ DNA DİZİ
ANALİZİ**

Fadime TONBAK

Tez Savunma Tarihi : 09.09.2019

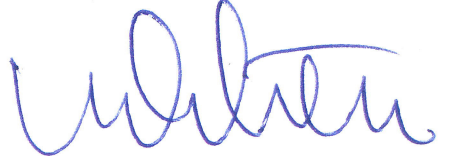




Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ATASEVER
(Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI
(Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Süleyman ALEMDAR
(Sivas Cumhuriyet Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL
(Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Demet ÇELEBİ
(Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukardaki tüm jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM-2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hepatit E Virüsü Taksonomisi ve Morfolojisi.....	5
2.2. Hepatit E Virüsü Genom Organizasyonu ve Proteinleri.....	6
2.3. HEV Genotipleri	7
2.3.1. Genotip 1 ve Genotip 2.....	8
2.3.2. Genotip 3.....	8
2.3.3. Genotip 4.....	9
2.3.4. Genotip 5 ve Genotip 6.....	10
2.3.5. Genotip 7.....	10
2.4. HEV Bulaşma Yolları.....	10
2.4.1. Su Kaynaklı Bulaşma.....	10
2.4.2. Gıda Kaynaklı Zoonotik Bulaşma	12
2.4.3. Temas Yoluyla Bulaşma	15
2.4.4. Vertikal Taşınma.....	17
2.5. HEV'in Bazı Hayvan Reservuarları	17
2.5.1. Primatlarda HEV	17

2.5.2. Domuzlarda HEV	18
2.5.2.1. Yaban Domuzlarında HEV	19
2.5.2.2. Evcil Domuzlarda HEV	20
2.5.3. Kanatlılarda HEV	21
2.5.4. Tavşanlarda HEV.....	23
2.5.5. Ratlarda HEV	25
2.6. Sığırlarda HEV Enfeksiyonları	27
2.7. Koyun ve Keçilerde HEV Enfeksiyonları	30
2.8. Türkiye’de Bazı HEV Çalışmaları.....	31
2.9. Gıdalarda HEV İnaktivasyonu.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	37
3.1. Örneklerin Toplanması	37
3.1.1. Sığır Örnekleri	37
3.1.2. Koyun Örnekleri	38
3.2. Serolojik Analizler	39
3.2.1. Anti-HEV IgG Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Araştırılması	39
3.3. Moleküler Analizler	41
3.3.1. Hücrelerin Lizisi ve RNA Ekstraksiyonu	41
3.3.2. Revers Transkripsiyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	43
3.3.3. DNA Sekans Analizi.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. ELISA Sonuçları.....	46
4.1.1. Sığır anti-HEV IgG Sonuçları.....	46
4.1.2. Koyun anti-HEV IgG Sonuçları	48
4.2. Moleküler Analiz Sonuçları.....	50

4.2.1. Sığır Revers Transkripsiyon PCR Sonuçları	50
4.2.2. Koyun Revers Transkripsiyon PCR Sonuçları	51
4.2.3. Sekans Sonuçları.....	52
4.2.4. Filogenetik Ağaç Modellemesinin Yapılması	53
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	70
EKLER	91
EK -1. ÖZGEÇMİŞ	91
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	92
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	93

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkılarıyla yöneten, her konuda desteğini ve tecrübesini esirgemeyen danışman hocam, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr. Mustafa ATASEVER'e, en derin saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında laboratuvar çalıŐmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Őükrü TONBAK'a, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Meryem AYDEMİR ATASEVER'e, Dr. Sevda URAR GELEN'e, bu çalışmayı 2018/6598 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ve Personellerine, çalıŐmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve yoğun eğitimim boyunca beni sabırla destekleyen çocuklarım Mustafa ve Türker TONBAK'a teşekkür ederim.

Dr. Fadime TONBAK

ÖZET

Koyun ve Sığırlarda Hepatit E Virüsünün Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi DNA Dizi Analizi

Amaç: Türkiye’de hayvanlarda, Hepatit E Virüsü (HEV)'nün serolojik ve moleküler prevalansı, genotipleri ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışma, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, sığır ve koyun kan serumlarında ve karaciğer dokularında HEV belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Sunulan çalışmada, 414 kan serumu ile 200 karaciğer dokusu olmak üzere, toplamda 614 örnekle çalışılmıştır. Bunlardan 194’ü sığır kan serumu ile 220’si koyun kan serumu ve 100’er adet karaciğer dokusu olarak belirlenmiştir. Örnekler, ELISA yöntemiyle anti-HEV IgG ve moleküler yöntemle HEV RNA yönünden incelendi.

Bulgular: Sığır kan serumları % 16.5 (32/194) ve koyun kan serumları % 5.0 (11/220) anti-HEV IgG seropozitif bulunmuştur. Elazığ kesimhanelerinden alınan sığır kan serum örneklerinde % 3.8 (3/78), koyun kan serum örneklerinde % 2.6 (2/76) HEV seroprevalansı belirlenmiştir. Diyarbakır ilinde % 33.3 (29/87) sığır HEV seroprevalansı belirlenirken, Malatya ilinde % 6.25 (9/144) koyun HEV seroprevalansı tespit edilmiştir. Moleküler analizler sonucunda, Elazığ sığır kan serum örneklerinin bir tanesinde HEV RNA genotip 3 bulunmuş olup % 97,58 oranında rat HEV’i ile benzerlik paylaştığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bulgular, sığır ve koyunlarda, HEV'e ait anti-IgG ve HEV RNA varlığının tespiti ile geçirilmiş bir HEV enfeksiyonunun olduğunu ve bu hayvanların ürünlerinin halk sağlığı açısından bir risk oluşturabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, sığır ve koyunlarda, HEV dolaşımının kanıtlarını gösteren ve farkındalık oluşturmaya rehberlik eden ilk rapor özelliğindedir. Hayvanlarda enfeksiyon asemptomatik seyirli olduğu için, gıda güvenliği açısından HEV’in yasal otoritelerce risk tabanlı kontrollerin yapılması yararlı olabilir. Sonuç olarak, HEV'nin önemi bakımından, multi konakçı rezervleri için, çeşitli hayvan türlerinde ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaati oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: ELISA, HEV, kan serumu, karaciğer, RT-PCR

ABSTRACT

Determination of Hepatitis E Virus in Sheep and Cattle by Serological and Molecular Methods DNA Series Analysis

Aim: Hepatitis E virus in animals in Turkey (HEV) has established serological and molecular prevalence data on genotype and epidemiological features are quite limited. The aim of this study was to determine HEV in blood sera and liver tissues of cattle and sheep in Eastern and Southeastern Anatolia.

Materials and Methods: In this study, a total of 614 samples, 414 blood sera and 200 liver tissues, were examined. Of these, 194 are bovine blood serum, 220 are sheep blood serum, and 100 cattle and 100 sheep liver tissues. The samples were examined for anti-HEV IgG by ELISA method and HEV RNA by molecular method.

Results: Bovine blood sera were 16.5% (32/194) and sheep blood sera 5.0% (11/220) anti-HEV IgG seropositive. HEV seroprevalence was found to be 3.8% (3/78) in bovine blood samples taken from Elazığ slaughterhouses and 2.6% (2/76) in sheep blood samples. Bovine HEV seroprevalence was determined in 33.3% (29/87) bovine samples from Diyarbakır province, and 6.25% (9/144) sheep HEV seroprevalence was detected in Malatya province. As a result of molecular analyzes, HEV RNA genotype 3 was found in one of the Elazığ bovine blood serum samples and it was found that 97.58% of them had similarity with rat HEV.

Conclusion: The findings indicate that there was a previous HEV infection in cattle and sheep by detecting the presence of HEV anti-IgG and HEV RNA. Therefore, it indicates that the products of these animals may pose a risk to public health. This study is the first report showing the evidence of HEV circulation and guiding awareness in cattle and sheep in Eastern and Southeastern Anatolia. Since HEV infection in animals is asymptomatic, it may be beneficial to conduct risk-based controls by HEV's legal authorities for food safety. As a result, the importance of HEV has resulted in the need for further studies in various animal species for multi-host reserves.

Keywords: Blood serum, ELISA, HEV, liver, RT-PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
BLSD	: Big Liver and Spleen Disease
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
HEV	: Hepatit E virüsü
HSS	: Hepatit-Splenomegali Sendromu
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IEM	: Immun Elektron mikroskobu
IFN	: Interferon
IgG	: Immunglobülin G
IgM	: Immunglobülin M
ORF	: Open Reading Frame
RBV	: Ribavirin
RNA	: Ribonucleic Acid
RT-PCR	: Transcription Polymerase Chain Reaction
UTR	: Untranslated Region

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Bazı hayvanlarda HEV'in ülkelere göre coğrafik dağılımı.....	3
Şekil 2.1. Hepeviridae ailesi filogenetik ağacı	6
Şekil 2.2. Orthohepevirus A genomunun temsili şematik görünümü.....	7
Şekil 2.3. HEV-1 ve HEV-2 genotiplerinin dünya çapında dağılımı	8
Şekil 2.4. HEV-3 genotiplerinin dünya çapında dağılımı	9
Şekil 2.5. HEV-4 genotiplerinin dünya çapında dağılımı	9
Şekil 4.1. ELISA uygulanan Sığır kan serum örneklerinde anti-HEV IgG sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü.....	48
Şekil 4.2. ELISA uygulanan koyun kan serum örneklerinde anti-HEV IgG sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü.....	50
Şekil 4.3. Sığır serum örneklerine ait PCR sonuçları agarozjel elektroforez görüntüsü	51
Şekil 4.4. Sığır kan serum örneğinin sekans benzerliği.....	53
Şekil 4.5. Filogenetik analiz	54

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. İllere göre sığır kan serum örnekleri dağılımı	38
Tablo 3.2. İllere göre sığır karaciğer örnekleri dağılımı	38
Tablo 3.3. İllere göre koyun kan serumu örnekleri dağılımı.....	39
Tablo 3.4. İllere göre koyun karaciğer örnekleri dağılımı	39
Tablo 3.5. HEV ORF-1 bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan kısmi primerler	43
Tablo 3.6. RT-PCR karışımı	43
Tablo 4.1. İllere göre sığır kan serum örneklerinde ELISA sonuçları	47
Tablo 4.2. İllere göre koyun kan serum örneklerinde ELISA sonuçları	49
Tablo 4.3. İllere göre sığır örneklerinde RT-PCR sonuçları.....	50
Tablo 4.4. İllere göre koyun örneklerinde RT-PCR sonuçları	52
Tablo 4.5. Sığır kan serum örneğinin ORF-1 bölgesine göre yapılan sekans dizilimi ..	53

1. GİRİŞ

Hepatit E virüsü (HEV), dünya çapında enterik yolla bulaşan viral hepatitin en yaygın nedenidir.¹⁻³ Önceleri sadece gelişmekte olan ülkelerle sınırlı olduğu düşünülürken son zamanlarda geniş bir coğrafi dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak HEV, yıllık 20 milyon tahmini enfeksiyonla, 3,3 milyon semptomatik vaka ve 50.000 ölümlle ilişkili önemli bir sağlık yükü getirmektedir.⁴ Hepatit E virüsünün doğal konağının insan olduğu bilinse de, son zamanlarda yapılan çalışmalarla zoonoz özellikle olduğu gösterilmiştir. HEV enfeksiyonu, evcil domuz, yaban domuzu, sika geyiği başta olmak üzere sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, rat, dağ gelinciği, deve ve kanatlı gibi pek çok hayvan türünde tespit edilmiştir.^{1,2,5-7}

HEV'nin varlığı ilk kez 1978 yılında Kashmir Vadisi'nde, akut hepatit salgınında ortaya çıkmıştır.⁸ O tarihte HEV, "Enterik taşınan A ve B olmayan hepatitis" olarak adlandırılmıştır. Gönüllü bir insana, HEV hastası bir kişiden hazırlanan fekal ektrat, deneysel olarak enfekte edilmiştir. Sonrasında akut hepatit gelişmiş ve küre şeklinde 27-30 nm büyüklüğünde virüs benzeri parçacıklar, hastanın dışkıсында elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir. Araştırmacı enfektif dışkı örneklerini, intravenöz yolla maymunlara vermiş ve deneysel enfeksiyon modelinde virüsü tanımlamıştır.⁹ Reyes ve ark.¹⁰ 1990'ların başında, enfekte sinomolgus maymunlarının safrasından HEV tespit etmişlerdir. Sonraki bir çalışmada ise bunun tam genom dizisi çıkarılmıştır.¹¹

Domuzlar HEV için tanınmış bir rezervuardır ve domuz yetiştiricileri zoonotik HEV enfeksiyonu için artmış risk altındadır. Sporadik hepatit E vakaları, domuz eti, sosis tüketimi ve geyik eti gibi çiğ veya az pişmiş hayvan etlerinin tüketimi ile bağlantılıdır. Dışkıyla büyük miktarlarda virüs saçıldığı için, hayvan gübresi arazi ve akarsular ile sulama ve içme suyunu kirletebilir, tarımsal ürün veya kabuklu deniz ürünleri kontaminasyona uğrayabilir. Domuz HEV RNA'sı domuz gübresinde,

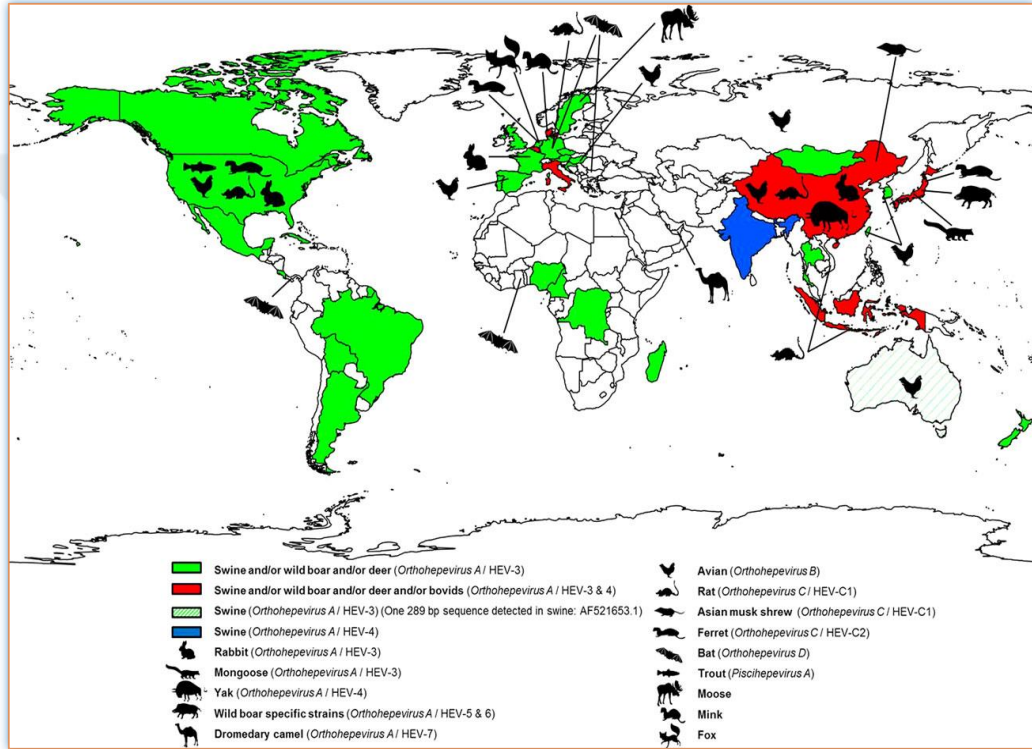
kanalizasyon suyu ve istiridyelerde tespit edilmiştir. Kontamine kabuklu deniz hayvanlarının tüketimi de hepatit E'nin sporadik vakalarında rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle HEV'nin hayvan suşları, sadece zoonotik bir risk değil aynı zamanda gıda ve çevre güvenliği endişeleri açısından da önemlidir.¹²

HEV, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde akut viral hepatitin önde gelen nedenlerinden biri olarak tanımlanmış, önceleri gelişmiş ülkelerde hiperendemik ülkelere (Seyahatle) ithal edilen bir hastalık olarak düşünülmüştür. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalardan elde edilen veriler HEV'in epidemiyolojisi hakkındaki bilgilerimizi büyük ölçüde değiştirmiştir. Daha önceki inançların aksine, sağlıklı bireylerde artan sayıda yüksek anti-HEV IgG yaygınlığının olması özellikle, Japonya ve Avrupa başta olmak üzere, birçok gelişmiş ülkede endemik bir hastalık olduğunu göstermektedir. Dahası, bu ülkelerde bir domuz rezervuarı ve artan zoonotik bulaşma bulguları da son zamanlarda daha sık bildirilmiştir.¹³

Hepeviridae ailesinin Orthohepevirüs genusunda yer alan Hepatit E virüsü insanlarda semptomatik olarak, hayvanlarda ise daha çok asemptomatik seyirli enfeksiyon oluşturan zoonotik bir patojendir. Çevresel şartlara oldukça dirençli olan bu virüs zarfsız, tek iplikli, ikozahedral yapılı, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür.^{3,14} İnsan ve birçok hayvanı enfekte eden HEV'in en az 7 genotipi kabul edilmiştir: Genotip 1 ve 2, gelişmekte olan ülkelere, daha çok insanlarla sınırlı ve epidemiler ile ilişkili iken genotip 3 ve 4 zoonotik olup hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere, insanları ve hayvanları etkileyen en sık görülen genotiptir.^{5,12}

Hepatit E, gıda ve su kaynaklarının fekal bulaşması yoluyla, yetersiz sanitasyonla sahip fakir ülkelere hiperendemik bir hastalık olarak görülmektedir.¹⁵ Kuzeybatı Çin (Xinjiang, Uygur)¹⁶, Güney Asya (Hindistan, Pakistan, Butan, Sri Lanka, Nepal ve Bangladeş), Güneydoğu Asya (Endonezya, Kamboçya, Tayland, Vietnam, Laos ve

Burma), Orta Asya'da bazı ülkeler (Tacikistan, Kazakistan ve Özbekistan) hiperendemik ülkeler arasında sayılabilir. Kuzey Afrika (Sudan, Cezayir, Tunus ve Fas), Doğu Afrika (Uganda, Kenya ve Burundi) ve Batı Afrika (Nijerya, Fildişi Sahilleri, Liberya ve Mali)¹⁷ bölgelerinde de hiperendemik ülkeler bulunmaktadır. Latin Amerika'daki Uruguay, Venezuela, Küba ve Meksika gibi birçok ülke de hiperendemik olarak kabul edilmiştir.¹⁸



Şekil 1.1. Bazı hayvanlarda HEV'in ülkelere göre coğrafik dağılımı¹⁹

Gelişmekte olan ülkelerde son zamanlardaki sosyoekonomik statüdeki iyileşme daha iyi bir sanitasyon ve su kaynaklarına erişmeye imkan sağlamaktadır. Bu sebeple HEV gelişmekte olan ülkelerde endemik bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır.²⁰ HEV, Ortadoğu'da Türkiye'nin de dahil olduğu birçok ülkede (Suudi Arabistan, Yemen, Libya, Umman, Bahreyn, İran, Kuveyt ve Birleşik Arap Emeklği) ve güneydoğu Asya'nın (Singapur) bazı bölgelerinde endemik olarak bildirilmiştir.^{20,21}

Zoonotik HEV enfeksiyonlarında, 1990'lı yılların sonundan itibaren, evcil domuz, firavunfaresi, tavuk, tavşan, alabalık, geyik, fare, yaban domuzu, rat, dağ gelinciği ve yarasa gibi geniş bir konak dağılımı göstermektedir.^{3,5,7} Zoonotik HEV taşınmasıyla ilişkili risklerin değerlendirilmesi ve doz-yanıt ilişkisi gibi çok önemli bilgileri hala eksiktir. Diğer gıda kaynaklı virüsler gibi Hepatit E virüsünün de kendisine özgü bir metabolizması bulunmaz. HEV zorunlu hücre içi bir mikroorganizma olup, uygun olmayan konak dışında çoğalamamaktadır. Bakteri ve mantarların üretildikleri kültür ortamlarında da üreyemezler.²² HEV'i üretmek için etkin bir in vitro hücre kültür modeli de bulunmamaktadır.²³ Bu nedenle HEV araştırmalarında bazı güçlükler yaşanmaktadır.

Domuz çiftlikleri ile kesimhanelerde, farklı hayvanlar ile orada çalışan işçiler arasında HEV enfeksiyonunu araştırılmıştır. Serum örnekleri, domuz, inek, koyun çiftliklerinde ve kesimhanelerde çalışan profesyonel işçilerden toplanmıştır. Erişkin domuzlarda, ineklerde, koyunlarda, genç domuzlarda, profesyonel grupta ve genel popülasyonda anti-HEV IgG pozitifliği sırasıyla % 98.23 (222/226), % 29.35 (54/184), % 9.80 (20/207), % 60.73 (99/164), % 42.51 (105/247) ve % 20.29 (522/2572) bulunmuştur. Fekal örneklerin HEV RNA pozitiflik oranı % 22.89 (19/83) bulunurken Filogenetik analizde genotip 4 tespit edilmiştir.²⁴ Geng ve ark.²⁵ çalışmasında ise sığır ve koyunlarda sırasıyla % 15.02 (52/346) ve % 9.88 (33/334) bulunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit E Virüsü Taksonomisi ve Morfolojisi

HEV, *The International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) önerisi ile Hepeviridae ailesinde sınıflandırılmıştır.²⁶⁻²⁸ Hepeviridae ailesi, Orthohepevirus ve Piscihepevirus olarak iki genusa ayrılır. Piscihepevirüs genusu, sadece bir üyeli (cutthroat alabalık virüsü) tür içerir. Orthohepevirus genusu ise dört türe ayrılır.²⁸

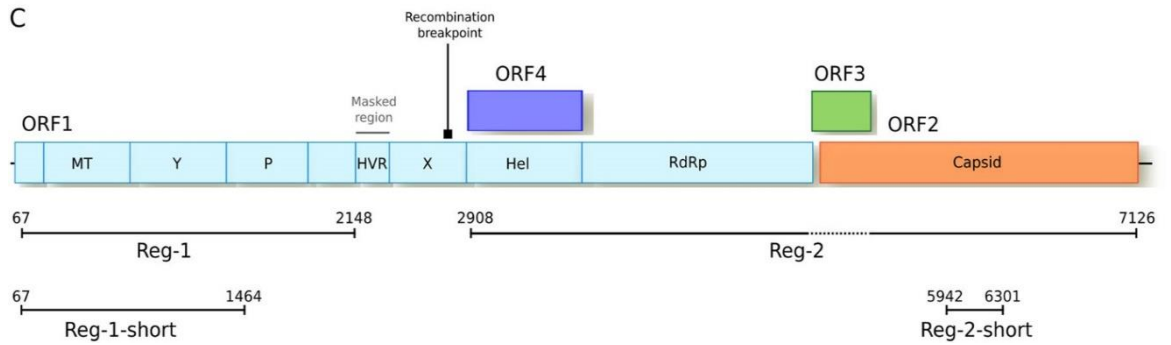
İnsan enfekte eden HEV suşları Orthohepevirus A türüne aittir. Genotipler 1 ve 2 (HEV-1 ve HEV-2) sadece insanları enfekte etmektedir. Genotipler 3 ve 4 (HEV-3 ve HEV-4) insan, domuz/yaban domuzu (HEV-5 ve HEV-6), geyik, firavun faresi, tavşan (HEV-3ra) ve deve (HEV-7 ve HEV-8) gibi hayvanları enfekte ettiği tespit edilmiştir.^{3,28}

Orthohepevirus B genusu, avian HEV-1, avian HEV-2 ve avian HEV-3 genotipleri kuş türlerinde tanımlanmıştır. Orthohepevirus C genusu ise dağ gelinciği, bandikut faresi, Asya misk faresi ve ratların izolatlarını içermektedir. Yarasaların Orthohepevirus D genusu ile enfekte olduğu görülmüştür. Memelilerde ve kuşlarda tanımlanan başka HEV dizileri, diğer HEV türleri ile uzaktan ilişkilidir ve sınıflandırılmamıştır.^{3,28}

Genomun ORF2 bölgesi, HEV'in tek yapısal kapsid proteini kodlamaktadır. Bu bölgede immunolojik olarak aktif özelliğe sahip proteinler sentezlenmektedir. Konak hücre ile virüs etkileşiminden sorumlu olan bu proteinler aynı zamanda virion komponentlerinin bir araya gelmesini sağlamaktadır.^{26,33}

Genomun ORF3 bölgesi birçok fonksiyonlu fosfoproteini kodlamaktadır. ORF3 proteinleri HEV için in vitro replikasyonda zorunlu olmasa da³⁴, virüsün konak hücreden dışarı çıkışında ve virulans için gerekli olduğu bildirilmiştir.³⁵ Memeli hücrelerinde ORF3'ün, çeşitli hücresel proteinlerle etkileşime girdiği, konakçı hücre ortamını kendi lehine düzenlediği gösterilmiştir. ORF3, viral replikasyon için uygun bir ortam oluşturarak konak inflamatuvar yanıtını azaltabileceği belirtilmiştir.³³ ORF3, immünoşüpresif olan α 1-mikroglobulin sekresyonu uyarmakta olduğu³⁶ ve virüs bulaştırılmış hücreleri korumak için önerilebileceği bildirilmiştir.³³

Alternatif bir okuma çerçevesi ORF4 tanımlanmış olsa da, helikaz alana dahil edilmiştir. ORF4 sadece HEV-1 için rapor edilmiştir.^{4,30}



Şekil 2.2. Orthohepevirus A genomunun temsili şematik görünümü⁴

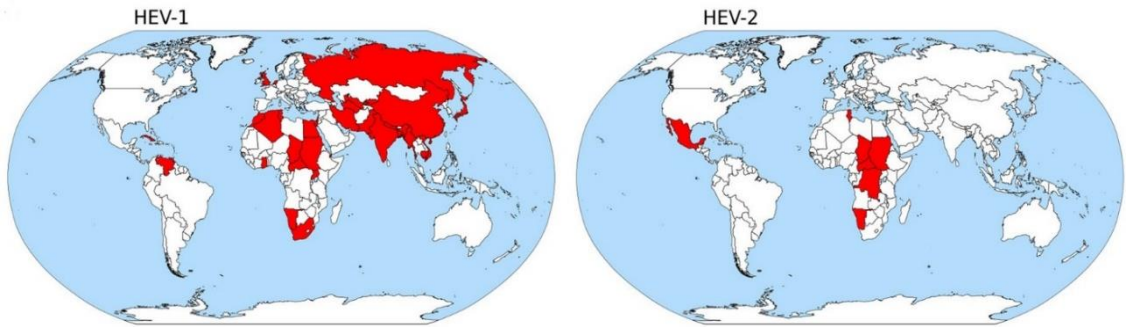
2.3. HEV Genotipleri

Gelişmekte olan ülkelerdeki HEV genotipleri coğrafik dağılımı, o bölgenin sosyo-ekonomik koşulları, sanitasyon düzeyleri, içilebilir temiz suya erişim ve

hayvanlarda zoonotik HEV enfeksiyonlarının varlığı ile belirlenen çeşitli hastalık tablosuna sahiptir.^{37,38}

2.3.1. Genotip 1 ve Genotip 2

HEV genotip 1 (HEV-1) ve HEV genotip 2 (HEV-2) sadece insanları enfekte etmekte ve herhangi bir hayvan rezervuarı tam olarak bilinmemektedir.³ Bu iki insan genotipinin neden olduğu hastalıklar kendi kendini sınırlandırmaktadır. Kronik hepatit ve siroz gibi tablolar bildirilmemiştir.²¹ HEV-1, pek çok yönden çalışılarak iyi tanımlanmış ve altı alt tipe (1a-1f) ayrılmıştır. HEV-2 ile ilgili olarak daha az verilere ulaşılmış ve 2 alt tipte (2a ve 2b) tanımlanmıştır.³⁹ HEV-1'e ait suşlar % 88.53 ile % 94.05 arasında değişen benzerlikte ve çoğunlukla Asya, Afrika ve Meksika'da bulunmuştur.⁴⁰ HEV-2 suşları ise daha çok Orta Amerika'da (Meksika) ve Afrika'da (Tchad, Nijerya) izole edilerek bildirimleri yapılmıştır.^{3,21}

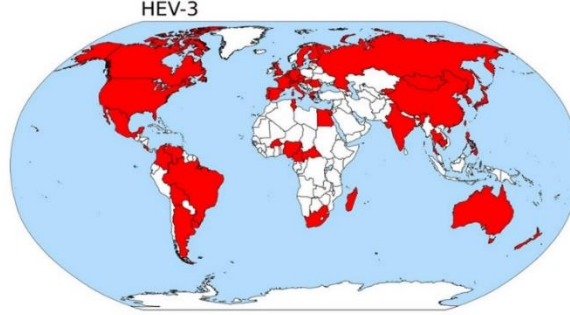


Şekil 2.3. HEV-1 ve HEV-2 genotiplerinin dünya çapında dağılımı⁴

2.3.2. Genotip 3

HEV genotip 3 (HEV-3) Genbank'ta en iyi tanımlanmış ve raporlanmış bir genotiptir. Çoğu dizisi, insanlardan, domuzlardan ve yaban domuzlarından kaynak almaktadır. HEV-3, % 78.74 ile % 82.46 benzerliğini paylaşan 10 alt tür (3a ile 3j) ve iki basamağa (3abchij ve 3efg) ayrılmıştır. HEV-3 enfeksiyonu küresel dağılıma sahiptir. Yani hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerden izole edilmiştir. Latin

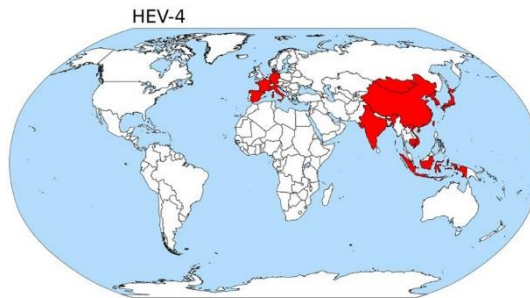
Amerika'dan Arjantin, Brezilya, Bolivya, Kuba, Venezuela, Meksika, Uruguay, Şili ve Kosta Rika gibi bazı ülkelerde, Rusya ve Kuzeydoğu Çin başta olmak üzere çokça rapor edilmiştir.^{3,4,21}



Şekil 2.4. HEV-3 genotiplerinin dünya çapında dağılımı⁴

2.3.3. Genotip 4

HEV genotip 4 (HEV-4) Asya ülkelerinde rapor edilmiş ve diğer genotiplerle % 71.79 ve% 77.38 arasında benzerlik paylaşımı yapmaktadır. Genellikle domuz, yaban domuzu ve insandan izole edilen dokuz alt türe (4a ile 4i) ayrılmıştır. HEV-4 domuzların dışında, koyun, inek, keçi ve kanatlı gibi diğer hayvanlarda da saptanmıştır.^{16,41} Bu türlerin HEV-4 rezervuarları mı yoksa kazaen konakçılar mı olduğu belirsizliğini korumaktadır. HEV-4 enfeksiyonları, Japonya dışında, Çin ve Güneydoğu Asya'da Endonezya, Kamboçya, Tayland, Vietnam, Laos ve Burma gibi çeşitli ülkelerde karşılaşılan baskın enfeksiyondur.^{3,21}



Şekil 2.5. HEV-4 genotiplerinin dünya çapında dağılımı⁴

2.3.4. Genotip 5 ve Genotip 6

HEV genotip 5 (HEV-5) ve HEV genotip 6 (HEV-6) sadece yaban domuzlarında açıklanmıştır. Kendi aralarında % 78'den fazla, diğer genotiplerle % 71.58-% 77.38 arasında benzerlik paylaşan, alt tip 5a ve 6a olarak bilinirler. Şimdiye kadar, bu genotiplerle ilişkili insan enfeksiyonu bildirilmemiştir.³

2.3.5. Genotip 7

HEV Genotip 7 (HEV-7) suşları son yıllarda develerden izole edilmiştir. Ortadoğu'da bir moleküler epidemiyoloji araştırmasında, 3 devenin fekal örneklerinden, genomik ve filogenetik analizler sonucu tespit edilmiştir.⁴² Düzenli olarak deve eti ve sütü tüketen, karaciğer transplantasyonu yapılan Ortadoğulu bir hastadan HEV filogenetik analizleri yapılmıştır. Araştırmacılar, deveden üretilen gıda ürünlerinin tüketimi sonucu hastaya, HEV genotip 7'nin bulaşabileceğini bildirmişlerdir.⁴³

2.4. HEV Bulaşma Yolları

Yapılan araştırmalar, hepatit E virüsünün ratlar, domuzlar, sığırlar, koyunlar, tavşanlar, tavuklar, kediler ve geyikler arasında aktarılabilirliğini göstermiştir. Vahşi ve yerli kemirgenler de anti-HEV antikörlerine sahip olduklarından, HEV'nin potansiyel rezervuarları olarak kabul edilirler.⁴⁴

2.4.1. Su Kaynaklı Bulaşma

Fekal-oral yolla bulaşma ve kontamine içme ve kullanma suları, hepatit E virüs bulaşmasının önemli bir yolunu oluşturmaktadır.²¹ Su kaynaklı HEV salgınlarının insanlarla sınırlı, genotip 1 ve 2 olduğu görülmüştür.^{3,7} Sosyoekonomik düzeyi düşük, yetersiz alt yapıya sahip ülkeler ile gelişmekte olan ülkelerde, büyük ölçekli HEV epidemileri, kontamine su kaynaklı olarak tespit edilmiştir.²¹

İsviçre'de seroprevalans çalışmalarında HEV'nin endemik olduğu vurgulanmış ve çevresel yayılmanın nedenleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, atık su arıtma

tesisinden giren ve çıkan su numuneleri alınmıştır. Arıtma tesisine giren 124 örnekten 40'ında düşük HEV konsantrasyonları tespit edilmiştir. HEV görülme sıklığı yaz aylarında kış mevsiminden daha yüksek bulunmuştur. Sadece bir örnekte HEV genotip I tespit edilirken diğer tüm pozitif örneklerde HEV genotipi 3 bulunmuştur. Araştırmacılar, HEV pozitif örneklerinde domuz dışkısı belirteci olan domuz adenovirüsünün saptanmadığını ve bunun, domuzların atık sularda HEV'nin doğrudan kaynağı olamayacağını vurgulamışlardır.⁴⁵

Tarımda arıtılmamış atık su kullanımı, hem işçileri hem de halkın sağlığını etkileyebilecek önemli bir sağlık riskidir. Türkiye'de yürütülen bir araştırmada, tarımda arıtılmamış atık su kullanan tarım işçilerinde, anti-HEV seropozitifliği % 34.8 iken kontrol grubunda bu oran % 4.4 olarak bulunmuştur.⁴⁶

Daha önce hiçbir salgının raporlanmamış olduğu kuzey Uganda'da su kaynaklı bir hepatit E salgını görülmüştür. Bu salgının, Afrika'da ve dünya genelinde en büyük hepatit E salgınlarından biri olduğu vurgulanmıştır. Salgın sonucu hastalığa 10.196 kişinin yakalandığı ve 160 ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir.⁴⁷ Araştırmacılar toplumda önceden maruziyetin olmaması sonucu yetersiz bağışıklığın, salgını kolaylaştırdığını da ifade etmişlerdir. HEV taşınmasının güncel olarak anlaşılmasında, etkili bir önleme ve kontrol çalışmasının, güvenli bir içme suyu tedariki, yeterli sanitasyon, uygun kişisel ve çevresel hijyenin sağlanmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, HEV'nin hızlı taşınması ve bu hastalığın uzun kuluçka süresinden ötürü, yeterli önleme tedbirlerinin zamanında alınması oldukça zor olmaktadır.

2.4.2. Gıda Kaynaklı Zoonotik Bulaşma

Pek çok gelişmiş ülkede HEV'in yayılmasında etken olarak çiğ karaciğerlerin süpermarketlerde satılması veya Avrupa'daki sosislerin tüketimi gösterilmiştir. Özellikle yarı pişirilmiş domuz eti veya karaciğeri tüketiminin HEV'nin vaka ve salgınlarından sorumlu olabileceği vurgulanmıştır.⁴⁸ HEV genotip-3 ve genotip-4'ün gıda kaynaklı zoonotik iletimi olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir.^{4,49,50}

Deneysel olmayan koşullar altında, HEV'in zoonotik bulaşma hipotezi ilk defa 1997'de Meng ve ark.⁵¹ tarafından bildirildi. Araştırmacılar, ABD'deki bir domuzdan insan HEV dizileri ile yüksek nükleotid ve amino asit benzerliği gösteren bir genotip 3 HEV suşunu tanımladılar. Sonraki bir çalışmada ise, HEV'nin zoonotik iletimi için araştırmacılar, insan HEV'ini domuzlara ve domuz HEV'ini de primatlara deneysel olarak vermişler ve çapraz iletimin olabileceğini göstermişlerdir.⁵² İleriki dönemlerde, insanlardan elde edilen HEV RNA'sı ile et ve et ürünleri de dahil olmak üzere diğer memeliler (özellikle domuz, yaban domuzu ve geyik) arasında kuvvetli bir filogenetik bağlantı olduğu görülmüştür.¹³

Japonya'da kontamine olmuş hayvan et ürünlerinin tüketilmesiyle HEV'nin zoonotik iletimi konusunda iki vaka bildirilmiştir.^{53,54} Enfeksiyon, Sika geyiği (suşi) ve yaban domuzu (ızgara) et tüketiminden 40 ile 60 gün sonra ortaya çıkmıştır. Her iki durumda da, HEV RNA, hastalarda olduğu gibi, dondurulmuş hayvan etinde başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Araştırma sonunda hastalardan alınan HEV viral dizileri ile dondurulmuş etlerden elde edilen HEV viral dizilerin % 99,95 benzerliğe sahip görülmüştür. Bu çalışma bilim çevresinde, hayvansal gıda ürünlerinin tüketimi yoluyla bulaşmanın zoonotik niteliğini teyit eder görülmüştür. Bu vakalardan birinde, etin HEV kontaminasyon dozu için, nicel RT-PCR ile etin gramında yaklaşık 10^5 genom olduğu tahmin edilmiştir.⁵⁴

Çiğ veya az pişmiş domuz ürünlerinin tüketilmesinden 14-60 gün sonra Hepatit E enfeksiyonu geliştiği tespit edilmiştir. Çeşitli araştırmalarda, yabani domuzu barbeküsü, çiğ yaban domuzu karaciğeri, ızgara veya pişmemiş domuz karaciğेरinin tüketilmesi sonucu HEV enfeksiyonu gelişmiştir. Aynı yemeği paylaşan hastalarda IgM ve IgG antikorları ile HEV RNA'sı saptanmıştır.⁵⁵⁻⁵⁸

Almanya'da bir vaka kontrol çalışmasında⁵⁹ vahşi domuz eti ve sakatat tüketimi ile HEV enfeksiyonunun risk faktörü değerlendirilmiştir. Bazı vakalarda, şüphelenilen ticari domuz karaciğेरlerinden ve domuz karaciğेर sosislerinden elde edilen HEV dizileri ile hastalardan elde edilen diziler yakından ilişkili bulunmuştur.¹³ Fransa'da (Marsilya) pişmemiş domuz eti ve karaciğेर sosisini yiyen hepatit E hastalarından elde edilen HEV RNA sekanslarında % 99 nükleotid benzerliği, sosisten elde edilenler ile benzer bulunmuştur.⁶⁰ Yine Endonezya'da domuz eti yiyen Hindu topluluklarında bulunan seroprevalansı, domuzun HEV rezervuarı olduğunu açıklar niteliktedir.⁶¹ Lee ve ark.⁴³ yaptıkları çalışmada, düzenli olarak deve eti ve sütü tüketen bir karaciğेर nakli hastasında, deveye ait HEV-7 suşu ile gıda kaynaklı bir enfeksiyon geliştiğini tespit etmişlerdir.

Her insanın hayatında vazgeçilmez bir gıda olan sütte HEV riskleri incelenmiştir. Chibber ve ark.⁶² HEV ile enfekte olmuş annelerin kolostrumunda bebeklerde emzikli dönem beslenme rolünü araştırmıştır. HEV ile enfekte annelerin kolostral örneklerinde anti-HEV antikor ve HEV RNA'sı tespit edilmiştir. Ancak maternal seviyelere kıyasla sütte daha düşük seviyelerde bulunmuştur. HEV ile enfekte annelerin kolostrumunda anti-HEV antikor ve HEV-RNA mevcut olmasına rağmen yine de anne sütünün güvenli olduğu bildirilmiştir.

Son zamanlarda yapılmış bir araştırmada, enfekte olmuş 52 hayvanın süt örneklerinde yüksek titrelerde HEV-RNA sağıdığı görülmüştür. Çalışmada, çiğ ve

pastörize edilmiş süt örneklerinden elde edilen HEV-RNA'nın hastalığı rhesus maymunlarına ilettiği de gösterilmiştir. Bununla birlikte, kısa bir kaynama süresinin HEV'i tamamen etkisiz kılma potansiyeline sahip olduğu da belirtilmiştir. Çalışmada, filogenetik analiz, inek sütünden elde edilen tüm HEV izolatlarının genotip 4'e ait olduğunu ortaya koymuştur.⁴¹

Türkiye'de farklı hayvan türlerinin sütleri üzerine yürütülen bir araştırmada 231 çiğ süt (48 inek sütü, 65 keçi sütü, 65 koyun sütü ve 53 eşek sütü) numunesi HEV RNA'nın miktar ve genotiplerini epidemiyolojik olarak araştırmak için kullanılmıştır. Toplamda 47 (% 20.34) çiğ süt örneği pozitif tespit edilirken bunun 14 tanesi inek sütünün (% 29,16), 12 keçi sütünün (% 18,46), 8 koyun sütünün (12,3) ve 13 eşek sütünün (% 24,5) HEV RNA pozitifliği bulunmuştur. İnek sütündeki HEV RNA miktarı hem oran hem de miktar bakımından en yüksek bulunmuştur. HEV genotiplerinin 47 pozitif örnekteki dağılımı incelendiğinde, 27 (% 57.44) HEV genotip 1a, 10 (% 21.27) HEV genotip 1b, 4 (% 8.5) HEV genotip 4c, 2 (% 4.2) HEV genotip 3a, 1 (2.13) HEV genotip 1c, 1 (% 2.13) HEV genotip 3e, 1 (% 2.13) HEV genotip 3f ve 1 (% 2.13) HEV genotip 3g belirlenmiştir.⁶³

HEV tarafından kontamine içme suyu veya kanalizasyon sularında beslenen kabuklu deniz hayvanları tüketimiyle enfeksiyonlar oluşabilmektedir.¹³ Güney Kore'de, domuzdan elde edilen HEV'e filogenetik olarak yakın olan HEV 3 genotipi bir istiridyede bildirilmiştir.⁶⁴ Midyelerde HEV-3 ve HEV-4 RNA'sı, Galiçya'da % 14.81⁶⁵, İskoçya'da % 85⁶⁶ oranında bulunmuştur. Kore'de kıyı bölgelerindeki istiridyelerde % 8.7⁶⁷ bulunurken, Japon nehirlerinden avlanan çift kabuklularda⁶⁸ ve Çin'in kıyı sularındaki kabuklu deniz canlılarında da⁶⁹ bulunmuştur.

Yukarıda tarif edildiği gibi, HEV RNA et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri ile deniz ürünlerinden meyve ve sebzeye kadar değişen çeşitli gıda ürünlerinde tespit

edilmiştir. Bununla birlikte, bulaşıcı virüsün hangi gıdalarda bulunup bulunmayacağı hala belirsizdir.³ Hepatit E virüsü enfeksiyonu için potansiyel bulaşma yolları incelenen bir araştırmada, hayvan rezervuarları ve çevresel örnekler üzerinde çalışılmıştır. Domuz karaciğeri, deniz suyu ve kanalizasyon örneklerinden elde edilen HEV suşları, insan HEV suşları ile % 93-100 oranında sekans benzerliği paylaşmıştır.⁷⁰

Avrupalı tüketicilere yönelik zoonoz riskli inekleri doğrulamak için, Belçika'da süt çiftlikleri incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen çiftliklerin dörtte biri karma çiftlik olup hem inekler hem de domuzlar barındırılıyormuş. Süt ve fekal örnekler, HEV RNA ve HEV-spesifik antikorları açısından analiz edilmiştir. Araştırmacılar karma çiftliklerden bazı domuzlarda aktif HEV enfeksiyonu kanıtı bulmasına rağmen, ineklerde aktif veya geçmiş HEV enfeksiyon belirtisi tespit edememişlerdir.⁷¹

2.4.3. Temas Yoluyla Bulaşma

HEV'ye maruz kalmanın olası diğer bir yolu, hayvanlarla doğrudan temastır. Domuzlarla yakın temasta olan veteriner hekimler, domuz yetiştiricileri ve mezbaha çalışanlarında yüksek anti-HEV antikor prevalansı bildirilmiştir.⁷² ABD'nin 8 eyaletinden, aynı yaşlarda, 295 veteriner hekimden oluşan bir araştırmada, domuz veteriner hekimlerinde % 27 oranında bulunan HEV antikor prevalansı, genel popülasyonda % 16 oranında bulunmuştur.⁷² Hem domuz veteriner hekimleri hem de normal kan vericilerinde yüksek seropozitiflik oranı daha çok büyük domuz üretimi yapan çiftliklerde bulunmuştur. Hollanda'da, domuz veteriner hekimi için yaklaşık % 11, domuz dışı veteriner hekimler için % 6 ve genel popülasyon için % 2'lik bir seroprevalans oranı bildirilmiştir.⁷³

Endemik ülkelerden Çin ve Tayland'da, domuz eti işleyenler, IgG anti-HEV yaygınlığı açısından test edilmiş ve bu kişilerin çoğu, HEV seropozitif olarak bulunmuştur.⁷⁴ İsveç'te yapılan başka bir çalışmada da, domuz yetiştiricileri arasında,

yüksek HEV antikorlarının prevalansı % 13 olarak gösterilmiştir.⁷⁵ Moldova'da, domuz yetiştiricilerinin yaklaşık % 51'inin IgG anti-HEV pozitif olduğu, buna karşılık mesleki olarak domuzlarla teması olmayan kontrol grubunda % 25 seropozitif tespit edilmiştir. Araştırmacılar, domuz ahır temizliği veya domuz doğumuna yardım eden çiftçilerin, kontrol grubundan seropozitif olma ihtimalini 2.46 kat daha yüksek olarak bildirmişler.⁷⁶ Çin'in Sincan bölgesinde koyun kesilen bir mezbahada çalışan kasapların HEV seroprevalansı % 57.7 olarak bulunmuştur.¹⁶ Araştırma sonuçlarına göre hayvanlarla temas, HEV'e maruz kalma riskini arttırmaktadır.

HEV enfeksiyonunun olası kaynağı arasında hayvan dışkı ya da gübresi de olabilir, çünkü büyük miktarlarda virüs dışkı yoluyla atılmaktadır. Bir çalışmada, gübre depolama tesislerinde (topraklı lagünler veya beton çukurlar) HEV varlığı araştırılmış ve HEV genomik RNA'sı 28 çiftliğin 7'sinde tespit edilmiştir. Çiftliklerin çevresinde test edilen su numunelerinin hiçbirinde pozitiflik bulunamamıştır. Kontamine olmuş atıklarda, 10³/60 ml oranında HEV belirlenmiş ve enfektif virus varlığı bir domuzda yapılan analiz ile de teyit edilmiştir.⁷⁷ Gübrenin depolanması ve yayılması ülkeden ülkeye farklılık gösterebilir ve bu olası bulaşma yolunu değerlendirmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

HEV ile enfekte annelerin kolostral örneklerinde anti-HEV antikor ve HEV RNA'sı maternal seviyelere kıyasla düşük olsa bile emzirme döneminde bebekle yakın temas sonucu bulaşmanın olabileceği bildirilmiştir.⁶² Ancak başka bir araştırmada sporadik hepatit E'nin kişiden kişiye bulaşmasının yaygın olmadığı bildirilmiştir.⁷⁸ Görüldüğü gibi HEV'le enfekte hayvan veya insandan temas yoluyla bulaşma olmasına rağmen, HEV'in hala araştırmaya muhtaç pek çok yönü bulunmaktadır.

2.4.4. Vertikal Taşınma

Enfekte anneden vertikal HEV iletimi, prematur doğumu da kapsayan yüksek fetal ve perinatal mortaliteye neden olduğu raporlanmıştır.^{79,80} HEV ile enfekte olan gebe kadınların yaklaşık % 33'ünde vertikal HEV taşınması tespit edilmiştir.⁸⁰

Hayvanlarda, avian HEV suşu ile deneysel olarak enfekte olan tavuklardan alınan embriyolu yumurta akında bulaşıcı HEV tespit edilmiş, ancak tam vertikal geçiş bulgusuna rastlanılmamıştır.⁸¹ Ayrıca, HEV genotip 3 ile gebe domuzlar ve makak maymunları enfekte edilmiş, ancak fetuslarda vertikal bulaşma saptanmamıştır.⁸² Bu nedenle, vertikal HEV iletimi potansiyel riskini kesin olarak anlamak için daha kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

2.5. HEV'in Bazı Hayvan Rezervuarları

Son yıllarda pek çok farklı hayvan türünde yeni HEV'ler tespit edilmiştir.⁸³ Orthohepevirus cinsi içinde, A-B-C-D olarak adlandırılan dört viral HEV türü, insan, domuz, yaban domuzu, tavuk, sıçan, yaban gelinciği, tavşan, mongoose, deve, inek, yaras²⁸, eşek, koyun ve keçi de dahil olmak üzere çok çeşitli memeli türlerini enfekte etmektedir. Çeşitli hayvanlarda gelen HEV suşlarının genetik olarak tanımlanması virüsün konakçı menziline ve genetik çeşitliliğinin geniş olduğunu göstermektedir.

2.5.1. Primatlarda HEV

HEV'in hücre kültürü sistemlerinde ve küçük hayvan modellerinde sınırlamalar nedeniyle çalışılması oldukça zor olmuştur.⁸⁴ Enterik yolla bulaşan Hepatit E'nin biyolojik parametrelerini incelemek için primat modelleri kullanılmıştır.^{84,85} Bu hayvanlar virüsün replikasyonu ve patojenezi hakkında bilgi edinmekte ve aşı geliştirmede önemli rol oynamıştır.⁸⁵

Hepatit E'nin biyolojik parametrelerini incelemek için primatlarda HEV enfeksiyonları üzerine yapılan bir çalışmada⁸⁴; HEV genotip 1 ve 3 enfeksiyonları

rhesus, sinomolgus makak ve şempanzelerde karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada genel olarak, farklı HEV genotiplerinin biyolojik özelliklerin, epidemiyolojik özelliklerini yansıttığını görmüşlerdir.

Primatların, HEV ile deneysel olarak enfekte edilmelerinin ardından doğal enfeksiyonu hakkında, vahşi yaşam ve hayvanat bahçesi maymunlarındaki durumları araştırılmıştır. 2001'den 2017'ye kadar uzanan 17 yıllık zaman diliminde Roma'da bir zooloji bahçesinde yedi farklı tür primattan 86 serum, serolojik ve moleküler olarak incelenmiştir. ELİSA testi kullanılarak, üç makakta (% 4.8; 3/62) ve beyaz taçlı bir mangabeyde (% 16.6; 1/6) IgG antikorları tespit edilmiştir. Genel toplamda % 4.6 (4/86) seroprevalans olduğu bildirilmiştir. Ancak IgM ve viral RNA için serumlar ile 17 dışkı numunesi RT-PCR ile analiz edildiğinde sonuçlar negatif bulunmuştur. Araştırmacılar, IgG antikorlarının saptanmasını bu ortamda yaşayan hayvanların HEV'e maruz kaldığını, geçirilmiş HEV enfeksiyonuna sahip olduklarını göstermiştir.⁸⁶

Duyarlı insanlar arasındaki subklinik iletiminin araştırıldığı HEV enfeksiyon araştırmasında, deneysel bir primat modeli hazırlanmıştır. Bu araştırmanın sonucunda, hayvanlar tarafından atılan virüsün canlılığı ve bulaşma potansiyeli doğrulanmıştır.⁸⁷ Ayrıca 2004-2006 yıllarında Japonya'da açık maymun yetiştirme tesislerinde bir hepatit E virüsü salgını ortaya çıkmıştır. Filogenetik analiz ile bu virüsün genotip 3 olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada HEV deneysel olarak bir sinomolgus maymuna da iletilmiştir.⁸⁸

2.5.2. Domuzlarda HEV

Domuzlar, HEV'nin önemli rezervuarları olarak kabul edilir ve bu nedenle ya doğrudan temas yoluyla veya çiğ ya da az pişmiş kontamine domuz ürünlerini tüketerek insanlara bulaşma riskini taşımaktadır. Avrupa domuz çiftlikleri üzerindeki bu hastalığın riski tahmin edildikten sonra, bu türlerde HEV enfeksiyonu ile ilişkili

faktörlerinin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür.⁸⁹ HEV ile enfekte olan domuzlarda, görülebilir ve mikroskopik karaciğer lezyonları ile viremi şekillenmiş, antikorlar oluşmuş ve dışkılarıyla canlı HEV atıldığı tespit edilmiş, aynı zamanda ekstrahepatik bölgelerin HEV replikasyonu yanıtları da gösterilmiştir.^{90,91}

Enfekte olan domuzlarda HEV, subklinik olarak seyreder ve genellikle 1-2 hafta süren geçici bir viremi ve yaklaşık 3-7 hafta süren dışkı ile virüs saçılmaktadır. Genellikle 2-4 aylık domuzlara bulaşmaktadır. Bu hayvanlarda, karaciğerde büyük patolojik lezyonlar görülmemiş ancak hepatosellüler nekroz ile karakterize mikroskopik lezyonlar gözlemlenmiştir.⁹¹ Domuzlar, HEV-3 ve HEV-4'ün doğal konakçısı olarak bildirilmektedir.^{52,91,92} Bununla birlikte domuzların, HEV-1 ve HEV-2 ile deneysel enfeksiyona dirençli olduğu görülmüştür.⁵² Çapraz tür iletim deneyleri, domuz modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Domuzlara, HEV'nin iki farklı tavşan suşu başarılı bir şekilde enfekte edilmiş, ancak ratlardan elde edilen HEV'ler de aynı başarı sağlanamamıştır.⁹³

HEV'in domuzlarda subklinik enfeksiyonla seyrettiği bildirilmiştir.³ Ancak, klinik hastalığa yakalanma veya karaciğer enzimi ALT'nin yükselmesi üzerine herhangi bir kanıt bulunamamıştır. Bu nedenle patojenite çalışmalarında kullanımı sınırlanmıştır. Ancak, doğal oluşan domuz modeli, HEV replikasyonu ve çapraz tür enfeksiyonunun incelenmesi için, domuzların çok daha yararlı olacağı bildirilmiştir.³

2.5.2.1. Yaban Domuzlarında HEV

Birçok ülkede yerel olarak yaşayan yaban domuzları bilinmektedir. Kırsal alanlardan şehir kenarlarına kadar her yerde, insan yerleşim değişiklikleri, tarımsal alanda daha fazla arazi kullanımı, orman tahribatı, eğlence amaçlı avlanma ve yaban domuzu eti tüketimi, yaban domuzlarının insanlara temas etme olasılığını artırmıştır.⁹⁹

Dünya çapındaki yaban domuzlarında tanımlanan HEV suşları çoğunlukla genotip 3 olarak bulunmuş, ancak nadiren de olsa genotip 4'e ait suşlar yaban domuzlarında tespit edilmiştir.^{100,101}

2.5.2.2. Evcil Domuzlarda HEV

Hepatit E virüsünün, zoonotik geçişinde genotipler 3 ve 4'ün aracılık ettiği önemli bir rezervuar görevi gördüğü bilinmektedir. Çin'de, domuz çiftlikleri üzerinde HEV enfeksiyonu prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, araştırmanın yürütüldüğü tüm çiftliklerin seropozitif olduğu görülmüş ve pozitif domuzların oranı % 1.6 ile % 37.5 arasında tespit edilmiştir. Domuz safrasında, fekal örneklerinde ve semeninde de HEV-4 genotipi bulunmuştur. Daha da önemlisi, domuz spermasındaki HEV RNA'sının saptanmasını gösteren ilk çalışma, suni tohumlamayla domuzlarda HEV'yi aktarabileceğini düşündürmektedir.⁸³

Yapılan bir çalışmada, evcil domuz tüketmiş bir kişinin, 2 ay sonra akut hepatit E semptomları göstermesi sonucu araştırma yapılmıştır. Hastadan elde edilen dizi ile yakından ilişkili HEV dizileri domuzlarda da tanımlanmış ve bunun % 94 benzer nükleotid dizisine sahip HEV genotip 3 suşuna ait olduğu gösterilmiştir.⁹⁴

Brezilya'da domuz çiftliklerinden alınan fekal ve serum örneklerinde, % 53.3 (8/15) oranında HEV pozitif sonuç veren çiftlikler bulunmuştur. Moleküler karakterizasyonda HEV-3 alt tipleri 3d, 3h ve 3i olarak filogenetik gruplamaları doğrulanmıştır.⁹⁵

Lopez ve ark.⁸⁹ HEV enfeksiyonunun yüksek prevalansı ile ilişkili faktörleri değerlendirdiği çalışmada, geniş alanlarda yetiştirilen domuzların, dar alanda yetiştirilenlerden daha yüksek bir HEV enfeksiyonu riski taşıdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 26 domuz çiftliğinde HEV ile ilişkili risk faktörlerinin değerlendirildiği çalışmada 1040 domuzu incelemiş ve % 16.5'lik bir prevalans tespit etmişlerdir.

Tibet'te 2017-2018 yılları arasında farklı mezbahalardan toplanmış domuz safra örnekleri HEV RNA varlığı için test edilmiştir. Test edilen 253 örnekten toplam 11 tanesi (% 4,35) HEV RNA genotip 4 olarak tespit edilmiştir.⁹⁶

Çin'de, bazı domuz çiftliklerinden veya inek, tavşan gibi hayvanların da beslendiği karma çiftliklerden domuz fekal örnekleri toplanmıştır. Domuz HEV RNA'sı % 9,3 oranında pozitif bulunmuştur. Yapılan filogenetik analiz sonucunda tüm HEV izolatlarının genotip 4'e ait olduğu gösterilmiştir.⁹⁷

Yürütülen bir araştırmada, 17 memeli türünden 822 dışkı numunesi ile 24 kanatlı türünden 67 dışkı numunesi toplanmıştır. Farklı bölgelerdeki domuzlardan %33-92 oranında, tavşanlardan % 5 oranında HEV RNA pozitif izole edilmiştir. Filogenetik analizler, genotip 4'e ait olduğunu göstermiştir. Tavşan HEV suşları, İç Moğolistan'dan izole edilen tavşan suşları ile % 93 - % 99 nükleotit sekans özdeşliği paylaşmış; domuz ve tavşanların Çin'de HEV'nin ana rezervleri olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada HEV RNA, çiftlik tilkileri, koyun, sika geyikleri, hayvanat bahçelerinde yabani domuzlar, yaklar, develer, Asya siyah ayıları, Afrika aslanları, kırmızı pandalar, misk kedileri (civet), kurtlar, çakallar ve primatlar dahil vahşi hayvanların hiçbirinde tespit edilememiştir.⁹⁸

2.5.3. Kanatlılarda HEV

Domuz HEV'i gibi kanatlı HEV'i de genetik ve antijenik olarak insan HEV'i ve memeli HEV'lerine çok benzer görülmüştür. Hepatit E virüsü, Hepatit-Splenomegali Sendromu (HSS) olarak da tanımlanan büyük karaciğer ve dalak (BLS) hastalığı ile ilişkili bulunmuştur.¹⁰² Ortohepevirüs A, C ve D izolatları memelilerde görülürken Ortohepevirüs B, tavuklardan gelen avian HEV izolatlarını içermektedir.³⁹ Avrupa'da ilk avian HEV vakaları 2004 ve 2005'te İtalya¹⁰³ ve Macaristan'dan¹⁰⁴ bildirilmiştir.

2007'den beri Polonya'da, veteriner hekimler tarafından bildirilen BLS hastalığı vakaları gözlemlenmiş, ancak avian HEV izolatlarının en önemli, kısmi ORF dizileri 2010'da tanımlanmış ve GenBank'ta tanımlanmıştır.²⁸ Avian HEV genotip 1 Avustralya ve Kore'de tanımlanmıştır, genotip 2 Kuzey Amerika ve İspanya'da, genotip 3 Avrupa'da, Çin'de ve bir ölçüde Kuzey Amerika'da bulunurken, Macaristan ve Tayvan'da genotip 4 tespit edilmiştir.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ BLS hastalığı olan tavuklarda tipik olarak, genişlemiş karaciğer ve dalak ile hayvanın karnında kanlı bir sıvı bulunurken, yumurta üretiminde bir düşüş (% 10-% 40) ve yükselen mortalite oranları (% 1-% 4) görülmektedir.¹⁰⁸ Hem anti-avian HEV antikörlerin hem de viral RNA'nın sağlıklı tavuk sürülerinde tespit edilmesi, tavuklarda avian HEV'nin genelde subklinik enfeksiyonlara neden olduğunu düşündürmektedir.^{107,109,110}

2001'de Amerika Birleşik Devletlerinde Hepatit Splenomegali Sendromu (HSS) olan tavuklarda avian hepatit E virüsü RNA'sı tespit edilmiştir.¹¹¹ 2002'de yapılan çalışmada, Avian HEV'i ile Avustralya'daki tavukların karaciğer ve dalak hastalığı virüsünün (BLSV) yaklaşık % 80 nükleotid sekans özdeşliği paylaştığı görülmüştür.^{102,111} 2013'lü yıllarda araştırmacılar, Avustralya'daki BLS ile ABD'deki HSS'in aynı virüsün varyant suşlarından kaynaklandığını düşünmüşlerdir.⁷

Avian HEV'i, insan HEV'leri ile kapsid proteinde % 50 - 60 nükleotid dizisi ve ortak antijenik epitopları ile benzer görülmektedir.¹¹¹ ABD'de yapılan bir çalışmada, tavuk sürülerinin yaklaşık % 71'i ile test edilen tavukların % 30'u avian HEV'e karşı seropozitif bulunmuştur. Onsekiz haftadan küçük tavukların yaklaşık % 17'si seropozitif iken, yetişkin tavukların yaklaşık % 36'sı seropozitif tespit edilmiştir. Araştırmacılar elde edilen verilerle, avian HEV izolatlarının genetik olarak domuz ve insan HEV'lerine benzerliğini görmüşler ve ABD'deki tavuk sürülerinde avian HEV enfeksiyonunun enzoonotik olduğunu bildirmişlerdir.¹¹²

Polonya'da yapılan bir çalışmada, anti-avian HEV antikorlarının varlığı için 57 damızlık broyler ve yumurta tavuğu sürülerinden 1034 serum örneği taranmıştır. Randomize toplanan numunelerle yapılan bir seroloji çalışmasında, sürünün % 56.1'inin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Yumurta tavuğu sürülerinde seroprevalans, broiler damızlık sürülerine göre daha yüksek bulunmuştur. Kısmi ORF1 ve ORF2 sekanslarının filogenetik analizinde, tüm Polonya izolatlarının genotip 2'ye ait olduğu ve bunun Orta Avrupa'da ilk kez tespit edildiği belirtilmiştir.¹¹³

Mart 2017'de Avian HEV enfeksiyon prevalansını araştırmak için Çin'in kuzeybatı bölgesinde bir çalışma yapılmıştır. Aynı alanı paylaşan 57 tavuk, 30 ördek, 24 kaz ve 16 tavşanı içeren karma bir gruptan alınan serum, fekal swab ve safra örnekleri ELISA ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, 20/57 tavuk, 9/30 ördek, 6/24 kaz ve 8/16 tavşanın anti-avian HEV antikorları için pozitif olduğunu göstermiştir. Test edilen türlerde spesifik anti-avian HEV antikorlarının varlığı, avian HEV'nin aynı alanda tavukları, ördekleri, kazları ve tavşanları enfekte edebildiğini göstermiştir.¹¹⁴ Yine Avian HEV'nin hindilerle olan çapraz reaksiyonları da gösterilmiştir.¹⁰⁹ Doğu Çin'de, tavuklardan kan serumu örnekleri toplanmış ve bunlar ELISA ile analize tabi tutulmuştur. Bu çalışmada toplanan 484 kan serumunun 41 tanesi (% 8) seropozitif olarak bulunmuştur.¹¹⁵

2.5.4. Tavşanlarda HEV

2009 yılından bu yana dünyanın farklı bölgelerinde yabani, evcil ve çiftlik tavşanlarında genotip 3 hepatit E virüsü (HEV) suşları tespit edilmiştir. Orta Almanya yakınlarında (Frankfurt) toplanan 72 yabani tavşan üzerinde serolojik ve moleküler bir araştırma yapılmıştır. HEV-spesifik antikorları 72 hayvanın 25'inde (% 34.7) ortaya çıkmıştır. HEV RNA'sı ise 72 hayvanın 18'inde (% 25) saptanmıştır. Yüksek nüfus yoğunluğuna sahip şehir çevresinde tavşan HEV'in saptanması, enfekte hayvanlarla

doğrudan veya dolaylı temas yoluyla, insanlarda yüksek risk potansiyeli olduğunu göstermektedir.¹¹⁶

Kore'de yapılan bir çalışmada, spesifik patojen içermeyen (SPF) 126 tavşandan, kan serumlarında % 6.4 ve dışkı örneğinde % 13.5 HEV RNA'sı bulunmuştur. Anti-HEV antikorları ise % 4 oranında saptanmıştır. Bu tavşanlardan izole edilen HEV genetik sekansları, diğer tavşan HEV izolatları ile yakından ilişkili bulunmuştur.¹¹⁷ HEV'e karşı ilaç çalışmalarında, 62 SPF tavşanı üzerinde deneysel HEV enfeksiyonu oluşturulmuştur. Ribavirin tedavisi uygulanan SPF tavşanlarında HEV enfeksiyonu hızla tedavi olmuş, ancak anti-HEV antikorları ribavirin ile tedavi edilen tavşanların % 50'sinde görülmesine devam etmiştir.¹¹⁸

Çin'de bazı tavşan çiftliklerinden veya inek, domuz gibi hayvanların da beslendiği karma çiftliklerden tavşan fekal örnekleri toplanmıştır. Tavşan HEV RNA'sı % 18,9 oranında dışkıda pozitif bulunmuştur. Yapılan Filogenetik analiz sonucunda tüm HEV izolatlarının tavşan HEV genotip 3'e ait olduğu gösterilmiştir.⁹⁷

Tavşanlar, HEV'i insan, domuz ve diğer hayvan rezervuarlarına bulaştıran zoonotik bir depo olarak da kabul edilmektedir. Sun ve ark.'nın¹¹⁹ 2018'de, HEV bulaşmasını ve patogenezi incelemek için yürüttükleri bir çalışmada, tavşan HEV'i ile deneysel olarak fareyi enfekte etmişlerdir. Bu çalışmada fareler gavaj yoluyla ve temas yoluyla tavşan HEV'ine maruz bırakılmışlar. Farelerde tavşan HEV yayılımı, fekal virüs dökülmesi, viremi, serokonversiyon ve mikroskobik karaciğer lezyonları değerlendirilmiştir. Gavaj ile enfekte edilen tüm farelerde, temasla bazı farelerde fekal virüs saçılımı, serokonversiyon ve viremi (sadece bir fare) saptanmıştır. Bu çalışma tavşan HEV'nin farelere hem oral yolla hem de temas yoluyla bulaşabileceğini göstermektedir.

Gebe tavşanlarda yüksek mortalite ile HEV'nin vertikal geçişi gösterilmiştir.⁹⁸ Bununla birlikte, domuz modeline benzer şekilde tavşan HEV'i de subklinik enfeksiyon seyirlidir. HEV tavşan suşunun, HEV enfeksiyonu ve patogenezi araştırmalarında ve aşı değerlendirilmelerinde kullanılabilir olduğu da belirtilmektedir.¹²⁰

Tavşan HEV genotip 3 Çin'de¹²¹, ABD¹²² ve Fransa'da¹²³ bulunan tavşanlardan izole edilmiştir. Tavşan HEV genotipleri avian HEV'yle nükleotit sekansı özdeşliği paylaşmaktadır. Tavşan HEV'nin kapsid proteini kanatlı, rat, domuz ve insan HEV'ine karşı üretilen antikorlarla çapraz reaksiyon vermektedir. Tavşan HEV'inin, zoonotik genotip 3'e ait olduğu görülmüş ve insanları enfekte edebildiği tespit edilmiştir.⁹³

Wang ve ark.¹²⁴ tarafından, genotip 3 HEV'e karşı yüksek dizi benzerliğine sahip tavşan HEV'inin, deneysel çalışma ile primatları ve insanı enfekte edebileceği gösterilmiştir. Ayrıca tavşanların HEV'in zoonoz iletimini göstermek, HEV aşısı etkinliğini değerlendirmek ve patogenezi çalışmaları yapmak için uygun bir laboratuvar hayvanı olduğu bilgisi de paylaşılmıştır.

2.5.5. Ratlarda HEV

Fareler ve ratlar; paraziter, bakteriyel ve viral hastalıklarla ilgili bilimsel ve tıbbi araştırmalarda hayvan modelleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Rat hepatit E virüsü (rHEV) genetik olarak, memeli hayvanlarda ve insanlarda bulunan hepevirüslerle uzaktan ilişkili bulunmuştur. Ancak, başlangıçta Almanya'da Norveç ratlarında (*Rattus norvegicus*) HEV belirlenmiş, daha sonra Vietnam, ABD, Endonezya, Çin, Danimarka ve Fransa'da tespit edilmiştir.¹²⁵

HEV replikasyon biyolojisi tam olarak aydınlatılamamış ve az sayıda tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bu tür tedavilerin gelişimi, sağlam ve uygun bir hayvan modelinin olmaması nedeniyle kısmen engellenmiştir. Hayvan modeli olarak ratların kullanıldığı bir çalışmada HEV tedavisinde kullanılan ribavirinin, virüsün

replikasyonunu etkin bir şekilde inhibe ettiği ve antiviral çalışmalar için rat modelinin uygun olabileceği belirtilmiştir.¹²⁶

2018'de yapılan bir çalışmada, HEV için küçük hayvan modellerinin güncel anlayışı gözden geçirilmiştir. Araştırcılar, fareler başta olmak üzere küçük hayvan modellerinin primat modellerine göre çeşitli avantajlar sağladığını bildirmişlerdir. Bu hayvanların, hepatit E enfeksiyonunda patojenite, çapraz tür enfeksiyonu, virüs replikasyon mekanizmaları, aşı ve antiviral ajan gelişimi gibi çalışmaları kolaylaştıracadığı ifade edilmektedir.⁸³

Ryll ve ark.¹²⁵ 12 Avrupa ülkesinden gelen Norveç ratları (*Rattus norvegicus*) ve Siyah ratları (*Rattus rattus*), HEV ve insan patojenik hepevirsleri yönünden moleküler olarak araştırmışlardır. İncelemeler sonucunda 12 ülkenin 11'inde, 508 ratın 63'nde (% 12.4) HEV varlığı ortaya çıkarılmıştır. İnsan patojen HEV genotipleri açısından herhangi bir enfeksiyon saptanmamıştır. Sadece Belçika'dan tek bir Norveç ratında tavşan HEV benzeri genotip 3 sekansı tespit edilmiştir. Filogenetik analiz çalışmasında, Avrupa ve ABD'da, Norveç ve Siyah ratların tamamı ile Endonezya'dan Siyah rat HEV sekansları benzerlik göstermiştir. Enfeksiyon durumu açısından yaşla ilgili, cinsiyeti, rat türleri, insan yerleşimleri ve zooloji bahçeleri yoğunluğu ile ilgili bir fark bulunamamıştır. Avrupa'da Norveç ve Siyah ratların HEV ile geniş bir coğrafi dağılım gösterdiği bildirilmiştir.

HEV ile enfekte olmuş ratların idrarında, etkenin atılıp atılmadığını araştırmak için yürütülen bir çalışmada serum, fekal ve idrar örnekleri incelenmiştir. Tüm ratların serum ve fekal örneklerinde HEV RNA'sı saptanmış, ancak idrar örneklerinin hiçbirinde görülmemiştir. Bu alışma ratlarda HEV'nin idrar yoluyla bulaşmadığını göstermesi açısından da önemlidir.¹²⁷

Yang ve ark.⁴⁴ 2015'te yayınladıkları bir çalışmada, Moğol gerbilleri deneysel olarak domuz hepatit E virüsü ile enfekte edilmiş ve bu enfeksiyonun etkileri araştırılmıştır. Aspartat Transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve serumdaki toplam bilirubin (T-BIL) konsantrasyonlarında anlamlı artış ($p < 0.05$) görülmüş ve inokülasyondan 21 gün sonra HEV IgG saptanmış. Deneysel grupta karaciğerde karakteristik viral hepatit lezyonları belirginleşmiştir. Karaciğerde HEV antijeni immünohistokimyasal olarak görülmüş ve HEV ORF3 antijeni, karaciğerde Western blot ile tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, karaciğerlerde HEV'nin viral yükünün dinamik olduğunu ve enfeksiyon sırasında HEV ile enfekte olmuş Moğol gerbillerinde ve anti-HEV IgG pozitif serokonversiyonunda ultrastrüktürel karaciğer hasarı olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

2.6. Sığırlarda HEV Enfeksiyonları

HEV'in, zoonotik bir patojen olduğunda hem fikir olan araştırmacılar, günümüzde insanlarda yüksek seroprevalansın sadece domuz rezervuarı ile açıklamanın yeterli olmayacağına inanmaktadırlar.⁴¹ Sığırlar, et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünlerinde dünyanın pek çok ülkesinde ağırlıklı olarak tüketilen bir hayvansal gıda kaynağına hizmet eden hayvanlardır. Yapılan araştırmalarda bu hayvanların az pişirilmiş et ve sütlerinde HEV suşları tanımlanmış, HEV'in, insanlara yüksek oranda bulaşma riski taşıyan yeni bir zoonotik kaynak olarak rol oynayabileceği vurgulanmıştır.^{41,115,128,129}

Çin'de, özellikle ev hayvanlarının karışık beslenmesinin yaygın olduğu yerlerden, holştayn ineklere ait taze dışkı, serum ve süt örnekleri toplanmıştır. Bu araştırmada önce HEV RNA'sı PCR ile tespit edilmiş, daha sonra bunlar HEV enfeksiyonu için rhesus makak maymunlarında değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, toplanan dışkı örneklerinde HEV RNA pozitifliği taşıyan ineklerde, aktif HEV enfeksiyon prevalansının yüksek olduğunu keşfetmişler ve HEV'nin enfekte olmuş

ineklerde sütle atıldığını da bulmuşlar. Filogenetik analiz sonucunda ise tüm HEV izolatlarının genotip 4'e ait olduğunu ortaya koymuşlar. HEV ile kontamine çiğ sütün, hatta pastörize sütün bile rhesus makaklarda aktif enfeksiyon ile sonuçlandığını görmüşler. Araştırmacılar, pastörizasyon ısısının yeterli olmadığını, sütün kısa bir süre kaynatılmasıyla HEV'in tamamen etkisiz hale getirebileceğini de vurgulamışlardır.⁴¹

2018'de Geng ve ark.⁹⁷ HEV rezervuarı olarak ineklerin zoonoz riskini ve sütlerinden HEV taşınmasını değerlendirmek için başka bir araştırma yürütmüştür. Dörtüüzaltmışbir inek dışkı örneği, 276 çiğ süt örneği ve 140 perakende satış yerinden süt örneği Mart 2017'den Mayıs 2018'e kadar toplanmıştır. Çalışma sonunda, HEV RNA herhangi bir inek dışkısında veya herhangi bir süt örneğinde tespit edilmemiştir. Aynı zamanda tüm süt örnekleri, HEV antijeni ve anti-HEV antikoru varlığı açısından incelenmiş ve hepsi negatif bulunmuştur. Araştırma yapılan bölge için süt ineklerinin zoonotik iletim riski taşımadığı belirtilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nin farklı bölgelerinden toplanan 983 ineğin serum örnekleri anti-HEV IgG varlığı açısından test edilmiş ve ineklerin % 20.4'ünün seropozitif olduğu bulunmuştur. En yüksek seroprevalans oranı % 68.4 ile Georgia'daki sürülerden elde edilmiştir. Sığırlarda HEV'i genetik olarak tanımlamak amacıyla, bilinen bir seropozitif süt sürüsünden, 10 yeni doğan buzağı HEV enfeksiyonun için doğuştan itibaren 6 aylığa kadar izlenmiştir. 10 buzağıdan 3'ünde anti-HEV IgG tespit edilmiştir. Antikorların genotip 3 insan HEV'le bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlarla aynı zamanda sığırlarda HEV ile antijenik olarak ilişkili bir ajanın var olabileceği belirtilmiş, ancak yayınlanmış raporların aksine, sığırlarda HEV'i tanıyan IgG'nin HEV enfeksiyonundan kaynaklanamayacağı da belirtmişlerdir.¹³⁰

Çin'de yetiştirilen Sarı Sığırlardan (Yellow Cattle) Nisan ve Kasım aylarında toplanan 254 kan örneği Hepatit E virüsü yönünden önce ELISA sonra PCR ile analiz

edilmiştir. Bir yaşından küçük 16 baş hayvan, 1-3 yaş arası 108 baş ve 3 yaş üzerinde ise 130 baş sığırdan kan örnekleri alınarak incelenmiştir. Yapılan analiz sonucu incelenen 26 çiftliğin % 28,2'si, kan serumlarının ise % 47'sinde seropozitiflik tespit edilmiştir. Daha sonra aynı örnekler PCR ile analiz edilmiş ve 254 örneğin 8 tanesinde HEV RNA'sı tespit edilmiştir. Bir yaş altı sığırlardan bir tanesinde, 1-3 yaş arası sığırların 3 tanesinde, 3 yaş üzeri sığırların 4 tanesinde HEV RNA pozitif bulunmuştur. Bu örneklerin filogenetik analizinde, nükleotid diziliminin % 95,5 - % 99,8 birbirleriyle benzerlik paylaşan HEV-4 genotipi olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçların, 2012 yılında Çin'in Yantai eyaletinde bir insan HEV suşuyla (% 96,1–%96,6 benzerlik) ve Shandong eyaletinden izole edilen bir domuz suşuyla (% 95,7 - % 97,9) benzerlik paylaştığı ifade edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile sığır, koyun, domuz ve nihayet insan popülasyonları arasındaki yüksek dizi benzerliği bulguları HEV'in karmaşık türler arası bulaşmasını da ortaya çıkartmıştır.¹¹⁵

Yak sığırları (*Bos grunniens*) Çin'in Tibet bölgesinde, rakım 3.000 metre üzeri ve ortalama yıllık 0 °C'nin altındaki sıcaklıkta yaşamaktadır. Evcil yak sığırlarının genelde 3 yaşında kesimlik canlı ağırlığa ulaştığını belirten araştırmacılar Mart-Eylül 2013 yılında 167 fekal örnek toplayarak PCR ile incelemişlerdir. Bu çalışmada toplanan 92 örneğin % 3,26'sında HEV genotip 4 seropozitifliği tespit edilmiştir. Elde edilen pozitifliklerin gen dizi analizi çalışmasında, insan ve domuz suşlarıyla sığır suşlarının % 99,14 oranında yüksek benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, o bölgede yak sığırlarının az pişirilmiş et ve sütlerinin yaygın olarak tüketildiğini ifade ederek, insanlarda HEV enfeksiyonları için, sığırların da risk potansiyeline sahip olduğunu vurgulamışlardır.¹²⁹

Belçika'nın Flanders kentinde, süt çiftliklerinin % 10'u HEV varlığı yönünden incelenmiştir. Süt ve fekal örnekler, HEV RNA ve HEV-spesifik antikorların varlığı

açısından analiz edilmiştir. Örneklerin hiç birisinde aktif veya geçirilmiş HEV enfeksiyon belirtisi tespit edilememiştir.⁷¹

2.7. Koyun ve Keçilerde HEV Enfeksiyonları

Araştırmalar, koyun ve keçilerin insanlarda gıda zinciri yoluyla HEV enfeksiyonu için önemli bir kaynak olabileceğini göstermiştir. Doğu Çin’de koyunlardan ve köpeklerden kan serumu örnekleri toplanmış ve bunlar ELISA ile analiz edilmiştir. İkiyüzyirmiiki koyun kan serumunun 70 tanesi (% 32), 194 köpek kan serumunun 80 tanesi (% 41) seropozitif bulunmuştur. Koyunların seropozitif bulunan 70 örneğin 8 tanesinde (% 32) HEV RNA tespit edilmiştir. Bu örneklerin filogenetik analizinde, bu bölgede beslenen sarı sığırlarla %95,1 ile %99,8 oranında benzerlik paylaştığı tespit edilmiştir.¹¹⁵

2017’de keçilerde HEV varlığının araştırıldığı bir çalışmada dışkı, kan, doku ve süt örnekleri toplanmıştır. Araştırmacılar, keçide yüksek bir HEV enfeksiyonu prevalansı bulmuşlar. Filogenetik analizlerinde keçiden izole edilen HEV’in genotip 4’e ait olduğunu ve insan, domuz ve aynı bölgedeki ineklerden izole edilmiş HEV ile yüksek benzerlik (>% 99,6) paylaştığını ortaya koymuşlar. Bu sonuçlar neticesinde keçilerin daha önce tanınmamış bir HEV konağı olduğunu ileri sürmüşlerdir.¹³¹

Farklı ırklardan 490 damızlık koyun kan serumu hepatit E virüs antikorların varlığı yönünden ELISA ile test edilmiştir. Sonuç olarak genel seropozitiflik oranı % 28,98 (142/490) olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar yaş aralıkları arasında anlamlı bir fark bulmuşlar. Bir yaşın altındaki koyunlarda % 15,45 (17/110), 2 yaşın üstündeki koyunlarda ise % 38,75 (31/80) bulunmuştur.¹³²

Sincan Özerk Bölgesi’ndeki bir koyun çiftliğinde hayvanların fekal örnekleri ile ilgili yapılan bir araştırmada, 54 koyundan 6 tanesi (% 11,11) HEV RNA pozitif bulunmuştur. Altı pozitif koyunun HEV sekansında sığır HEV’i, domuz HEV’i ve

insan HEV'i ile benzerliği paylaşan genotip 4 tespit edilmiştir. Araştırıcılar koyunların HEV enfeksiyonunun kökeninde, domuzlar dışında yeni bir hayvan rezervuarı olabileceğini öne sürmüşlerdir.¹³³

Mısır'da insan ve coğrafı olarak aynı yerde bulunan gıda değerı olan hayvanlarda HEV epidemiyolojik çalışması yapılmıştır. Sarılık ve ateşle hastaneye başvuran hastalardan kan örnekleri alınmıştır. HEV seropozitif insanlara uygun yerlerden inek, manda, koyun ve keçilerden kan örnekleri toplanmıştır. Kontrol edilen inek, manda, koyun ve keçilerden sırasıyla, % 21.6, % 14, % 4.4 ve % 9.4 olarak Hepatit E virüsü seropozitifliği tespit edilmiştir. İncelenen 134 insandan 51'i (% 38,1) IgG anti-HEV için pozitif bulunmuştur.¹³⁴

Wu ve ark.¹⁶ 2015'te Çin'in Sincan bölgesinin güney kesimindeki bir kesimhaneden, 26 kasaptan kan serumu ile 500 koyun kan serumu ve 75 tane çiğ koyun karaciğer rneği toplamışlar. Araştırma sonucunda koyunların % 35.20 (176/500) ve kasapların % 57.7 (15/26) anti-HEV IgG pozitif olduğu bulunmuştur. Yetmişbeş koyun karaciğerinin dördünde (% 5.3) HEV RNA genotip 4 saptanmıştır. Sonuçlar koyunlarda yüksek düzeyde serokonversiyon olduğunu ve koyun karaciğerinin insanlarda gıda kaynaklı HEV enfeksiyonu kaynağı olabileceğini göstermiştir.

2.8. Türkiye'de Bazı HEV alışmaları

İnsanlarda, HEV enfeksiyonlarının viremi döneminin kısa olabileceği, asemptomatik, anikterik veya subklinink formdan fulminan hepatite dnrebileceği belirtilerek kronik karaciğer hastalığı olan insanlarda, sperenfeksiyonla birlikte morbidite ve mortalitenin de artacağı bildirilmiştir.^{3,135} İnan enfeksiyonlarının genelde hayvansal kaynaklı gıda tüketimi, enfekte olmuş hayvanlarla doğrudan temas, hayvansal gübre, su ve çevresel kontaminasyon sonucuyla ortaya çıktığı bildirilmektedir.⁴⁹

HEV insanlarda ve dolayısıyla sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorununu temsil etmektedir.⁸³ HEV enfeksiyonu ile bilinenlerin çoğu, gelişmekte olan ülkelere ve son zamanlarda sanayileşmiş ülkelerdeki epidemiyolojik çalışmalardan gelmiştir. Bununla birlikte epidemiyolojide, bu iki ortam birbirinden oldukça farklıdır. Az gelişmiş olan ülkelere hepatit E, esas olarak suyla taşınan (HEV genotip 1 ve 2) salgın bir hastalıktır. Endüstrileşmiş ülkelere ise hastalık, yetişkin ve yaşlılarda görülen, çoğunlukla kontamine gıda kaynaklı bulaşan sporadik bir enfeksiyon olarak tanımlanır.⁸⁴ Asemptomatik seyirli hayvanların aksine, HEV enfeksiyonları insanlarda tipik olarak akut ve kendi kendini sınırlayan hepatit ile sonuçlanmaktadır.⁸³

Hepatit E virüsü, insanlarda akut hepatitin başlıca etkeni olup, dünya çapında yaklaşık, yıllık 20 milyon enfeksiyondan sorumlu olduğu belirtilmektedir. Enfeksiyon gelişmekte olan ülkelere ortaya çıkmasına rağmen, endüstrileşmiş birçok ülkede de endemikleşmeye doğru gitmektedir.¹³⁵ İnsan hastalarda zoonotik iletimin aktif (RNA) veya seropozitif (IgG) HEV için pek çok hayvan türünde varlığı saptanmıştır. HEV enfeksiyonu ve ortaya çıkan komplikasyonlarında başlıca risk grupları yaşlı erkekler, gebe kadınlar, küçük çocuklar, bağışıklığı zayıflamış hastalar, önceden karaciğer hastalığı olanlar ve HEV ile enfekte olmuş hayvanlarla yakın temasta olan insanlardır. HEV genel olarak akut, kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlara neden olurken, immün sistemi baskılanmış hastalar (örneğin transplant alıcıları ve HIV (insan immün yetmezlik virüsü) ile enfekte hastalar) arasında kronik enfeksiyonlar meydana gelebilir. Batı dünyasında, HEV enfeksiyonuna neden olan en yaygın genotip 3'tür. HEV tedavisinde, Ribavirin (RBV) ve interferon bazı hasta gruplarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.^{135,136}

2017 yılında yapılan bir meta analizinde, Hepatit E virüsü enfeksiyonunun düşünülen daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. 1994 ile 2016 yılları arasında 17

ülkeden 31 çalışma belirlenmiş ve Hemodiyaliz hastalarında, hemodiyaliz olmayan kontrol gruplarına göre Hepatit E virüsü enfeksiyonu daha yaygın saptanmıştır. Hemodiyaliz hastalarında HEV seroprevalansı % 0 ile % 44 arasında değişmekte olduğu ve HEV'nin bulaşma risk faktörlerinin hala belirsizliğini koruduğu ifade edilmiştir.¹³⁷

Hepatit E Virüsü epidemiyolojik olarak, sanitasyon durumundaki geniş mekansal heterojenite, beslenme alışkanlıkları ve hayvanlara maruz kalma nedeniyle farklılık göstermektedir. HEV enfeksiyonlu hastalarda, bağışıklık sistemi zayıflamış veya önceden karaciğer hastalığı öyküsüne sahip olanlarda ve gebe hanımlarda prognozun daha kötüleştiği bildirilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, çiftliklerde ve kesimhanelerde düşük hijyenik standartlar ile yakın insan-hayvan etkileşimleri, virüsün zoonotik bulaşmasını etkilediği görülmüştür.¹³⁸

HEV açısından Türkiye, endemik bölgeler arasında kabul edilmektedir.^{20,21,139,140} Türk insanlarında, çalışma faktörlerine ve bölgelere göre değişiklik gösteren farklı seroprevalans oranları tespit edilmiştir. 2010 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülen bir tez çalışmasında, 175 hastanın 13'ünde anti-HEV IgG pozitif bulunmuştur. HEV seroprevalansı kadınlarda % 10.3 (10/97), erkeklerde % 3.8 (3/78) iken her iki grupta % 7.4 saptanmıştır.¹⁴¹

2015 yılında, Hatay'da yapılan bir çalışmada ise % 7,9 anti-HEV IgG seroprevalans oranı tespit edilmiştir.¹⁴² 2012-2013 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörüne ait 327 serum örneği incelenmiş, toplam HEV-IgG seropozitifliği % 4,4 olarak tespit edilmiştir.⁶

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroentoloji Bilim Dalına, 2011-2015 yılları arasında başvuran 1025 hastada anti-HEV IgG pozitifliği % 56,4 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada Hepatit C ve D kökenli viral hepatitli hastalarda HEV pozitifliği daha yüksek oranda tespit edilmiş; eğitim seviyesi düşüklüğü, kırsal alanda yaşamak, ileri yaşta olmak, hayvancılıkla uğraşmak ve başka sirotik hastalığın varlığı HEV seropozitifliğinde önemli risk faktörleri olarak belirlenmiştir.¹⁴³

Türkiye’de HEV seroprevalans çalışmasının yapıldığı farklı illerde, gönüllü donör kan serum örneklerinde, iki ticari HEV ELISA kitinin duyarlılığı test edilmiştir. Çalışmada, anti-HEV ELISA testleri sonuçlarına göre Türkiye’de HEV seroprevalansı, kitlerin farklarıyla birlikte genel olarak % 11,34 ve % 12,08 olarak belirlenmiştir. Ankara % 12,01 - % 12,51, Kayseri % 6,99 - % 7,81, Malatya % 14,50 – % 15,55, İzmir % 8,07 - % 9,65, Kahramanmaraş % 14,5 – % 15,5 ve Van % 11,91 - % 12,99 olarak tespit edilmiştir. 2017 yılından önce Kahramanmaraş dışındaki diğer şehirlerde anti-HEV seroprevalans çalışması yapılmıştır. Ankara’da 1996 yılında % 7,6 bulunan anti-HEV pozitifliği, bu çalışmada % 12’lere ulaşıldığı bulunmuştur. Malatya ilimizde de 2001 yılında % 9,7 olan seropozitiflik, 2017 yılında % 14,50 – % 15,55 oranında artış söz konusudur. İzmir, Kayseri ve Van illerinde ise benzer sonuçların olduğu bildirilmiştir.¹⁴⁴

Van ili ve çevresindeki HEV vakalarının epidemiyolojik, biyokimyasal ve virolojik özellikleri Mayıs 2015 - Mayıs 2017 tarihleri arasında, Gastroenteroloji bölümüne başvuran, hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu olan tüm bireyler incelenmiştir. Bu araştırmada, tüm gruplarda anti-HEV IgG pozitifliği % 49 iken kontrol grubundaki anti-HEV IgG pozitifliği % 36 olarak saptanmıştır. HEV IgM pozitifliği ise % 9.1 olarak tespit edilmiştir.¹⁴⁵

Çanakkale ilindeki ilk yapılan seroprevalans çalışmasında, anti-HEV IgG seropozitifliği % 7,2 olarak saptanmış ve seropozitif olan hiçbir olguda HEV RNA

bulunmamıştır. Bu çalışmada 45 yaş ve üzeri kişilerde anti-HEV IgG seropozitiflik % 21,7 iken bu oran erkeklerde % 11,6, kadınlarda ise % 4,5 olarak bulunmuştur.¹⁴⁰

2.9. Gıdalarda HEV İnaktivasyonu

HEV enfeksiyonu kontrol ve korunma stratejileri, HEV'in yüksek endemik olduğu bölgelerde hijyen ve sanitasyon koşullarının iyileştirilmesi ve aşı geliştirme çalışmalarına dayanmaktadır.¹⁴⁶ Öncelikli olarak, fekal-oral yolla bulaşan bir hastalık olması nedeniyle, başta su kaynakları olmak üzere, tüm gıda kaynaklarının dışkı ile kontaminasyonunun önlenmesi korunmada oldukça önemlidir.

Hepatit E virüsünde etkili bir hücre kültürü sisteminin olmaması, HEV biyolojisine ilişkin replikasyon çalışmaları ve inaktivasyonu üzerine yapılacak çalışmaları engellemektedir. Bu nedenle, hücre kültüründe etkili bir şekilde replike olabilen ve insan için patojen olmayan, hepevirus üyesi Cutthroat alabalık virüsü (CTV) yüksek titrelerde replike olabilmektedir. Bunun, HEV azaltma kapasitesini değerlendirmek için bazı uygulamalarda kullanılacak pratik bir virüs modeli olabileceği bildirilmektedir.¹⁴⁷

Hepatit E virüsü, zoonoz özelliklerinden dolayı hayvansal ürünlerde gıda kaynaklı bir virüs tehlikesi olarak kabul edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde, HEV enfeksiyon rotasında daha çok az pişmiş et tüketiminden kaynaklandığı şeklindedir. Imagawa ve ark.¹⁴⁸ 2018'de yaptıkları çalışmada, domuz etinde HEV inaktive edilmesi için gerekli ısı koşullarını değerlendirmişler. HEV genotip 3 ve 4 kültürlerini ette, 5 dakika boyunca > 65 °C'de, 1 dakika boyunca > 80 °C'de ve kıyılmış ette 5 dakika boyunca 70 °C'de inaktive etmişler. Verilerde, HEV genotip 4'ün genotip 3'ten biraz daha fazla ısıl kararlı olduğunu göstermesine rağmen, her iki genotip de uygun ısıtma koşullarıyla inaktive edilmiştir.

Isıl işlemlerle farklı üretim aşamalarının yanında soğuk etanol, düşük pH uygulaması ve bazı filtrelerle HEV azaltılmaya çalışılmıştır. Ondokuz veya 15 nm küçük gözenek boyutlu virüs filtrasyonu, HEV'nin etkili bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermiştir. Ancak, 35 nm gözenek büyüklüğü filtrelemesinde virüsü orta derecede uzaklaştırmayı ve 60 °C'lik ısıtma ile orta derecede inaktivasyonu saptanmıştır. Etanol fraksinasyon çalışmaları HEV'nin sınırlı şekilde uzaklaştırıldığını göstermiş ve düşük pH uygulamasında sınırlı veya hiç inaktivasyonu gözlenmemiştir.¹⁴⁹

Hepatit E virüsünün termal stabilitesinin araştırıldığı bir çalışmada¹⁵⁰, 37 °C'de 21 gün, oda sıcaklığında 28 gün ve 4 °C'de 56 gün boyunca hepatit E enfeksiyöz virüsünün 2.7-log azaldığı saptanmıştır. Seksen derece ve üzeri sıcaklıklarda ise virüs hiç saptanamamıştır.

Sunulan bu çalışmanın amacı, Hepatit E virüsünü, sığır ve koyunlarda serolojik ve moleküler yöntemler kullanarak araştırmak ve elde edilen sonuçlarla HEV genotiplerini belirlemektir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan örnekler, Eylül 2017 ile Ocak 2019 tarihleri arasında, Elazığ, Erzurum, Malatya ve Diyarbakır illerinde faaliyet gösteren farklı mezbahalardan tesadüfi örnekleme yöntemiyle toplandı. Kesim sırasında toplanan kan örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirilip 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Elde edilen serumlar steril ependorf tüplere 1.5 ml'lik hacimde alınarak çalışma gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Bu çalışma için toplanan karaciğer örnekleri, kesim sırasında safra kesesine yakın yerlerden alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi ve analiz zamanına kadar -80°C'de saklandı.

3.1.1. Sığır Örnekleri

Bu çalışma için, 194 adet (Tablo 3.1) kan serum örneği ve toplamda 100 adet (Tablo 3.2) karaciğer doku örneği olmak üzere 294 adet sığır örneği kullanılmıştır. Elazığ (A, B), Erzurum (C) ve Diyarbakır (D)'da faaliyet gösteren 4 farklı kesimhaneden kesim esnasında çalışma örnekleri temin edilmiştir. Bu çalışmada simental, simental melezi, montofon, montofon melezi, holştayn, hereford, angus, limuzin, şarole, brangus gibi farklı sığır ırklarından alınan örnekler incelenmiştir. Analizi yapılan sığırlardan, erkek hayvanlar yaklaşık 1-2 yaş aralığında iken dişi hayvanlar yaklaşık 15 aylık - 8 yaş aralığında bulunmaktadır. Diyarbakır ilinden aldığımız sığır kan serum örneklerinde, hayvanların ithal öyküsü bulunmaktadır. Bu hayvanlar, yaklaşık 10-12 aylık yaşta Brezilya'dan Türkiye'ye getirilmiş Brangus ırkı sığırlar olup, 18-20 aylık yaşa kadar Diyarbakır'da beslenmiştir.

Tablo 3.1. İllere göre sığır kan serum örnekleri dağılımı

Nunume Toplanan İller	Numune Toplanan İşletmeler	İlkbaharda Toplam Numune Sayısı	Sonbaharda Toplam Numune Sayısı	Toplam Kan Serum Sayıları
Elazığ	A	5	2	7
Elazığ	B	46	25	71
Erzurum	C	0	29	29
Diyarbakır	D	87	0	87
Toplam	4	126	68	194

Tablo 3.2. İllere göre sığır karaciğer örnekleri dağılımı

Nunume Toplanan İller	Numune Toplanan İşletmeler	İlkbaharda Toplam Numune Sayısı	Sonbaharda Toplam Numune Sayısı	Toplam Karaciğer Sayıları
Elazığ	A	3	2	5
Elazığ	B	33	24	57
Erzurum	C	0	13	13
Diyarbakır	D	0	25	25
Toplam	4	36	64	100

3.1.2. Koyun Örnekleri

Bu çalışmada kullanılan koyun örnekleri, Elazığ (A, B) ve Malatya (E)'da faaliyet gösteren 3 farklı kesimhaneden tesadüfi örnekleme yöntemiyle toplanmıştır. Koyunların kesimi sırasında, 220 adet kan serumu ve 100 adet karaciğer doku örnekleri toplamda 320 adet çalışma materyali elde edilmiştir. Bu örnekler çoğunlukla akkaraman ırkından, daha az olarak da morkaraman ve merinos koyun ırklarından alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen erkek koyunların yaşı genelde 1 ile 2 yaş iken dişiler 5-8 yaşa kadar ulaşan damızlık dışı bırakılmış koyunlardan oluşmaktadır.

Tablo 3.3. İllere göre koyun kan serumu örnekleri dağılımı

Nunume Toplanan İller	Numune Toplanan İşletmeler	İlkbaharda Toplam Numune Sayısı	Sonbaharda Toplam Numune Sayısı	Toplam Kan Serum Sayıları
Elazığ	A	0	2	2
Elazığ	B	35	39	74
Malatya	E	0	144	144
Toplam	3	35	185	220

Tablo 3.4. İllere göre koyun karaciğer örnekleri dağılımı

Nunume Toplanan İller	Numune Toplanan İşletmeler	İlkbaharda Toplam Numune Sayısı	Sonbaharda Toplam Numune Sayısı	Toplam Karaciğer Sayıları
Elazığ	A	0	2	2
Elazığ	B	44	19	63
Malatya	E	0	35	35
Toplam	3	44	56	100

3.2. Serolojik Analizler

3.2.1. Anti-HEV IgG Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Sığır kan serumu örneklerinde anti-HEV IgG antikorlarının araştırılması için, standardize edilmiş ticari bir ELISA kiti olan Bovine anti-Hepatitis E virus IgG (HEV-IgG) ELISA Kiti (SinoGeneClon, Catalog No: SG-60058, Hhangzhou China) kullanılmıştır. Koyun kan serumu örneklerinde ise Sheep anti-Hepatitis E virus IgG (HEV-IgG) ELISA Kiti (SinoGeneClon, Catalog No: SG-70437) kullanılmıştır. Analizlerde kit protokolü uygulanmıştır.

Testin prensibi, HEV'e ait rekombinant kapsid antijenleri ile kaplı mikroplak kuyucuklarına, serum örneklerinin eklenmesi ve özgül IgG varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin, ikinci bir antikor sistemi (enzimle işaretli anti-bovine ve sheep IgG konjugatı) kullanılarak saptanması esasına dayanır (SinogeneClon). Yöntemin uygulanması esnasında, özgül olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması

amacıyla, her inkübasyon basamağından sonra yıkama işlemi yapılmıştır. Özgül bağlanmalar sonucunda oluşan renk değişimleri spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir.

Testin yapılışı: Çalışmada HEV-IgG ELISA testi, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 96 kuyucuklu mikropiplaklar kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır

1. Test başlamadan önce kitteki bütün malzemeler, 30 dakika oda sıcaklığına (+25°C) getirildi ve serum örnekleri çözdürüldü.
2. 20 ml yıkama tampon çözeltisi (Wash Buffer) konsantre olarak kitle birlikte temin edildi. Konsantre çözelti 30 kat distile su ile sulandırılarak 600 ml yıkama tampon çözeltisi hazırlandı.
3. Teste başlamadan önce serum örnekleri 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek supernatant kısım alındı. Kit içeriğindeki kalibratör ve kontroller kullanıma hazır oldukları için test aşamasında sulandırılmadan kullanıldı.
4. Kuyucukların numarasına göre mikropiplate yerleştirildi ve birinci kuyucuk boş bırakıldı.
5. Mikropiplak kuyucuklarına sırasıyla; pozitif ve negatif kontrol örnekleri 50 µl pipetlendi. 40 µl örnek seyreltici, kalan her bir kuyucuğa ilave edildikten sonra 10'ar µl örnekler kuyucuklara dağıtıldı. Mikropiplate hafifçe karıştırıldı.
6. Mikropiplaklar, 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresi sonunda mikropiplak kuyucukları yıkama tampon solüsyonu ile 5'er kez yıkandı.
8. Blank kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara, HRP- konjugat 50'er µl pipetlendi.
9. Mikropiplaklar, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
10. İnkübasyon süresi sonunda mikropiplak kuyucukları yıkama tampon solüsyonu ile 5'er kez yıkandı.

11. Her bir kuyucuk içine Kromojen solüsyonu A 50 ul ve kromojen solüsyonu B 50 ul pipetlendi. Mikroplaklar üzerleri kapatılarak, gün ışığı ile temas etmeyecek şekilde, 37 °C'de 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50'er µl durdurma solüsyonu eklenip reaksiyon durduruldu.
13. 15 dakika içinde kuyucuklardaki renk değişiminin absorbans değerleri 450 nm'de spektrofotometrik olarak okutuldu.
14. Sonuçlar, ortalama pozitif kontrol kuyucuğu ≥ 1.00 ; ortalama negatif kontrol kuyucuğu ≤ 0.10 kit tarafından önerilen geçerli aralıkta olması halinde değerlendirildi. Cut-off; ortalama negatif kontrol + 0.15 eklenerek hesaplandı. Örnek optik dansite (OD) < cut off ise negatif, örnek OD \geq cut off ise pozitif olarak kabul edildi.
15. Çalışmada, sınırda pozitif sonuç veren tüm serum örnekleri ikinci kez test edilerek sonuçlar doğrulandı.

3.3. Moleküler Analizler

3.3.1. Hücrelerin Lizisi ve RNA Ekstraksiyonu

Pozitif bulunan anti-HEV IgG serum örnekleri ile 200 adet karaciğer dokusundan RNA ekstraksiyonu yapıldı. RNA ekstraksiyonu için kullanılan RNA Ekstraksiyon Kitinin protokolüne uyuldu (HibriGen RNA Ekstraksiyon Kiti, MG-RNA-01). Örnekler bistüri ile küçük parçalara ayrıldı ve guanidium izotiosiyanat (RNA'yı endojen RNaz'lardan koruyan kaotropik bir tuz) varlığında doku parçalayıcı ile homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra örneğe etanol eklendi. Bu örnekler daha sonra RNA'nın bağlanabileceği silika tabanlı membran bulunduran spin kolonlara aktarıldı. Kirlilikler yıkamalar ile etkili bir şekilde uzaklaştırıldı. Saf RNA daha sonra RNaz bulundurmeyen su ile toplandı.

Testin yapılışı

1. Yıkama Tamponları RPI ve RW solüsyonları konsantre olarak kitle temin edilmiştir. Kullanıma başlanmadan önce ilk olarak, RW tampon için 48 ml; RPI tampon için 12 ml % 96-100'lük saflık oranında etanol eklendi.
2. Her 50-100 mg karaciğer dokusu için 1 ml RL solüsyonu kullanılarak homojenize edildi.
3. Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için 15-30 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 4 °C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, yeni bir RNaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamada protein, yağ, polisakkarit ve kas fibrilleri uzaklaştırıldı.
4. 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Örnek 4 °C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi (Santrifüjden sonra karışım üç kısma ayrılmaktadır; en altta sarı fenol kloroform fazı, bir arafaz ve en üstte RNA içeren renksiz faz). En üstteki renksiz faz yeni RNaz içermeyen boş tüpe aktarıldı.
6. Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine ½ oranında önceden soğutulmuş etanol (%99.9) eklendi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldı ve 4 °C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan sıvı aktarıldı.
7. 500 µl yıkama tamponu RPI eklendi. 4 °C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı aktarıldı.
8. 500 µl yıkama tamponu RW eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. 4 °C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı aktarıldı.
9. Kolon 12000 rpm'de 2 dakika kuruması için santrifüj edildi.

10. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Direkt olarak membran üzerine 30-100 µl DEPC-treated water eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, sonra 12000 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra saf RNA tüplerde bulunmaktadır.

3.3.2. Revers Transkripsiyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen viral RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi ve sonrasında PCR ile ORF-1 bölgesinin çoğaltılması SuperScript™One-Step RT-PCR System with Platinum™Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. HEV ORF-1 bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan kısmi primerler

Primer	Nükleotit Dizilimi (5'→3')	Ürün (bp)	Genom Bölgesi
HEV-csn	TGTGCTCTGTTTGGCCNTGGTTYCG	331-334	ORF1
HEV-casn	CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA		

Kaynak: Johne et al. 2010¹⁵¹

Kitin talimatlarına uygun olarak reaksiyon karışımı tabloya göre hazırlandı.

Tablo 3.6. RT-PCR karışımı

Bileşen	Hacim
2X Buffer	25 µl
Templeyt RNA	5 µl
dNTP karışım (10 mM)	1 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Revers primer (10 µM)	1 µl
RT/platinum™ Taq mix	1 µl
Distile su	16 µl
Toplam hacim	50 µl

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra cDNA sentezi ve sonrasında ORF bölgesinin kısmi çoğaltılması amacı ile miks ısı döngü cihazına (GeneAmp® PCR sistem 9700, CA. ABD) bırakıldı. İlk olarak viral RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi amacı ile cihaz 50°C sıcaklığa ayarlandı. Komplementer DNA'nın oluşmasını takiben Superscript IIRT enzimini inaktive etmek için 94°C'de 2 dakika bekletildi. Komplementer DNA sentez aşamasını takiben PCR aşamalarına geçildi. 95°C'de 5 dakika ön ısıtmadan sonra, 94°C'de 30 saniye ayrılma, 50°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzatma ile 35 döngüden oluşan ve 72°C'de 10 dakika son uzatma ile sonlanan PCR kuruldu.

PCR aşaması sonrasında elde edilen ampikonlar %1 agaroz jele 100 baz çift DNA merdiveni (Solis Biodyne, Estonya) ile birlikte yüklendi ve 130 V 40 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Ultraviyole ışığında beklenen 334 baz çifti büyüklüğündeki bantın jelde tespit edilmesinin ardından jelden DNA pürifikasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada transillüminatör üzerinde ilgili gen bölgelerine denk gelen jel kısımları steril bistüri yardımı ile özenle kesilerek çıkarıldı ve ayrı mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Agaroz jelden DNA pürifikasyonu ticari kit Pure Link QuickGel ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüpüne alınan ~400 mg jel parçasına 3 kat hacimde ~1.2 ml jel çözücü solüsyon ilave edildi. Tüp 50°C'deki ısı bloğunda en az 10 dakika jel tamamen çözününceye kadar bekletildi ve bu süre içerisinde 3 dakika aralıklarla vortekslendi. Jel tamamen çözüldükten sonra kolonlara bırakıldı ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yıkama tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl yıkama solüsyon bırakıldı ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne alınan kolon üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu bırakıldı ve 1 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından santrifüj işlemi tekrar edildi. DNA'nın miktarı ölçüldü ve saflığı belirlendi.

3.3.3. DNA Sekans Analizi

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelden pürifiye edildi. Saflaştırıldıktan ve nanospektrofotometreyle yoğunlukları ölçüldükten sonra, HEV primerleriyle çift yönlü DNA dizi analizi ABI 3730XL genetik analiz sistemi kullanılarak Macrogen (Hollanda) firmasına yaptırıldı. Sekans işlemi Big Dye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon hacmi toplam 10 µl hacimde olacak şekilde; 2 µl Terminator Ready Reaction, 4 µl sekans primerleri (forvard/reverse 0.8 pikomolar/primer), 2 µl sekans buffer, 2 µl DNA'dan oluşturuldu. Reaksiyon koşulları 96°C'de 1 dakikayı takiben, 96°C'de 10 saniye, 50 °C'de 5 saniye, 60 °C'de 4 dakikadan oluşan 30 siklusu takiben 4°C'de tutuldu. Sekans analizi alignment işleminde ClustelW programı, editleme Mega7 ve BioEdit analiz programları ile çoklu olarak kendi içinde ve referans virüs sekanslarıyla kıyaslamaları yapılmıştır. Filogenetik ağaç için Maksimum Likelihood metodu kullanılarak Tamura-Nei modeli baz alınarak yapılmıştır. Bootstrap değeri 1000 tekrar olarak seçilmiştir. Hem insan hem de hayvanlardan elde edilen genotiplerle karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışma Eylül 2017 ile Ocak 2019 tarihleri arasında, Elazığ, Erzurum, Diyarbakır ve Malatya illerinde faaliyet gösteren farklı mezbahalardan toplanan kan serumu ve karaciğer doku örnekleriyle yapıldı. Numune aldığımız işletmeler, hijyenik ve teknolojik kurallara uygun olarak dizayn edilmiş ve yeterli ekipmanı olan modern kesim binasına sahip işletmelerden oluşmaktadır. Sağlıklı görünen hayvanlardan alınan toplamda 414 adet kan serumu ve 200 adet karaciğer doku örneği olmak üzere 614 adet örnekle çalışılmıştır. Bu örneklerin, 194 kan serumu ile 100 karaciğer doku örneği olacak şekilde 294 adedi sığırlardan ve 220 kan serumu ile 100 karaciğer doku örneği olacak şekilde 320 adedi koyunlardan alınmıştır. Kan serum örnekleri ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile analiz edilirken, pozitif serumlar ve karaciğer doku örnekleri RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) ile analiz edilmiştir.

4.1. ELISA Sonuçları

4.1.1. Sığır anti-HEV IgG Sonuçları

Elazığ, Erzurum ve Diyarbakır şehirlerinde, dört farklı kesimhaneden alınan 194 adet sığır kan serum örneğinin 32'si pozitif olarak belirlendi ve anti-HEV IgG seroprevalansı tüm sığır örnekleri için % 16,5 (32/194) olarak tespit edildi (Tablo 4.1). Numune toplanan hayvanların yaklaşık % 10 kadarı, iki yaş üzeri dişi hayvanlardan oluşmaktadır. Numune aldığımız dişi hayvan tercih kriterimizi, Veteriner Hekim raporlu, mecburi kesime sevk edilmiş, gıda güvenliğine risk teşkil etmeyen hayvanlar oluşturmuştur. Erkek hayvanlar 12-20 aylık yaş aralığında, fiziksel olarak sağlıklı görünenler çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

Tablo 4.1'de illere göre alınmış sığır kan serum örnekleri dağılımı bulunmaktadır. Elazığ'da faal iki farklı kesimhaneden (A,B) toplamda 78 adet sığır kan

serum örneği bu çalışmada kullanılmıştır. Elazığ ilinde toplam sığır kan serum örneklerinde anti-HEV IgG seroprevalansı % 3.8 (3/78) olarak belirlenmiştir. A Kesimhanesinde toplamda 7 adet sığır kan serumunun hiçbirinde HEV seropozitifliği bulunamadı. B kesimhanesinde ise 71 adet sığır kan serum örneği alınmıştır. Alınan kan serum örneklerinin 3 tanesi anti-HEV IgG pozitif bulundu ve bu kesimhane için seroprevalans % 4,2 (3/71) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. İllere göre sığır kan serum örneklerinde ELISA sonuçları

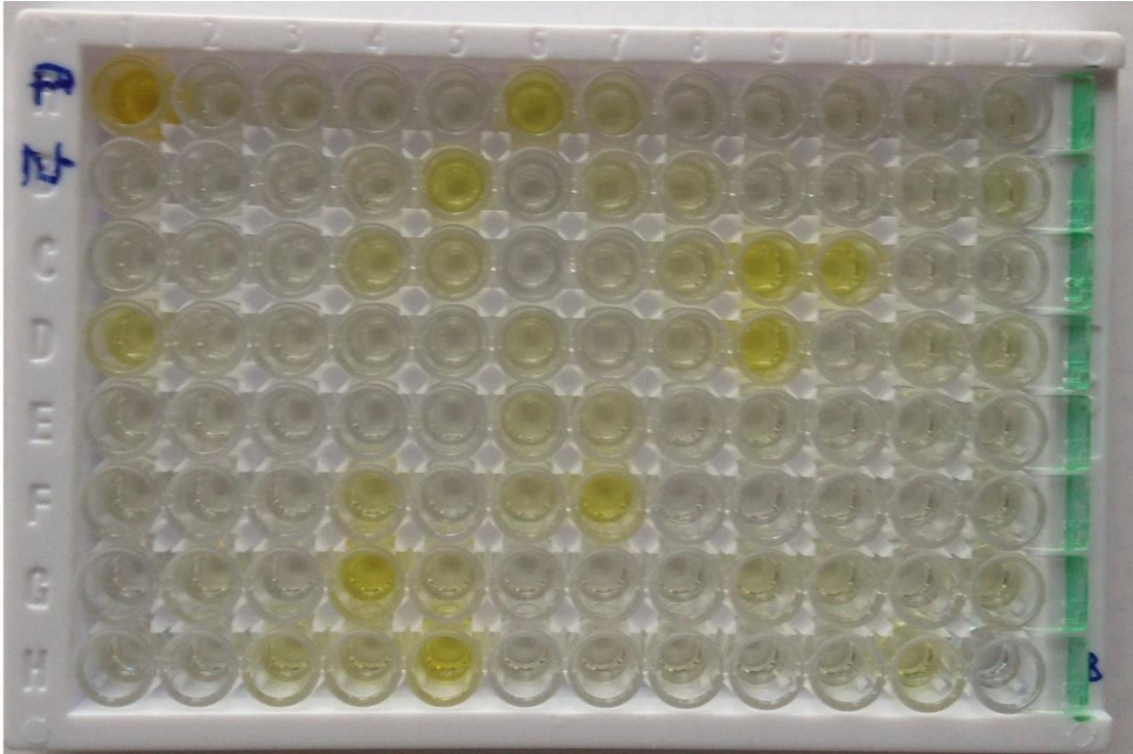
Nunume Toplanan İller	Kesimhaneler	Numune Sayıları	anti-HEV IgG sonuçları	HEV seroprevalans oranı (%)
Elazığ	A	7	0	0
Elazığ	B	71	3	4.2
Erzurum	C	29	0	0
Diyarbakır	D	87	29	33,3
Malatya	E	0	0	0
Toplam	5	194	32	16,5

Erzurum'da faaliyet gösteren entegre bir kesimhane tesisinden (C) farklı zamanlarda alınan sığır örneklerinin hiçbirinde (0/29) anti-HEV IgG pozitif bulunamadı. Numune aldığımız bu hayvanların yaş ve cinsiyet profili, yaklaşık 1,5 yaşında 17 erkek hayvan ile 2 yaşında 12 dişi hayvandan oluşmaktadır.

Diyarbakır ilimizde faaliyet gösteren kesimhanelerden 87 adet sığır kan serum örneği toplandı ve 29 tanesi (29/87) pozitif bulundu. Diyarbakır sığır kan serumu örneklerinde anti-HEV IgG seroprevalansı % 33,3 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Bu ilde kan serum örnekleri alınan sığırların yaşları 18-20 aylık yaş aralığında olup, ithal öyküsü bulunan, Brangus ırkı hayvanlardan oluşmaktadır. Geriye dönük yaptığımız izlemede, bu hayvanların yaklaşık 10-12 aylık yaşta Brezilya'dan getirilmiş, 18-20 aylık yaşa kadar da Diyarbakır'da, yarı kapalı ahırlarda entansif besiyeye alınmış oldukları

tespit edildi. Malatya ilimizde faaliyet gösteren özel kesimhanede, numune topladığımız süre içinde büyükbaş kesimi yapılmadığından sığır örnekleri alınamamıştır.

Genel olarak numune aldığımız mezbahalarda, mecburi kesim dışında dişi hayvan kesimi yasal olmamakla beraber, ekonomik ömrünü tamamlayanlar, doğumda pelvis kırıkları, sezeryan, hipokalsemi, travmalar gibi çeşitli sebeplerle kesime sevk edilmiş hayvanlar görülmüştür. Bu çalışma için 5-7 yaş aralığında dişi hayvanlar tercih edilmiştir. Çalışma yaptığımız mezbahalarda ithal hayvan kesimleri de yapılmaktadır. Nitekim Diyarbakır'dan aldığımız kan serumları, erkek hayvanlara ait olup, yaklaşık 8-10 aylık sürede entansif besiyeye alınmış hayvanlardan oluşmaktadır.



Şekil 4.1. ELISA uygulanan sığır kan serum örneklerinde anti-HEV IgG sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü

4.1.2. Koyun anti-HEV IgG Sonuçları

Çalışma kapsamında, toplamda 220 adet koyun kan serumu incelenmiş olup, kan serum örneklerinde ELISA yöntemiyle anti-HEV IgG aranmıştır. Tablo 4.3

incelendiğinde, koyun kan serumu örneklerine ait illere göre numune dağılımı ve sonuçları görülmektedir. Toplanan tüm koyun kan serum örneklerinde, anti-HEV IgG seroprevalansı % 5 (11/220) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

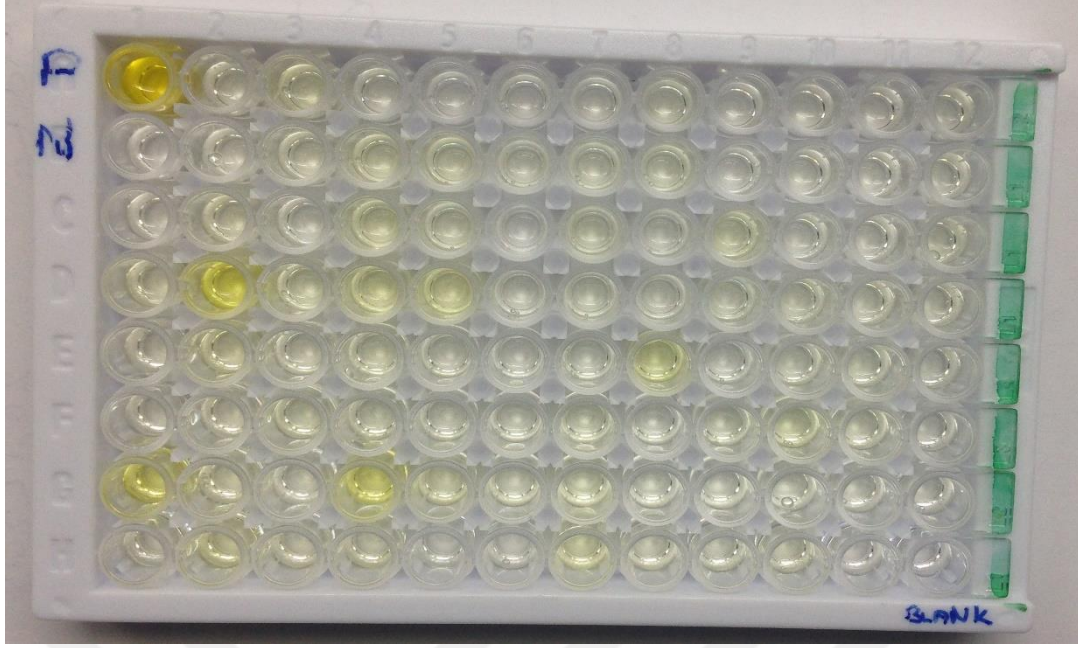
Elazığ'da faaliyet gösteren kesimhanelerden toplamda 76 adet koyun kan serum örneği analize alınmıştır. Toplanan tüm kan serumu örneklerinin 2 tanesi pozitif olup, anti-HEV IgG seroprevalansı % 2.6 (2/76) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Elazığ A kesimhanesinden 2 adet kan serumu örneği alınmıştır. Bu örnekler HEV yönünden negatif bulunmuştur. Elazığ B kesimhanesinden toplamda 74 adet kan serumu örneği alınmıştır. Bu kesimhanede ELISA yöntemiyle analiz edilen kan serum örneklerinin 2 tanesi anti-HEV IgG pozitif bulunmuş ve HEV seroprevalansı % 2.7 (2/74) olarak tespit edilmiştir.

Erzurum (C) ve Diyarbakır (D) illerinde numune aldığımız kesimhanelerde, küçükbaş hayvan kesimi yapılmadığından, koyun örnekleri toplanamadı.

Tablo 4.2. İllere göre koyun kan serum örneklerinde ELISA sonuçları

Nunume Toplanan İller	Kesimhaneler	Numune Sayıları	anti-HEV IgG sonuçları	HEV seroprevalans oranı (%)
Elazığ	A	2	0	0
Elazığ	B	74	2	2.7
Erzurum	C	0	0	0
Diyarbakır	D	0	0	0
Malatya	E	144	9	6,25
Toplam	5	220	11	5

Malatya ilimizde faaliyet gösteren özel bir kesimhaneden (E) toplanan 144 adet koyun kan serum örneğinin 9 tanesi anti-HEV IgG pozitif olarak bulunmuştur. Malatya ilinde HEV seroprevalansı % 6,25 (9/144) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. ELISA uygulanan koyun kan serum örneklerinde anti-HEV IgG sonuçlarının pleyt üzerinde görünümü

4.2. Moleküler Analiz Sonuçları

4.2.1. Sığır Revers Transkripsiyon PCR Sonuçları

100 sığır karaciğer örneği ekstraksiyon işlemlerinin ardından HEV genom kısmı primerleri ile RT-PCR analizleri yapıldı. Tablo 4.2’de illere göre sığır karaciğer dokusu ve kan serum örneklerinde RT-PCR sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.3. İllere göre sığır örneklerinde RT-PCR sonuçları

Nunume Toplanan İller	Kesimhaneler	Karaciğer Dokusu	Doku sonuçları	anti-HEV IgG (+) sonuçları	Serum sonuçları
Elazığ	A	5	0	0	0
Elazığ	B	57	0	3	1
Erzurum	C	13	0	0	0
Diyarbakır	D	25	0	29	0
Malatya	E	0	0	0	0
Toplam	5	100	0	32	1

Tablo 4.2 incelendiği zaman tüm sığır karaciğer örneklerinin hiç birinde HEV nükleik asidi tespit edilememiştir. ELISA ile anti-HEV IgG pozitif bulunan bütün örnekler RT-PCR ile HEV RNA yönünden incelenmiştir. Elazığ'da sonbaharda alınan kan serum örneklerinin bir tanesinde HEV RNA pozitif bulunmuştur.



Şekil 4.3. Sığır serum örneklerine ait PCR sonuçları agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**; 100 bp DNA ladder Cleaver Scientific, İngiltere, **Hat 1**; Negatif kontrol, **Hat 2**; HEV pozitif kontrol, **Hat 3-19**; Sığır serum örnekleri.

4.2.2. Koyun Revers Transkripsiyon PCR Sonuçları

Kesimhanelerden alınan 100 adet koyun karaciğer doku materyali ekstraksiyon işlemlerinin ardından spesifik HEV primerleri ile moleküler analizleri yapıldı. Ayrıca ELISA ile pozitif bulunan kan serumu örneklerinin tamamı RT-PCR yöntemiyle HEV RNA yönünden incelendi. Pozitif bulunan kan serum örnekleri ile karaciğer doku örneklerinin hiçbirinde HEV RNA pozitifliği saptanamadı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. İllere göre koyun örneklerinde RT-PCR sonuçları

Nunume Toplanan İller	Kesimhaneler	Karaciğer Dokusu	Doku sonuçları	anti-HEV IgG (+) sonuçları	Serum sonuçları
Elazığ	A	2	0	0	0
Elazığ	B	63	0	2	0
Erzurum	C	0	0	0	0
Diyarbakır	D	0	0	0	0
Malatya	E	35	0	9	0
Toplam	4	100	0	11	0

4.2.3. Sekans Sonuçları

Sığır kan serum örneğinden elde edilen HEV PCR ürünleri agaroz jelden pürifiye edildi. Saflaştırıldı ve nanospektrofotometreyle yoğunlukları ölçüldü. Sekans analizleri için, HEV primerleriyle çift yönlü DNA dizi analizi, ABI 3730XL genetik analiz sistemi kullanılarak Macrogen (Hollanda) firmasına yaptırıldı. Genbankta diğer HEV türleri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları tespit edildi. Çalışmada, genomik bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ile elde edilen sığır HEV sekansların, daha önce bildirilen rat dizilerinden “Hepatitis E virüsü rat/R63/DEU/2009 complete genome” ile % 97,58 benzerlik paylaştığı görülmüştür.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R175 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	580	580	98%	8e-162	98.77%	MH400714.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R188 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	575	575	98%	4e-160	98.47%	MH400715.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R193 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	569	569	98%	2e-158	98.16%	MH400716.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R149 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	569	569	98%	2e-158	98.16%	MH400712.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus rat/R63/DEU/2009, complete genome	566	566	100%	2e-157	97.58%	NC_038504.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus rat/R63/DEU/2009, complete genome	566	566	100%	2e-157	97.58%	Show report for NC_038504.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R199 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	564	564	98%	8e-157	97.85%	MH400717.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate ratHEVLTU-R166 polyprotein (ORF1) gene, partial cds	558	558	95%	4e-155	98.73%	MH400713.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus isolate R4 polyprotein gene, partial cds and phosphoprotein and capsid protein genes, complete cds	475	475	96%	4e-130	93.69%	GQ504009.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis E virus rat/R63/DEU/2009, complete genome	427	427	100%	1e-115	90.03%	GU345043.1

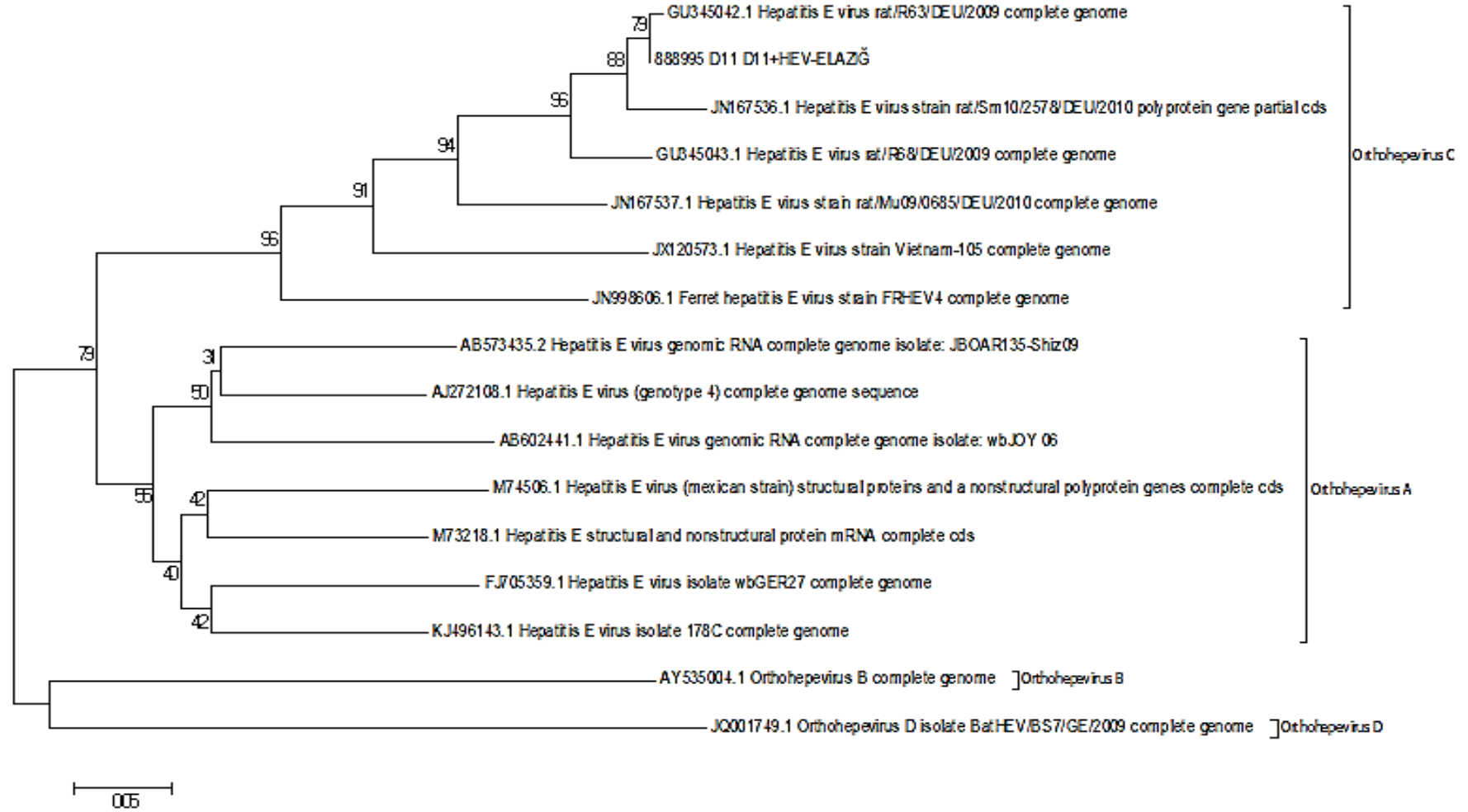
Şekil 4.4. Sığır kan serum örneğinin sekans benzerliği

Tablo 4.5. Sığır kan serum örneğinin ORF-1 bölgesine göre yapılan sekans dizilimi

Kan Serumu	Sekans dizini (5'- 3')
Sığır	CCTTTGTGCTCTGTTTGGCCCGTGGTTTCGGGCCATAGAGAAGGCGATCGTG GACACACTGCCCGAGTGGTGCTTTTATGGTGATTGTTACACCCAGGAGAAA CTGGAGGCCGCTGTGGCTGGGGCGAAAGCGTGCCGCGTATTTGAAAATGAT TTTAGTGAGTTTGATAGTACACAGAATAATTACTCTTTAGGCCTTGAGTGCT TATTGATGAAGGAGGCCGGGCACCTGAGTGGATGTGGAGGTTGTACCACC TGCTCCGTTCCGGCGTGGGTGTTGCAGGCTCCCAAGAGAGCTTGCGGGGTC GATGGAAGAAACACTCTGGTGA

4.2.4. Filogenetik Ağaç Modellemesinin Yapılması

ORF-1 bölgesine göre sekanslaması yapılan Hepatit E virüsünün birbirleri arasındaki akrabalıkları, Maksimum Likelihood metodu kullanılarak Tamura-Nei modeli baz alınarak oluşturulmuştur. Yapılan işlem sonrası meydana gelen filogenetik ağaç Şekil 4.5’de verilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen HEV, Orthohepevirus C genusu içinde bulunmaktadır.



Şekil 4.5. Filogenetik analiz. Tamura-Nei modeli ve maksimum likelihood kullanılarak HEV ORF-1 bölgesi 334 baz çifti hazırlanmıştır. Sekanslar filogenetik ağaçta suş, orjin, konak, genotip olarak tanımlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Hepatit E virüsü (HEV), hem insan hem de pek çok hayvan türlerini enfekte eden gıda kaynaklı, enteral bir RNA virüsüdür. Gelişmiş ülkelerde, insan HEV enfeksiyon vakalarında son yıllarda artış görülmüş ve bu ülkelerde birçok hayvan türünde zoonoz genotip 3 ve 4 tanımlanmıştır. Bu ülkelerde HEV vaka artışında, hayvanlarla doğrudan temas veya hayvansal gıda tüketimiyle insan maruziyeti gösterilmektedir. Gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde ise hepatit E salgınları, daha çok su kontaminasyonu yoluyla olmaktadır. Küresel boyutta hayvansal ve insani atıklarla içme, sulama ve kıyı sularının kirlenmesi, sanayileşmiş ülkelerde endemik vakaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.^{152,153}

Son yıllarda hepatit E virüsünün Avrupa ülkelerinde giderek artan bir sağlık sorununa dönüştüğü ve bilinmeyen insan olgularında artış kaydedildiğine dair vurgu yapılmaktadır.¹⁵³ Coğrafik olarak Türkiye, hepatit E virüsü açısından endemik yerler arasında bulunmaktadır.¹⁴⁰ Türkiye’de hayvan ve hayvansal ürünler üzerine yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Asya, Amerika ve Avrupa’da birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, Veteriner Hekimlik yönünden HEV'nin serolojik ve moleküler prevalansı, genotipleri ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili verilerde son zamanlarda artış görülmektedir. Ancak, hepatit E tanısı, rutin olarak gerçekleştirilmediğinden, dolaşım durumu yeterince anlaşılamamış ve gerekli tanı konulamamıştır.¹⁵⁴ HEV, yüksek risk grubu olan çocuk, yaşlı, gebe ve immunitesi zayıf hastalar ile toplum sağlığı açısından büyük önem arz etmekte, mortaliteye ve morbiditeye neden olabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde kişiden kişiye bulaşma ve enfekte hayvanla temas, kontamine hayvan ürünlerinin iyice pişirilmeden tüketilmesi gıda kaynaklı bulaşta rol oynamaktadır. İnsanlarda HEV enfeksiyonunun sık görülmesi

coğrafik bölge, sosyoekonomik düzey, yaş ve diğer risk faktörlerine bağlı olarak da büyük ölçüde değişmektedir.

Bu çalışmada, farklı kesimhanelerden temin edilen 194 adet sığır kan serumu incelenmiş ve sığır kan serumlarında % 16,5 (32/194) olarak HEV seroprevalansı belirlenmiştir. Elazığ'da iki farklı kesimhanede HEV seroprevalansı % 3,3 (3/78) olarak tespit edilirken karaciğer örneklerinde HEV RNA yönünden pozitiflik (0/62) bulunamamıştır. Erzurum'dan aldığımız sığır kan serumu (0/29) ve karaciğer örneklerinin (0/13) hiçbirinde pozitiflik bulunamamıştır. Sığır kan serumlarında en yüksek HEV seroprevalansı, Diyarbakır ilinde faaliyet gösteren kesimhanelerden toplanan örneklerde saptanmıştır. Sunulan çalışmada Diyarbakır için HEV seroprevalansı % 33,3 (29/87) olarak tespit edildi. HEV IgG, kan serumlarında ELISA yöntemiyle daha yüksek olarak tespit edilmektedir. HEV enfeksiyonu akut dönemde, ELISA ile anti-HEV IgM antikoları saptanırken viral RNA'nın gen amplifikasyonu da yapılabilmektedir. Ancak enfeksiyon geçirildikten sonra uzun dönemde, kanda anti-HEV IgG antikoları ELISA ile tespit edilebilir. Uzun dönemde HEV RNA'lar kan serumlarında analiz edilemez durumdadır.¹⁵⁵

Yapılan çalışmada Elazığ ilinde, bir kan serumu örneğinde HEV RNA viral yük bulundu ve bu örneğin nükleotid dizi benzerliğinin rat HEV'i ile % 97,58 oranında sekans özdeşliği paylaştığı görülmüştür. HEV ORF-1 bölgesi sekanslarının filogenetik analizinde, bulunan izolatın genotip 3'e ait olduğu ve bunun Türkiye'de sığır kan serumlarında ilk kez tespit edildiği görülmüştür. HEV enfeksiyonlarında viral yükün kanda tespit edilebilir seviyeye ulaşması ilk 1-2 ay ile sınırlı olduğu göz önüne alındığında, diğer örneklerin negatif çıkmasına sebep olarak düşünülebilir.

Türkiye'de sığır ve koyunlarda, kan serumu ve karaciğer örneklerinde yapılmış başka bir HEV çalışmasına rastlanılmamıştır. 2019 yılında Demirci ve ark.⁶³ tarafından

48 inek sütü, 65 keçi sütü, 65 koyun sütü ve 53 eşek sütü numunesi ile yapılan çalışmada en yüksek pozitiflik % 20.34 ile inek sütünde bulunmuştur. Bu çalışma ile mevcut çalışma uyumlu bulunmuş ve sığırların HEV için, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bir rezervuar hayvan olabileceği fikri doğmuştur. Araştırmacılar yaptıkları HEV RNA'nın miktarı ve genotiplerinin epidemiyolojik araştırmasında, HEV genotip 1, genotip 3 ve genotip 4 saptamışlardır. Bu çalışmada, sığır kan serum örneğinde Orthohepevirus C genusuna ait HEV RNA izolatu genotip 3 olarak bulunmuştur.

Sunulan çalışmada, analize dahil edilen sığırlar arasında tek yönlü sığır yetiştiriciliğinden bahsetmek söz konusudur. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde besiyeye alınan sığırlar genelde kapalı ya da yarı kapalı ahırlarda beslenmektedir. Büyükbaş hayvanlar yaklaşık 6 aylık yaşa kadar anne sütüne ek merada otlatılırken, 6 aylık yaştan sonra et yönlü beslenen hayvanlar kapalı ahırlarda hareket ve yem kontrollü olarak entansif besiyeye alınmaktadır. Sütçü yetiştirilen sığırlar ise ya farklı hayvan türleriyle beraber aynı meralarda serbest dolaşarak otlatılmakta ya da yarı entansif olarak beslenmektedir. Bu çalışmada, anti-HEV IgG seropozitifliğinin olması sığırlarda ve koyunlarda geçirilmiş bir HEV enfeksiyonuna işaret etmekte ancak epidemiyolojisi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Türkiye HEV açısından endemik ülkeler arasında sayılmasına rağmen, hayvanlar üzerinde yapılmış epidemiyolojik, serolojik ve moleküler bir hepatit E çalışmaya rastlanılmadı. Bu nedenle sunulan çalışma, sığır ve koyunlar üzerinde yapılan ilk serolojik ve moleküler çalışma durumundadır. Ancak Türk insanlarında, bölgelere ve çalışma gruplarına göre farklılıklar içeren prevalans araştırmalarında, erişkinlerde anti-HEV IgG pozitifliği oldukça yüksek bildirilmiştir. Halk sağlığı açısından HEV seroprevalansı üzerine yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Ankara, İzmir, Kayseri, Kahramanmaraş, Van ve Malatya illerinden 2011 gönüllü kişi üzerinde kan serum

örnekleri incelenmiştir. Analizler ELISA yöntemiyle çalışılmış, bu çalışmada olduğu gibi pozitif bulunan örnekler de HEV RNA viral yükü aranmıştır. Aynı zamanda, farklı iki ticari kit olan Dia Pro (İtalya) ve Wantai (Çin) anti-HEV ELISA testlerinin sonuçlarını da karşılaştıran araştırmacılar, Türkiye’de HEV seroprevalansı sırasıyla, % 11,34 ve % 12,08 olarak belirlemiştir. İllerin sonuçları Dia.Pro (İtalya) ve Wantai (Çin) için sırayla; Ankara % 12,01 - % 12,51, Kayseri % 6,99 - % 7,81, Malatya % 14,50 – % 15,55, İzmir % 8,07 - % 9,65, Kahramanmaraş % 14,5 – % 15,5 ve Van % 11,91 - % 12,99 olarak bulunmuştur.¹⁴⁴ Yine 2018 yılında, Çanakkale ilinde yapılan bir prevalans çalışmasında ise anti-HEV IgG seropozitiflik % 7,2 (erkeklerde % 11,6, kadınlarda ise % 4,5) olarak saptanmıştır.¹⁴⁰

HEV enfeksiyonları, küresel halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından önemli, viral bir hepatit etkidir. Yaygın dağılımı, çoklu iletim yolu ve zoonotik potansiyeller nedeniyle gıda güvenliği açısından da önemlidir. Araştırmacılar tarafından, HEV seroprevalansı üzerinde tek tür hayvan yetiştiriciliği ile karma yetiştirilen hayvanların ve domuz varlığı ile çeşitli hayvan ırkları, cinsiyet ve yaş olasılıklarının altı çizilmektedir.¹⁵⁶ Sunulan çalışmada sığır ve koyunlar, keçi ve tavuk gibi farklı türlerle aynı beslenme alanını paylaşmaktadır. Dahası küçük ölçekli işletmelerde fare, rat gibi kemirgen mücadelesi de yapılmamaktadır. Yem depolarında ve yemliklerde çok sayıda fare ve rat dışkılarını görebilmek mümkündür. Özellikle sığırlar bu hayvanların dışkılarını yem tüketimi sırasında alabilmektedir. Nitekim bu çalışma, sığır kan serumunda bulduğumuz yüksek seropozitiflik ve rat izolatlarına %97,58 benzerlik gösteren HEV RNA tespiti bu görüşü desteklemektedir. Bu durum, farklı hayvan rezervuarlarından söz edilerek çapraz kontaminasyon olabileceği anlamına gelmektedir.

Hollanda’da hepatit E vakalarında belirgin bir artış görülmesi üzerine yürütülen bir çalışmada, Hepatit E virüsünün ortaya çıkma nedenleri ve enfeksiyonunun kesin

kaynakları ile bulaşma yolları araştırılmıştır. Çalışmada genel HEV IgG-seroprevalansı % 31 olarak bulunmuş ve bunun yaşla birlikte arttığı görülmüştür. Sık tüketilen domuz eti ve ürünleri, sığır eti ve ürünleri, beslenme alışkanlıkları, vahşi hayvanlar ve köpeklerle temas, kontamine suyla temas, gıdaların üretim yöntemleri ve özellikle salam ve sosisler içindeki hayvansal dokunun miktarı ve türü seropozitiflik için bir risk faktörü olarak ilişkilendirilmiştir.¹⁵⁷ Sunulan çalışmada karaciğer örneklerinin hiçbirinde HEV RNA tespit edilememiştir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yöresel pişirme teknikleriyle tüketilen karaciğer oldukça önemli bir hayvansal gıdadır. Bu çalışmada, sığırlarda yüksek HEV seroprevalansı, hayvanlarda geçirilmiş enfeksiyon varlığına işaret etmekte, enfekte karaciğerlerin pişirme sıcaklığının yetersizliği halk sağlığı açısından bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütüne göre HEV'e bağlı, yılda yaklaşık 20 milyon enfeksiyonu, 3,3 milyon hepatit E vakası ve 44.000 üzerinde ölüm olduğu tespit edilmiştir.¹³⁰ Son zamanlarda, Avrupa kıtasında, Amerika, Afrika ve Asya kıtalarında özellikle belirli bölgelerde insan HEV enfeksiyonu vakalarında ve büyük salgınlarda düzenli bir artış olduğu bildirilmektedir.¹⁵² Hepatit E'nin ortaya çıkışı ile ilişkili olabilecek potansiyel konakçı, çevresel ve viral faktörler analiz edilerek sığır, koyun, keçi, domuz, geyik ve tavşan gibi sayısız HEV rezervuar hayvanının varlığı, enfekte hayvanlara doğrudan temas veya hayvansal ürünler tüketimi yoluyla insan maruziyetine yol açabileceği görülmektedir.

Domuzlar ana rezervuar olsa da, geviş getiren hayvanların da hepatit E virüsüne (HEV) duyarlı olduğu bilinmektedir. Domuzların nadir olduğu yerlerde de, insanların geviş getiren hayvanlarla yakın temas sonucu HEV pozitifliği bildirilmiştir.¹⁵⁸ Kırsal ortamlarda HEV'nin zoonotik geçişinin araştırıldığı bir çalışmada anti-HEV antikoru ve virüs prevalansını ölçmek için, domuzların nadir olduğu yerlerdeki ruminant yetiştiricisi

171 kişiden ve kontrol grubu olarak da ruminantlarla teması olmayan 155 kişiden kan ve rektal swablar numune olarak alınmıştır. Aynı yerdeki sığırlardan 173 ve diğer ruminantlardan (27 keçi ve 5 manda) 32 adet kan ve rektal swab toplanmıştır. Çalışmada anti-HEV antikor seroprevalansı sığırlarda % 6,8 olarak bulunurken, keçi ve manda örneklerinde % 8 olarak bulunmuştur. Sığır çiftliklerinde çalışan köylülerde anti-HEV IgG seroprevalansı (% 59,1) kontrol grubunda (% 43,9) bulunmuş ve yaşla birlikte anlamlı olarak arttığı ($p = 0.008$) görülmüştür. HEV RNA, örneklerin hiçbirinde saptanamamıştır. Çalışmada olası bir enfeksiyon kaynağı olarak sığırların rolü vurgulanmıştır.¹⁵⁸

Türkiye'nin batı kıyılarında kayıtlı evcil domuz çiftliği bulunmasına rağmen, anti-HEV IgG pozitif bulduğumuz Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde hiçbir kayıt bulunamamıştır. Türkiye'de, TÜİK Şubat 2019 verilerine göre, Veteriner Bilgi Sistemine kayıtlı, 1109 baş bir yaşından küçük olmak üzere, toplamda 1636 baş evcil domuz yetiştirilmektedir.¹⁵⁹ Manavgat'da bir domuz kesimhanesinin de dahil olduğu Antalya, İzmir ve Bursa illerinde kayıtlı domuz çiftlikleri bulunmaktadır. Ancak, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, kayıtlı ya da kayıtsız sayısal bir veriye ulaşamamıştır, fakat artan bir yaban domuzu popülasyonundan söz edilebilir. Son yıllarda, çiftçilerden gelen talep üzerine Tarım ve Orman Bakanlığı, yaban domuzu popülasyonunun yoğun olduğu, Elazığ ve çevre illerin de dahil edildiği bazı yerlerde, zirai mücadele kapsamında süreklilikle avı başlatmıştır. Domuz ürünlerinin piyasaya arzı ve tüketimi sınırlı olmasına rağmen, yasal düzenlemelerle domuz et ve ürünlerinin dolaşımı, diğer tüm et ve et ürünlerinde olduğu gibi, etiket bilgilerinde açıkça tanımlanmaktadır. Fakat yaban domuzlarının beslenme alanlarında sığır, koyun, tavşan, rat, fare, keklik, köpek, bıldırcın gibi evcil ve yabani hayvanların da yaşadığı düşünülürse HEV açısından insan sağlığına risk oluşturabileceği görülmektedir.

Nitekim farklı bölgelerimizde insanlar üzerine yapılan pek çok çalışmada, anti-HEV seropozitifliği en fazla Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde tespit edilmiş ve riskin yaşla arttığı vurgulanmıştır.^{6,140,142,143,145,160}

Yan ve ark.¹¹⁵ yaptıkları bir çalışmada, ELISA ve PCR yöntemiyle sığır kan serumlarını incelemiştir. HEV'e karşı antikorlar açısından seropozitiflik oranı % 47 (120/254) iken, HEV RNA pozitif oranı % 3 (8/254) olarak tespit edilmiştir. Pozitif sığır yaşları irdelendiğinde, bir sığır 1 yaşından küçük, üç sığır 1-3 yaş arasında ve dört sığır 3 yaş üzerinde olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, aynı yerden aldıkları koyun, köpek ve tavuklarda seropozitiflik oranlarını sırasıyla % 32 (70/222), % 41 (80/194) ve % 8 (41/484) olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar, bizim kan serumları sonuçlarımızla kıyaslandığında oldukça yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 983 ineğin kan serum örneklerinin incelendiği bir çalışmada¹⁶¹, anti-HEV IgG varlığı % 20.4 seropozitif olarak bulunmuştur. En yüksek seroprevalans oranı % 68.4 ile Georgia'daki sürülerde tespit edilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda, sığırlarda HEV'in epidemiyolojisini genetik olarak tanımlamak amacıyla, bilinen bir seropozitif süt sürüsünden, doğuştan itibaren 10 yeni doğan buzağıyı, 6 aylık yaşa kadar HEV açısından izlemişler. 10 buzağıdan 3 tanesinde anti-HEV IgG antikorları önemli ölçüde tespit edilmiştir. Araştırmaya dahil edilen sığırlardaki genotip 3 HEV'in filogenetik analizinde, insanlardaki HEV ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Ancak, araştırmacılar HEV RNA'yı bulamadıkları hayvanlarda, bunun HEV enfeksiyonu olmadan, antijenik olarak ilişkili bir ajanın varlığını göstermesi açısından dikkat çekici olduğunu da bildirmişlerdir. Bu çalışma, Türkiye'de beslenmiş sığırlarda yapılan ilk HEV araştırması özelliğinde olup ve Doğu Anadolu Bölgesi ile kıyaslandığında, Güney Doğu Anadolu Bölgesinde oldukça yüksek bir HEV prevalansı tespit edilmiştir.

Hepatit E, çoklu konakları etkileyen viral bir zoonozdur. Hayvanların enfeksiyon durumu hala belirsizliğini korumakta ve enfekte hayvanlardan elde edilen gıdaların tüketimi yoluyla insan sağlığına risk olduğu görölmektedir. Bu amaçla İspanya'da yapılan bir araştırmada, coğrafi olarak yakın dolaşıma sahip evcil domuzlar, büyükbaş hayvanlar ve yabani hayvanlar (yaban domuzu ve kızıl geyik) 8 yıl boyunca (2003-2010) incelenmiştir. Yabani domuzlar % 10 ve kırmızı geyikler % 16 oranında pozitif bulunurken evcil domuzlarda HEV RNA tespit edilememiştir. Ancak, serolojik olarak evcil domuzlarda % 43.75, yaban domuzunda % 57.40 ve kırmızı geyikten alınan örneklerde % 12,85 anti-HEV antikorları saptanmıştır.¹⁶² Bu sonuçlar HEV durumunda, yaban hayatında virüsün sirkülasyonu ile insan sağlığı için bir risk oluşturduğunu açıklar niteliktedir. Bu çalışma kapsamına aldığımız hayvanlar, yaban domuzu da dahil pek çok türün dolaştığı aynı yerlerde otlatılmaktadır. Sonuçlarımızda, sığırlar arasında seropozitif bulduğumuz Elazığ ve Diyarbakır ile, koyunlar arasında seropozitif bulduğumuz Elazığ ve Malatya illeri coğrafi olarak oldukça yakın iller olup hayvanlar aynı meraları kullanabilmektedir.

Doğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilen koyunlar, kışlak ve yaylak temeline dayalı göçer yöntemi ile Elazığ, Malatya, Diyarbakır, Bingöl, Tunceli ve Urfa illerinde tamamen meralarda beslenmektedir. İlkbahar ve sonbahar aylarında Elazığ, Malatya, Diyarbakır, Bingöl ve Tunceli gibi illerde kendi meralarında otlatılan hayvanlar, yaz aylarında Doğu Anadolu Bölgesinde yüksek yaylalara göç ederken, kışın daha sıcak olan Urfa, Diyarbakır ve Adıyaman gibi Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki illere göç etmektedir. Bu nedenle numune topladığımız mezbahalara getirilen hayvanlar geniş bir sahada beslenmiştir. Çalışma kapsamında koyun örnekleri Elazığ ve Malatya illerinde faaliyet gösteren kesimhanelerden toplanmıştır. Elazığ'da koyun örneklerinde HEV seroprevalansı % 2,63 (2/76) olarak belirlenmiştir. Malatya'da ise koyun örneklerinde

HEV seroprevalansı % 6,25 olarak tespit edilmiştir. Ancak daha net verilere ulaşabilmek için ekstra çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Süt ineklerinin, süt ve dışkı örneklerinde enfeksiyöz HEV genomları keşfedilmiştir. Avrupa'daki otokton HEV enfeksiyonlarının son zamanlardaki artışı dikkat çekmiş, ineklerin bu bölgede bir HEV rezervuarı oluşturup oluşturmadıklarına dair araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla potansiyel olarak Avrupalı tüketicilere yönelik zoonoz riskli inekleri doğrulamak için yapılan bir çalışmada, Belçika'nın Flanders kentindeki inek sütleri ve fekal örnekler HEV RNA ve HEV-spesifik antikorların varlığı açısından analiz edilmiştir. Numune alınan yerdeki karma çiftliklerde, domuzlarda aktif HEV enfeksiyonu kanıtı bulunmasına rağmen, ineklerde aktif veya geçirilmiş HEV enfeksiyonu belirtisi tespit edilememiştir.⁷¹ Sunulan çalışmada, sığırlarda % 16,5 ve koyunlarda % 5 HEV seroprevalansı geçirilmiş bir HEV enfeksiyonunu anlatması bakımından önemli bulunmuştur. Ancak bulunan HEV RNA'nın rat HEV'ine benzerliği enfeksiyonun hala dolaşımında olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Sanayileşmiş ülkelerde insan HEV enfeksiyonlarını açıklamak için, domuzun ana rezervuarları olduğu görüşünün yetersiz olduğu ağırlık kazanmıştır. Son zamanlarda HEV'nin çeşitli hayvan türlerinde tanımlanması da HEV zoonotik enfeksiyonu için ilave potansiyel endişeler ortaya çıkarmaktadır. Koyunların hepatit E virüsünün potansiyel konakçı rolünün incelendiği bir çalışmada, İtalya'da bulunan yedi çiftlikten 192 koyun taranmış, HEV'e özgü antikorlar 41 hayvanın serumunda (% 21.3) saptanırken, HEV RNA'sı üç serum örneğinde (% 1.6) ve 20 dışkıda (% 10.4) genotip 3'e ait olarak tespit edilmiştir.¹⁶³ Bu çalışmada koyunlarda HEV RNA pozitif tespit edilemedi.

Koyun örnekleriyle yaptığımız çalışmada, Malatya ilinden aldığımız örneklerde anti-HEV seropozitifliğini % 6,25 olarak tespit ettik. Bu sonuçları Elazığ ile

kıyasladığımızda, Malatya ilinde daha yüksek HEV seroprevalansı saptanmıştır. İnsan kan serumlarında, 1996 yılında Ankara ve 2001 yılında Malatya'da insan HEV seroprevalans çalışmalarında, 2017 yılında yapılan çalışmaya göre pozitiflik oranında artış söz konusu olduğunu araştırmacılar bildirmişlerdir.¹⁴⁴ Yaptığımız çalışmanın, bu çalışmayı destekler nitelikte olduğunu gördük.

Hepatit E virüs enfeksiyonları Avrupa'da güncel bir konu iken, ABD ve Latin Amerika'da hepatit E virüs enfeksiyonlarının epidemiyolojisini, seroprevalansını hesaplamak ve düşük sosyoekonomik durumun, hepatit E virüs maruziyeti ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için bir meta analizi yapılmıştır. Literatür taraması Ocak 1994 ile Aralık 2016 tarihli makaleler arasından PubMed'de yapılmıştır. Sonuç olarak; ABD'de seroprevalans, metodolojik kalite veya çalışma yılı bağımsız olarak, Latin Amerika'da olduğundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Avrupa'da yayınlanan verilerle yapılan bir karşılaştırmada, anti-HEV seroprevalansının ABD'deki ile önemli ölçüde farklılık olmadığını göstermiştir. Çalışmada, Hepatit E virüsünün ABD'de yaygın olmasına rağmen birçok Güney Amerika ülkesinde hepatit E virüsüne maruz kalma riskinin düşük olmasına dikkat çekilmiştir. Bu nedenle, hepatit E virüsü düşük sağlık standartlarına sahip ülkelerle sınırlı değildir ve daha yüksek bir sosyoekonomik durum, hepatit E virüsüne maruziyette halk sağlığını korumadığı bildirilmiştir.¹⁶⁴

Geng ve ark.¹⁶⁵ 2019 yılında yayınladıkları bir çalışmada, Çin'de sütçü ineklerde HEV zoonotik riski belirlemek için yapılan bir çalışmada, 467 fekal örnek, 276 ineklerin taze süt örneği ve 140 perakende süt örneği Mart 2017'den Mayıs 2018'e kadar toplanmıştır. İneklerin barındıkları karma çiftliklerde HEV tespiti için tavşan ve domuz fekal örnekleri de toplanmıştır. Sonuçta, HEV RNA ve seropozitiflik herhangi bir inek dışkı ve süt örneğinde tespit edilmemiş, ancak HEV RNA % 9,3 domuz dışkısı ile %

18.9 tavşan dışkısında pozitif bulunmuştur. Filogenetik analizi neticesinde domuzlardan elde edilen HEV izolatlarının hepsinin genotip 4'e ait olduğu ve tavşanlardan alınanların genotip 3-tavşan HEV'i olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada sığır kan serumunda tespit ettiğimiz HEV'in rat HEV'ine benzerliği görülmüştür.

Bugüne kadar hepatit E virüsü, insanlardan ve birçok hayvan türünden izole edilmiştir. Bulgaristan'ın farklı bölgelerinde, endüstriyel domuzlarda HEV seroprevalansını incelemek için yürütülen çalışmada genel HEV seroprevalansı % 60,3 olarak bulunmuştur. HEV ve zoonotik potansiyeli konusunda çapraz bulaşma düşünüldüğü zaman sınır komşumuz Bulgaristan'da endüstriyel çiftliklerde HEV'nin yaygın olduğu görülmektedir.¹⁶⁶

Mesleki sağlık açısından önem arz eden zoonotik viral enfeksiyonların incelendiği bir araştırmada HEV enfeksiyonu, çiftlik ve tarım işçileri arasında, veteriner hekimler, kasaplar, hayvan cepleri, sağlık çalışanları ve askerler arasında önemli sağlık riskleri içinde bildirilmiştir.¹⁶⁷ Nitekim 2003 yılında Ceylan ve ark.⁴⁶ tarafından, Diyarbakır yakınlarında, Hevsel bahçelerinde çalışan tarım işçileriyle yürütülen bir araştırmada, tarımda arıtılmamış atık su kullanımı sonucu, HEV seropozitifliği % 34.8 olarak bulunmuştur.

Türkiye halk sağlığı açısından diğer hepatitli hasta gruplarında yapılan değerlendirmede, hepatit E seropozitifliği, hepatit C hastalarında % 76.3 (29/38) oranında en yüksek olarak tespit edilmiştir. Hepatit B hastalarında % 50 (142/284), hepatit D hastalarında % 70.7 (58/82), kontrol grubunda ise % 56.2 (349/621) tespit edilmiştir. Anti-HEV IgG pozitifliğini etkileyen faktörlerin analizinde, ileri yaş, kırsal kökenli olmak, eğitim seviyesinin düşük olması, evli olmak, hayvanlarla temas öyküsünün olması ve sirotik hastalığın bulunması durumunda arttığı görülmüştür.¹⁴³

Hepatit E virüs enfeksiyonu teşhisi akut dönemde, ELISA ile anti-HEV IgM antikorlarının saptanması veya viral RNA'nın gen amplifikasyonu ile olmaktadır. Enfeksiyon geçirildikten sonra ise uzun dönemde, kanda anti-HEV IgG antikorlarının varlığı tespit edilebilir. HEV antikor ve RNA'ları analiz etmek için kan serumu, dışkı, swab örnekleri, safra içeriği, süt, tükürük, karaciğer dokusu ve kemik iliği gibi farklı örnekler incelenebilir.¹⁵⁵

Hepatit E virüsü farklı hayvan türlerinde tespit edilmiş bir zoonotik patojendir. İspanya'da hayvanat bahçelerinde bulunan primatlarda (NHP) yapılan bir çalışmada anti-HEV antikorları, % 4,4 oranında (8/181) tespit edilmiştir. Örneklenen 33 tür hayvandan 5 türünde (% 15.2) en az bir seropozitif hayvan bulunmuştur. Çalışmada test edilen serum numunelerinin hiçbirinde HEV RNA tespit edilememiştir.¹⁶⁸ Türkiye'deki hayvanat bahçelerinde bulunan türlerin HEV enfeksiyonu açısından değerlendirilmesinde halk sağlığı açısından yarar olabilir.

Hepatit E önlenmesi ve kontrol edilmesinde değişen epidemiyolojik özelliklerini incelemek amacıyla Çin'de hepatit E verileri 2004'den 2017'ye kadar analiz edilmiştir. Bu çalışmada düşük mevsimsel yoğunluğu, orta yaşlı nüfusta görülme sıklığı, çiftçiler ve bakım evleri arasında daha yüksek riskin varlığı dikkat çekmiş ve bu yüzden bağışıklık stratejisine büyük ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır.¹⁶⁹

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde hayvan endüstrisinde, çalışanlar arasında IgG ve IgM antikorlarının seroprevalansının araştırıldığı bir çalışmada hayvansal teması olmayan bireylerden ve hayvanlarla çalışan kişilerden (hayvancılık yapanlar, veteriner hekimler, kasaplar) örnekler alınmıştır. Toplamda anti-HEV IgG antikorlarının prevalansı % 3.0 (12/400) iken, anti-HEV IgM antikorlarının prevalansı % 0.25 (1/400) tespit edilmiştir. Anti-HEV IgG, hayvancılıkla uğraşan işçilerinin % 7'sinde, veteriner hekimlerin ve kasapların % 2'sinde saptanmıştır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın ilk

olduğunu belirterek 6nemini vurgulamışlardır.¹⁷⁰ Bu 7alışma, T6rkiye’de beslenen koyun ve sığırarda, kan serumu ve karaciğer dokularında yapılan ilk HEV 7alışmasıdır. Bu nedenle, HEV konusunda yeni yapılacak 7alışmalara zemin hazırlaması bakımından 7ok 6nemli bir veri olarak g6r6lmektedir. Hem mesleki sağlık a7ısından hem de halk sağlığı a7ısından farkındalık oluşturması y6n6yle değerli bilgilere ulaşılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hepatit E virüsü, son yıllarda gelişmiş ülkelerde artan bir prevalansa sahip, multi rezervuar konakçısı olan, gıda zinciri yoluyla enfeksiyon oluşturabilen, çoklu iletim yolu ve zoonotik potansiyeller nedeniyle, gıda güvenliği açısından oldukça önemli bir virüstür. Enfekte hayvanlarla doğrudan temas veya hayvansal ürün tüketimi yoluyla insan maruziyeti söz konusudur. HEV, sanayileşmiş ülkelerde sporadik vakaların ortaya çıkmasına, gelişmekte olan ülkelerde ise hayvansal ve insani atıklarla sularının kirlenmesi sonucu salgınlara yol açmaktadır. Yeni araştırmalar, hayvan rezervuarları ve zoonotik bulaşmanın olduğunu göstermekle kalmadı, günümüzde HEV'in türler arası çapraz enfeksiyonu ile dünya çapında önemli bir sağlık sorunu oluşturduğunu da göstermiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında Türkiye endemik bölgeler arasında gösterilmiş ve insan kan serumlarında yapılmış çalışmalarda, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde en yüksek HEV prevalansı tespit edilmiştir. Halk sağlığı açısından HEV enfeksiyonunun sık görülmesinde, coğrafik bölge, sosyoekonomik düzey, enfekte hayvansal ürün tüketimi, orta yaş grubu, kontamine olmuş su ve toprakla temas durumu, evde yaşayan insan sayısı, tuvalet tipi, kırsal veya kentsel yerleşim yeri, geçirilmiş veya devam eden sarılık öyküsü, bağışıklık durumu, hayvansal gıda sektöründe çalışanlar, kasaplar ve veteriner hekimler gibi meslek grupları riskler olarak sayılabilir. Hayvan sağlığı açısından, evcil ve yabani domuz varlığı, sığır, koyun, keçi, tavuk, tavşan vb. hayvanların ortak alanlarda beslenmesi ve barındırılması, rat ve fare gibi kemirgenlerin yem depolarını ve yemlikleri dışkılarıyla bulaştırmaları, enfekte anne ile yavruların yakın teması, kanalizasyon atıklarının bulunduğu yerlerde hayvanların otlatılması gibi etkenler HEV'in bulaşması ve yayılmasında önemli bir role sahiptir.

Bu alışmada, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan Elazığ, Erzurum, Malatya, Diyarbakır illerinde faaliyet gösteren kesimhanelerde, koyun ve sığır kan serumları ile karaciğer dokuları, randomize örnekleme yöntemiyle toplanmıştır. Alınan sığır kan serumu rneklelerinde HEV seroprevalansı % 16,5; koyun kan serumlarında % 5 olarak belirlendi. Seropozitif bulunan serum rnekleleri ile toplanan karaciğer doku rnekleleri HEV RNA yönünden incelendi. Karaciğer dokusunda HEV RNA negatif bulunmuştur. Elazığ'dan alınan sığır kan serumunun birinde pozitif bulunan HEV RNA sekanslaması sonucunda Orthohepevirus C grubunda, % 97,58 oranında rat HEV'ine benzer genotip 3 bulunmuştur.

Bulgularımız, sığır ve koyunların Hepatit E virüsü için bir rezervuar hayvan olduğunu ve insanlarda gıda zinciri yoluyla enfeksiyona yol acabileceğini göstermiştir. Bu çalışmayla kırsal ve kentsel nüfusun, HEV'nin önemi konusunda farkındalığının artırılması için önemli bir veri elde edilmiştir. HEV bulaşını önlemek için, risk faktörlerini belirleyip halkın bilinçlendirilmesi, gıda ve yem ile ilgili hijyen kurallarına uyulması, temel alt yapı koşullarının düzeltilmesi, temiz ieme ve kullanma suyuna erişimin sağlanması gereklidir. Hayvanlarda enfeksiyon asemptomatik seyirli olduğu için, gıda güvenliği açısından HEV'in yasal otoritelerce, düzenli aralıklarla analiz kapsamına alınması, risk tabanlı kontrollerin planlanması yararlı olabilir. Multi konak rezervleri için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*, 2010, 41: 46.
2. Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver Int*, 2016, 36: 467–472.
3. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic hepatitis E virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses*, 2016; 8, 270.
4. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Origin and dispersal of hepatitis e virus. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7: 11.
5. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Hepatitis E: Discovery, Global impact, control and cure. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 7030-7045.
6. Aydın NN. Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran olgularda hepatit E virüsü seroprevalansının araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2015.
7. Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*, 2013, 33: 41–49.
8. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-a, non-b hepatitis. possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-a, non-b type. *Am. J. Med*, 1980, 68: 818–824.
9. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze E, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 1983, 20: 23–31.
10. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1990; 247: 1335-1339.

11. Tam AW, Smit MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991, 185: 120-31.
12. Meng XJ. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res*, 2011, 161: 23–30.
13. Kaba M, Moal V, Gérolami R, Colson P. Epidemiology of mammalian hepatitis e virus infection. *Intervirology*, 2013, 56: 67–83.
14. Atasever M, Alişarlı M, Tonbak F. Gıdalarla taşınan virüsler. *Turkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2015, 1: 102-8.
15. Khuroo MS, Khuroo MS. Sanitation and sewage disposal in India. *JK-Practitioner*, 2015, 20: 43–46.
16. Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes*, 2015, 50: 410–417.
17. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E: An emerging global disease—From discovery towards control and cure. *J Viral Hepat*, 2016, 23: 68–79.
18. Fierro NA, Realpe M, Meraz-Medina T, Roman S, Panduro A. Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 2271–2283.
19. Thiry D, Mauroy A, Pavio N, Purdy MA, Rose N, Thiry E, Oliveira-Filho EF. Hepatitis E virus and related viruses in animals. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64: 37–52.
20. Saffar MJ, Farhadi R, Ajami A, Khalilian AR, Babamahmodi F, Saffar H. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in 2–25-year-olds in Sari district, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*, 2009, 15: 136–142.

21. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses*, 2016, 8: 253-273.
22. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*, 2008; 8: 698-709.
23. Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E Virus. *J Viral Hepat*, 2010, 17: 153–161.
24. Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, Li L, Wang X, Zhuang H. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res*, 2009, 39: 1153-8.
25. Geng JB, Fu HW, Wang L, Wang XJ, Guan JM, Chang YB, Li LJ, Zhu YH, Zhuang H, Liu QH, Peng XC. Hepatitis E virus (HEV) genotype and the prevalence of anti-HEV in 8 species of animals in the suburbs of Beijing. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2010, 31: 47-50.
26. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J. Hepatitis E. *Lancet*, 2012, 379: 2477-88.
27. Panda SK, Varma SP. Hepatitis E: molecular virology and pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol*, 2013, 3: 114-124.
28. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group. Consensus proposals for classification of the family hepeviridae. *J Gen Virol*, 2014, 95: 2223–2232.
29. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012, 1023.
30. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, Shalimar, Nayak B, Kumar CT R, Surjit M. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis

- of a novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis E virus. *PLoS Pathog*, 2016, 4: 1-31.
31. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*, 2014; 27: 139-65.
 32. Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khattar SK, Fredericksen B, Zhang YJ. Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J Virol*, 2014, 88: 11924-32.
 33. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*, 2008, 33: 451-64.
 34. Emerson S U, Nguyen H, Torian U and Purcell R H. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol*, 2006, 80: 10457–10464.
 35. Graff J, Nguyen H, Yu C, Elkins WR, Claire MS, Purcell RH, Emerson SU. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol*, 2005,79: 6680-6689.
 36. Surjit M, Oberoi R, Kumar R and Lal SK. Enhanced alpha1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3- expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J Biol Chem*, 2006, 281: 8135–8142.
 37. Pischke S, Wedemeyer H. Hepatitis E virus infection: Multiple faces of an underestimated problem. *J Hepatol*, 2013, 58: 1045–1046.
 38. Riveiro-Barciela M, Rodriguez-Frias F, Buti M. Hepatitis E virus: New faces of an old infection. *Ann Hepatol*, 2013, 12: 861–870.

39. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, Johne R, Koenig M, Jameel S, Harrison TJ, Meng XJ. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*, 2016, 97: 537–542.
40. Zehender G, Ebranati E, Lai A, Luzzago C, Paladini S, Tagliacarne C, Galli C, Galli M, Ciccozzi M, Zanetti AR. Phylogeography and phylodynamics of European genotype 3 hepatitis E virus. *Infect Genet Evol*, 2014, 25: 138–143.
41. Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, He Z, Yang C, Bi Y, Cao W. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*, 2016, 64: 350–359.
42. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, Tang Y, Sivakumar S, Xie J, Bai R, Wernery R. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 1044–1048.
43. Lee GH, Tan BH, Teo ECY, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology*, 2016, 150: 355–357.
44. Yang Y, Shi R, She R, Soomro MH, Mao J, Du F, Zhao Y, Liu C. Effect of swine hepatitis E virus on the livers of experimentally infected Mongolian gerbils by swinehepatitis E virus. *Virus Res*, 2015, 208: 171-9.
45. Masclaux FG, Hotz P, Friedli D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res*, 2013, 47: 5101–5109.

46. Ceylan A, Ertem M, Ilcin E, Ozekinci T. A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol Infect*, 2003, 131: 753–756.
47. Teshale EH, Howard CM, Grytdal SP, Handzel TR, Barry V, Kamili Sü, Drobeniuc J, Okware S, Downing R, Tappero JW. Hepatitis E epidemic. *Uganda Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 123–129.
48. Miyashita K, Kang JH, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida T. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol Res*, 2012, 42: 870–878.
49. Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10: 4507–4533.
50. Izopet J, Kamar N. Hepatitis E: From zoonotic transmission to chronic infection in immunosuppressed patients. *Med Sci*, 2008, 24: 1023–1025.
51. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 9860– 9865.
52. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*, 1998, 72: 9714–9721.
53. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 1958–1960.
54. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 2003, 362: 371–373.

55. Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol Res*, 2005, 31: 178–183.
56. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis*, 2003, 188:944.
57. Tamada Y, Yano K, Yatsunami H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, 2004, 40: 869– 870.
58. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be foodborne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2351–2357.
59. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis*, 2008, 198: 1732–1741.
60. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*, 2010, 202: 825–834.
61. Surya IG, Kornia K, Suwardewa TG, Mulyanto, Tsuda F, Mishiro S. Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol*, 2005, 75: 499–503.
62. Chibber RM, Usmani MA, Al-Sibai MH. Should HEV infected mothers breast feed. *Arch Gynecol Obstet*, 2004, 270: 15–20.

63. Demirci M, Yiğın A, Ünlü Ö, Kılıç Altun S. Detection of HEV RNA amounts and genotypes in raw milks obtained from different animals. *Mikrobiyol Bul*, 2019, 53: 43-52.
64. Sanford BJ, Emerson SU, Purcell RH. Serological evidence for a hepatitis E virus (HEV)-related agent in goats in the United States. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60: 538–545.
65. Mesquita JR, Oliveira D, Rivadulla E, Abreu-Silva J, Varela MF, Romalde JL, Nascimento MSJ. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol*, 2016, 58: 13–15.
66. Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18: 2085–2087.
67. Song YJ, Jeong HJ, Kim YJ, Lee SW, Lee JB, Park SY, Song CS, Park HM, Choi IS. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol*, 2010, 82: 583–591.
68. Li TC, Miyamura T, Takeda N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg*, 2007,76:170-2.
69. Gao S, Li D, Zha E, Zhou T, Wang S, Yue X. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12: 2026–2036.
70. Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, Miyoshi M, Goto A, Matsubayashi K, Ikeda H. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch Virol*, 2012, 157: 2363–2368.
71. Vercouter AS, Sayeda İM, Lipkencs Z, Bleeckerd K, Vliegheer S, Colmane R,

- Koppelmanf M, Suprég K, Philip Meulemana P. Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 281: 54–59.
72. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette Dakika, Toth TE, Engle RE. 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.
73. Bouwknecht M, Engel B, Herremans MM, Widdowson MA, Worm HC, Koopmans MP. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect*, 2008, 136: 567–576.
74. Meng XJ, Dea S, Engle RE, Friendship R, Lyoo YS, Sirinarumit T. 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.
75. Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis*, 2006, 38: 55–58.
76. Drobeniue J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis*, 2001, 184: 1594–1597.
77. Kasorndorkbua C, Opriessnig T, Huang FF, Guenette Dakika, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 7831–7837.
78. Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, Srivastava S, Naik S. A serological study of

- intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*, 2003, 10: 446–449.
79. Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat*, 2009, 16: 519–523.
 80. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004, 85: 240–244.
 81. Guo H, Zhou EM, Sun ZF, Meng XJ. Egg whites from eggs of chickens infected experimentally with avian hepatitis E virus contain infectious virus, but evidence of complete vertical transmission is lacking. *J Gen Virol*, 2007, 88: 1532–1537.
 82. Kasorndorkbua C, Thacker BJ, Halbur PG. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res*, 2003, 67: 303–306.
 83. Li TC, Wakita T. Small animal models of Hepatitis E Virus infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 7.
 84. Purcell RH, Engle RE, Govindarajan S, Herbert R, St Claire M, Elkins WR, Cook A, Shaver C, Beauregard M, Swerczek J, Emerson SU. Pathobiology of hepatitis E: lessons learned from primate models. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 9: 1-6.
 85. Lanford RE, Walker CM, Lemon SM. Nonhuman Primate Models of Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 23.
 86. Melegari I, Di Profio F, Marsilio F, Sarchese V, Palombieri A, Friedrich KG, Coccia F, Di Martino B. Serological and molecular investigation for hepatitis E virus (HEV) in captive non-human primates, Italy. *Virus Res*, 2018, 251: 17-21.

87. Aggarwal R, Kamili S, Spelbring J, Krawczynski K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Infect Dis*, 2001 184: 1380–1385.
88. Yamamoto H, Suzuki J, Matsuda A, Ishida T, Ami Y, Suzaki Y, Adachi I, Wakita T, Takeda N, Li TC. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18: 2032-2036.
89. Lopez-Lopez P, Rialde MLA, Frias M, García-Bocanegra I, Brieva T, Caballero-Gomez J, Camacho A, Fernández-Molera V, Machuca I, Gomez-Villamandos JC, Rivero A, Rivero-Juarez A. Risk factors associated with hepatitis E virus in pigs from different production systems. *Vet Microbiol*, 2018, 224: 88-92.
90. Lee YH, Ha Y, Ahn KK, Chae C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet. J Lond Engl*, 2009, 179: 417–421.
91. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, Emerson SU, Toth TE, Meng XJ. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 918–923.
92. Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J Med Virol*, 2008, 80: 1379–1386.
93. Cossaboom CM, Córdoba L, Sanford BJ, Piñeyro P, Kenney SP, Dryman BA, Wang Y, Meng XJ. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol*, 2012, 93: 1687–1695

94. Renou C, Cadranel JF, Bourlière M, Halfon P, Ouzan D, Rifflet H. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from a pet pig to its owner. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 1094–1096.
95. de Campos CG, Silveira S, Schenkel DM, Carvalho H, Teixeira EA, de Almeida Souza M, Dutra V, Nakazato L, Canal CW, Pescador CA. Detection of hepatitis E virus genotype 3 in pigs from subsistence farms in the state of Mato Grosso, Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2018, 58: 11-16.
96. Zhang L, Huang S, Li K, Rehman MU, Jiang X, Tong X, Zhang H, Iqbal MK, Mehmood K, Liu S, Shen Y, Li J. Molecular Detection of Indigenous Hepatitis E Virus (HEV) from Tibetan Pigs in Tibet, China. *Food Environ Virol*, 2018, 10: 373-377.
97. Geng Y, Zhao C, Huang W, Wang X, Xu Y, Wu D, Du Y, Liu H, Wang Y. Hepatitis E virus was not detected in feces and milk of cows in Hebei province of China: No evidence for HEV prevalence in cows. *Int J Food Microbiol*, 2018, 291: 5-9.
98. Xia J, Zeng H, Liu L, Zhang Y, Liu P, Geng J, Wang L, Wang L, Zhuang H. Swine and rabbits are the main reservoirs of hepatitis E virus in China: detection of HEV RNA in feces of farmed and wild animals. *Arch Virol*, 2015, 160: 2791-8.
99. Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009, 364: 2697–2707.
100. Sato Y, Sato H, Naka K, 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.
101. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, 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: 902-910.
102. Payne CJ, Ellis TM, Plant SL, Gregory AR, Wilcox GE. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol*, 1999, 68:119-25.
 103. Massi P, Tosi G, Gelmetti D, Lavazza A, Lombardi G, Torcoli G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *J Anim Sci*, 2005, 4: 303–305.
 104. Morrow CJ, Samu G, Matrai E, Klausz A, Wood AM, Richter S, Jaskulska B, Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary. *Avian Pathol*, 2008, 37: 527–535.
 105. Bilic I, Jaskulska B, Basic A, Morrow CJ, Hess M. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *J Gen Virol*, 2009, 90: 863–873.
 106. Kwon HM, Sung HW, Meng XJ. Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. *Virus Gen*, 2012, 45: 237–245.
 107. Hsu IW, Tsai HJ. Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 149–151.
 108. Zhao Q, Liu B, Sun Y, Du T, Chen Y, Wang X, Li H, Nana Y, Zhang G, En-M Zhou. Decreased egg production in laying hens associated with infection with genotype 3 avian hepatitis E virus strain from China. *Vet Microbiol*, 2017, 203: 174–180.
 109. Sun ZF, Larsen CT, Dunlop A, Huang FF, Pierson FW, Toth TE. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and

- characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitissplenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J Gen Virol*, 2004, 85: 693–700.
110. Peralta B, Biarnes M, Ordonez G, Porta R, Martin M, Mateu E. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol*, 2009, 137: 31–36.
111. Haqshenas G, Huang F, Fenaux M, Guenette Dakika, Pierson FW, Larsen CT, Shivaprasad HL, Toth TE, Meng XJ. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2201–2209.
112. Huang FF, Haqshenas G, Shivaprasad HL, Guenette Dakika, Woolcock PR, Larsen CT, Pierson FW, Elvinger F, Toth TE, Meng XJ. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4197–4202.
113. Matczuk AK, Ćwiek K, Wieliczko A. Avian hepatitis E virus is widespread among chickens in Poland and belongs to genotype 2. *Arch Virol*, 2018, 3: 1-5.
114. Liu B, Fan M, Zhang B, Chen Y, Sun Y, Du T, Nan Y, Zhou EM, Zhao Q. Avian hepatitis E virus infection of duck, goose, and rabbit in northwest China. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7: 76.
115. Yan B, Zhang L, Gong L, Lv J, Feng Y, Liu J, Song L, Xu Q, Jiang M, Xu A. Hepatitis E Virus in Yellow Cattle, Shandong, Eastern China. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22: 2211-2212.

116. Ryll R, Eiden M, Heuser E, Weinhardt M, Ziege M, Höper D, Groschup MH, Heckel G, Johne R, Ulrich RG. Hepatitis E virus in feral rabbits along a rural-urban transect in Central Germany. *Infect Genet Evol*, 2018, 61: 155-159.
117. Han SH, Park BJ, Ahn HS, Kim YH, Go HJ, Kim DH, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee SW, Choi IS. Evidence of hepatitis E virus infection in specific pathogen-free rabbits in Korea. *Virus Genes*, 2018, 54: 587-590.
118. Gong W, Liu L, Li M, Wang L, Zhang M, Luo Z, Sridhar S, Woo PCY, Wang L. Evaluation of antiviral efficacy of Chinese traditional medicine Babao Dan in rabbits infected with hepatitis E virus. *J Gen Virol*, 2018, 99: 1036-1043.
119. Sun Y, Lu Q, Liu B, Sheng Y, Du T, Hiscox JA, Zhou EM, Zhao Q. Cross-species infection of mice by rabbit hepatitis E virus. *Vet Microbiol*, 2018, 225: 48-52.
120. Cheng X, Wang S, Dai X, Shi C, Wen Y, Zhu M, Zhan S, Meng J. Rabbit as a novel animal model for hepatitis E virus infection and vaccine evaluation. *PLoS ONE*, 2012, 7: 51616.
121. Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z, Ma JFH, Li M, Song A, Wang Y. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol*, 2009, 81: 1371–1379.
122. Cossaboom CM, Córdoba L, Dryman BA, Meng XJ. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 2047–2049.
123. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeu S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guérin JL. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18: 1274–1281.
124. Wang L, Liu L, Wang L. An overview: Rabbit hepatitis E virus (HEV) and rabbit providing an animal model for HEV study. *Rev Med Virol*, 2018, 28.

125. Ryll R, Bernstein S, Heuser E, Schlegel M, Dremsek P, Zumpe M, Wolf S, Pépin M, Bajomi D, Müller G, Heiberg AC, Spahr C, Lang J. Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*Rattus rattus*) from 11 European countries. *Vet Microbiol*, 2017, 208: 58-68.
126. Debing Y, Mishra N, Verbeken E, Ramaekers K, Dallmeier K, Neyts J. A rat model for hepatitis E virus. *Dis Model Mech*, 2016, 9: 1203-1210.
127. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Johne R, Wakita T. No Evidence of Rat Hepatitis E Virus Excretion in Urine Samples of Rats. *Jpn J Infect Dis*, 2017, 70: 305-307.
128. Hu GD, Ma X. Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region. *Bing Du Xue Bao*, 2010, 26: 27–32.
129. Xu F, Pan Y, Baloch AR, Tian L, Wang M, Na W. Hepatitis E virus genotype 4 in yak, northwestern China. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 2182–2186.
130. Yugo DM, Cossaboom CM, Heffron CL, Huang YW, Kenney SP, Woolums AR, Hurley DJ, Opriessnig T, Li L, Delwart E, Kanevsky I, Meng XJ. Evidence for an unknown agent antigenically related to the hepatitis E virus in dairy cows in the United States. *J Med Virol*, 2018, 14.
131. Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, Huang F. High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol*, 2017, 89: 1981-1987.
132. Wu JY, Kang Q, Bai WS, Bai ZH. Seroepidemiological survey of sheep hepatitis E virus infection in Aksu region of Xinjiang Autonomous. *Bing Du Xue Bao*, 2010, 26: 234-7.
133. Wang Y, Ma X. Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region. *Europe PMC*, 2010, 50: 937-941.

134. El-Tras WF, Tayel AA, El-Kady NN. Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses Public Health*, 2013, 60: 244-251.
135. Sayed IM, Vercooter AS, Abdelwahab SF, Vercauteren K, Meuleman P. Is Hepatitis E Virus An Emerging Problem In Industrialized Countries? *Hepatology*, 2015, 62: 1883–1892.
136. Murali AR, Kotwal V, Chawla S. Chronic Hepatitis E: A Brief Review. *World J Hepatol*, 2015, 7: 2194–2201.
137. Haffar S, Bazerbachi F, Leise MD, Dillon JJ, Albright RC, Murad MH, Kamath PS, Watt KD. Systematic review with meta-analysis: the association between hepatitis E seroprevalence and haemodialysis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46: 790-799.
138. Khounvisith V, Tritz S, Khenkha L, Phoutana V, Keosengthong A, Pommasichan S, Nouanthong P, Hübschen JM, Snoeck CJ, Reinharz D, Muller CP, Black AP, Pauly M. High circulation of Hepatitis E virus in pigs and professionals exposed to pigs in Laos. *Zoonoses Public Health*, 2018, 65: 1020-1026.
139. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Ankara, 2007.
140. Topfedaisi ÖÇ. Temizlik işçilerinde hepatit e seroprevalansı ve risk faktörlerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, 2018.
141. Yamaç N. Van ilinde Hapatit E virüsü seroprevalansı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2011.

142. Şanlı AA. 2014 yılında Hatay bölgesinde kırsal bölgede ve kentsel bölgede Hepatit E seroprevalansının (yeni hastaların sayısı) ortaya konulması ve bulaş açısından risk faktörlerinin belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakterioloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2015.
143. Beskisiz S. Bölgemizde viral hepatitlerde hepatit E virüs enfeksiyonu sıklığı ve risk faktörlerinin belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 2016.
144. Yaşar O. Türkiye'de hepatit E virüsü (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi: Ticari olarak kullanılan iki hev total antikor ELISA kitinin karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Disiplinlerarası Temel Hepatoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2017.
145. Yeşilyurt AÖ. Hepatit E virüsünün kronik hepatit B ve kronik delta hepatitli hastalarda klinik ve laboratuvar parametreleri üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2017.
146. Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015, 90:185–200.
147. Bochud M, Schäfer W, Roth NJ, Ros C. Characterization of a quasi-enveloped, fast replicating hepevirus from fish and its use as hepatitis E virus surrogate. *J Virol Methods*, 2019, 263: 111-119.
148. Imagawa T, Sugiyama R, Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Wakita T, Ishii K. Evaluation of Heating Conditions for Inactivation of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4. *J Food Prot*, 2018, 81: 947-952.

149. Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives. *Biologicals*, 2016, 44: 403-411.
150. Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J. Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 4225-4231.
151. Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol*, 2010, 91:750–758.
152. Sooryanarain H, Meng XJ. Hepatitis E virus: reasons for emergence in humans. *Curr Opin Virol*, 2018, 34: 10-17.
153. Prpić J, Černi S, Škorić D, Keros T, Brnić D, Cvetnić Ž, Jemeršić L. Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol*, 2015, 7: 195-205.
154. Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, Dos Santos DR, Munné MS, Pinto MA. Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A review. *J Med Virol*, 2013, 85: 1037-45.
155. Rivero-Juarez A, Frias M, Lopez-Lopez P, Martinez-Peinado A, Risalde MÁ, Brieva T, Machuca I, Camacho Á, García-Bocanegra I, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Detection of hepatitis E virus RNA in saliva for diagnosis of acute infection. *Zoonoses Public Health*, 2018, 65: 584-588.
156. Antia RE1, Adekola AA1, Jubril AJ1, Ohore OG1, Emikpe BO1. Hepatitis E Virus infection seroprevalence and the associated risk factors in animals raised in Ibadan, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*, 2018, 39: 509-520.

157. Mooij SH, Hogema BM, Tulen AD, van Pelt W, Franz E, Zaaijer HL, Molier M, Hofhuis A. Risk factors for hepatitis E virus seropositivity in Dutch blood donors. *BMC Infect Dis*, 2018, 18: 173.
158. Tritz SE, Khounvisith V, Pommasichan S, Ninnasopha K, Keosengthong A, Phoutana V, Camoin M, Hübschen JM, Black AP, Muller CP, Snoeck CJ, Pauly M. Evidence of increased Hepatitis E virus exposure in Lao villagers with contact to ruminants. *Zoonoses Public Health*, 2018, 65: 690–701.
159. Türkiye İstatistik Kurumu. Hayvancılık İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr>, 22.05.2019.
160. Eker A. Edirne'de erişkinlerde hepatit e virüs infeksiyonu epidemiyolojisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2006.
161. Yugo DM, Cossaboom CM, Heffron CL, Huang YW, Kenney SP, Woolums AR, Hurley DJ, Opriessnig T, Li L, Delwart E, Kanevsky I, Meng XJ. Evidence for an unknown agent antigenically related to the hepatitis E virus in dairy cows in the United States. *J Med Virol*, 2019, 91: 677-686.
162. Kukielka D, Rodriguez-Prieto V, Vicente J, Sánchez-Vizcaíno JM. Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63: 360-8.
163. Sarchese V, Di Profio F, Melegari I, Palombieri A, Sanchez SB, Arbuatti A, Ciuffetelli M, Marsilio F, Martella V, Di Martino B. Hepatitis E virus in sheep in Italy. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 27.
164. Horvatits T, Ozga AK, Westhölter D, Hartl J, Manthey CF, Lütgehetmann M, Rauch G, Kriston L, Lohse AW, Bendall R, Wedemeyer H, Dalton HR, Pischke

- S. Hepatitis E seroprevalence in the Americas: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int*, 2018, 38: 1951-1964.
165. Geng Y, Zhao C, Huang W, Wang X, Xu Y, Wu D, Du Y, Liu H, Wang Y. Hepatitis E virus was not detected in feces and milk of cows in Hebei province of China: No evidence for HEV prevalence in cows. *Int J Food Microbiol*, 2019, 291: 5-9.
166. Tsachev I, Baymakova M, Ciccozzi M, Pepovich R, Kundurzhiev T, Marutsov P, Dimitrov KK, Gospodinova K, Pishmisheva M, Pekova L. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection in Pigs from Southern Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 24: 2430.
167. Vonesch N, Binazzi A, Bonafede M, Melis P, Ruggieri A, Iavicoli S, Tomao P. Emerging zoonotic viral infections of occupational health importance. *Pathog Dis*, 2019, 77.
168. Caballero-Gómez J, Rivero-Juarez A, Cano-Terriza D, Risalde MA, Lopez-Lopez P, Frias M, Jiménez-Ruiz S, Rivero A, García-Bocanegra I. Survey for Hepatitis E virus infection in non-human primates in zoos in Spain. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 13196.
169. Sun XJ, Zhang GM, Zheng H, Miao N, Wang HQ, Yin ZD, Wang FZ. Epidemiological analysis of viral hepatitis E in China, 2004-2017. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 2019, 53: 382-387.
170. Sürer K, Güvenir M, Aykaç A. A Special Risk Group for Hepatitis E Infection: The First Record of North Cyprus. *Pol J Microbiol*, 2018, 67: 525-528.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Fadime TONBAK
Doğum tarihi	: 06.02.1971
Doğum yeri	: Bahçe/Osmaniye
Medeni hali	: Evli, 2 çocuk
Uyruğu	:T.C.
Adres	: Elazığ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü ELAZIĞ
Tel	: 0 424 233 62 51
Faks	: 0 424 237 60 11
E-mail	: ftonbak80@gmail.com
Eğitim	
Lise	: Bahçe Lisesi (1989)
Lisans	: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1989-1994)
Yüksek lisans	: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı (2010-2012)
Doktora	:Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı (2013-2018)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	: Orta derecede (Yök Dil 72,50 Mart 2019)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof Dr Mustafa ATASEVER* danışmanlığında sunulan "Koyun ve Sığırlarda Hepatit E Virüsünün Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi DNA Dizi Analizi" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	3	15
Genel Bilgiler	1	30
Materyal ve Metod	7	35
Bulgular	2	10
Tartışma	1	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 27 /06/ 2019

Öğrenci Adı-Soyadı
İmza
Fadime TONBAK
Dr Fadime TONBAK

Danışman Adı-Soyadı
İmza
Mustafa ATASEVER
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

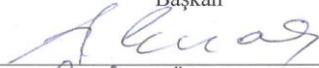
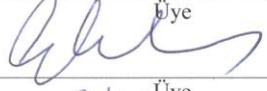
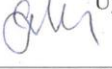

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun /... /... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun /... /... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKLTESİ
ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 1	Karar Tarihi: 20/12/2016
<p>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Mustafa ATASEVER ve Doktora Öğrencisi Fadime TOMBAK tarafından sunulan (Koyun ve sığırlarda Hepatit E virüsünün serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi, DNA dizi analizi) adlı bilimsel teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.</p> <p>Sunulan bilimsel tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkesine uygun olduğuna karar verilmiştir</p>	
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR	Başkan 
Prof. Dr. Ekrem LAÇIN	Üye 
Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL	Üye 
Doç. Dr. Mehmet CENGİZ	Üye 
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Özkan TİMURKAN	Üye 