



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TANK SÜTLERİNDE HEPATİT E VİRUSU'NUN SEROLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Veteriner Hekim Begüm ŞENSÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK

BURDUR-2025

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TANK SÜTLERİNDE HEPATİT E VİRUSU'NUN SEROLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Veteriner Hekim Begüm ŞENSÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 1068-YL-25/2017K-41003 proje numarası ile
desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner Hekim Begüm ŞENSÖZ tarafından *Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK* yönetiminde hazırlanan “*Tank Sütlerinde Hepatit E Virusunu Serolojik Değerlendirilmesi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından *Veterinerlik Viroloji* Anabilim Dalı’nda *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 28/11/2025

Prof. Dr. Mehmet KALE
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Başkan

Doç. Dr. Irmak DİK
Selçuk Üniversitesi
Jüri

Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tez sürecim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK'a, yüksek lisans eğitimim boyunca katkıda bulunan Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Yakup YILDIRIM, Prof. Dr. Mehmet KALE, Dr. Öğr. Üyesi Kamil ATLI ve Dr. Öğr. Üyesi Ali KÜÇÜK'e, bilgilerini ve deneyimlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen doktora öğrencisi Ayşegül USTA'ya, yüksek lisans dönem arkadaşlarım İpek TORPUŞ, Büşra SAĞDAŞ ve Oğuzhan KAPLAN'a, hayatımın her döneminde yanımda olan, beni destekleyen ve bugünlere gelmem için emek sarf eden annem Ayşenur ŞENSÖZ, babam Mustafa Faik ŞENSÖZ ve ablam Betül ŞENSÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

“Tank Sütlerinde Hepatit E Virusunun Serolojik Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Hasbi Sait SALTİK danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Begüm ŞENSÖZ

Tarih: 28.11.2025

İmza:

(Faint watermark text: "YATIRIMCI" repeated diagonally across the page)

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTARCT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Etiyoloji	2
2.2. Epidemiyoloji	7
2.3. Patogenez	10
2.4. Klinik Bulgular	11
2.5. Teşhis	13
2.6. Koruma ve Kontrol	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Çalışma Tasarımı ve Örnek Toplama	18
3.1.2. Olası Risk Faktörlerine Yönelik Veri Toplama	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Süt Numunelerinin Hazırlanması	20
3.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	20
3.2.3. Cut-Off Değerinin Belirlenmesi ve Sonuçların	21
Değerlendirilmesi	
3.2.4. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR	22
4.1 ELISA Bulguları	22
4.2. İstatistik Bulguları	25
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	HEV taksonomisi	2
Şekil 2.2.	HEV genomu	3
Şekil 2.3.	<i>P. balayani</i> genotiplerinin coğrafi dağılımı ve bulaşma yolları	6
Şekil 2.4.	HEV bulaşma yolları	8
Şekil 2.5.	HEV patogenezinin şematik gösterimi	11
Şekil 3.1.	Numune alınan bir sürü (A). Süt tankı (B). Süt tankından numune toplanması (C). Alınan numunenin etiketlenmesi (D).	19
Şekil 3.2.	Santrifüj edilen süt numuneleri (A). Süt serumlarının ayrılması (B). ELISA test kiti (C, D). ELISA pleytine numunelerin aktarılması (E). Test sonuçlarının elde edilmesi (F).	21
Şekil 4.1.	Tank sütlerinden elde edilen Anti-HEV IgG ELISA sonuçları grafiği.	22

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Süt örneği toplanan yerler ve örnek sayıları	18
Tablo 4.1.	Burdur ilinde HEV seropozitiflik dağılımı	23
Tablo 4.2.	Risk kriterleri	23
Tablo 5.1.	İnek sütünde HEV varlığı araştırılan çalışmalar	30



SİMGELER ve KISALTMALAR

aa	aminoasit
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
dPCR	Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
eHEV	yarı zarflı Hepatitis E virusu virionu
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GGT	Gama glutamil transferaz
HAV	Hepatitis A Virusu
HCV	Hepatitis C Virusu
HEV	Hepatitis E Virusu
HVR	Değişken Bölge
IFN	interferon
mAb	monoklonal antikor
neHEV	zarfsız Hepatitis E virusu virionu
ORF	Açık okuma çerçevesi
<i>P. balayani</i>	<i>Paslahepevirus balayani</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPR	Poliprolin Bölgesi
RdRp	RNA Bağımlı RNA Polimeraz
RNA	ribonükleik asit
UTR	çevrilmemiş bölge
VLP	virus benzeri parçacık

ÖZET

Tank Sütlerinde Hepatit E Virus'u'nun Serolojik Değerlendirilmesi

Hepatitis E Virus hem gelişmekte olan hem de sanayileşmiş ülkelerde görülen akut viral hepatit vakalarının başlıca etkenlerinden biridir. Etkenin neden olduğu gıda kaynaklı enfeksiyonlar, küresel ölçekte halk sağlığını tehdit etmekte ve aynı zamanda birçok ülkede ekonomik kalkınmayı da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu tez çalışması Burdur iline bağlı köylerden alınan tank sütü örneklerinde Hepatit E Virus enfeksiyonunun varlığının saptanması ve bu yöredeki olası yaygınlığına dair bilgi elde edilmesi amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada söz konusu yöreden 80 adet tank sütü numunesi usule uygun olarak toplandı. Toplanan numuneler indirekt ELISA yöntemi ile analiz edildi. Toplamda %1,25 (1/80) oranında Anti-HEV IgG pozitifliği belirlendi. Sonuç olarak ülkemizde süt sığırcılığında önemli bir yere sahip olan Burdur ilinde gıda güvenliğinde kritik bir role sahip olan HEV enfeksiyonunun varlığı ELISA yöntemi ile tespit edildi, bu enfeksiyonun kontrolü amacıyla ciddi önlemlerin alınması gerektiği kanaatine varıldı. Bu çalışma Burdur ilinde tank sütlerinde HEV varlığını serolojik olarak ortaya koyan ilk bilimsel rapor olma niteliği taşımaktadır. Gıda güvenliğini sağlamaya yönelik izleme ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi, bölgesel ve ulusal düzeyde HEV'nin yayılımının önlenmesi açısından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Anti-HEV IgG, Seroprevalans, Tank sütü

ABSTARCT

Serological Assessment of the Hepatitis E Virus in Tank Milk

Hepatitis E virus (HEV) is one of the leading causative agents of acute viral hepatitis cases observed in both developing and industrialized countries. Foodborne infections caused by this agent pose a significant global public health concern and may adversely impact economic development in many regions. This thesis study was conducted to determine the presence of HEV infection in tank milk samples collected from villages in the Burdur province of Turkey and to provide insights into its potential prevalence in the region. A total of 80 tank milk samples were collected in accordance with standard procedures from the specified region. The samples were analyzed using an indirect ELISA method to detect Anti-HEV IgG antibodies, and a seropositivity rate of 1.25% (1/80) was determined. As a result, the presence of HEV, which plays a critical role in food safety, was identified by serological methods in Burdur—an area with significant importance in dairy cattle farming in Turkey. This finding highlights the necessity for implementing stringent control measures to manage the risk of HEV infection. This study represents the first scientific report demonstrating the serological presence of HEV in tank milk in the Burdur region. Developing surveillance and control strategies aimed at ensuring food safety is of critical importance in preventing the spread of HEV both regionally and nationally.

Keywords: Anti-HEV IgG, Bulk tank milk, Seroprevalance

1. GİRİŞ

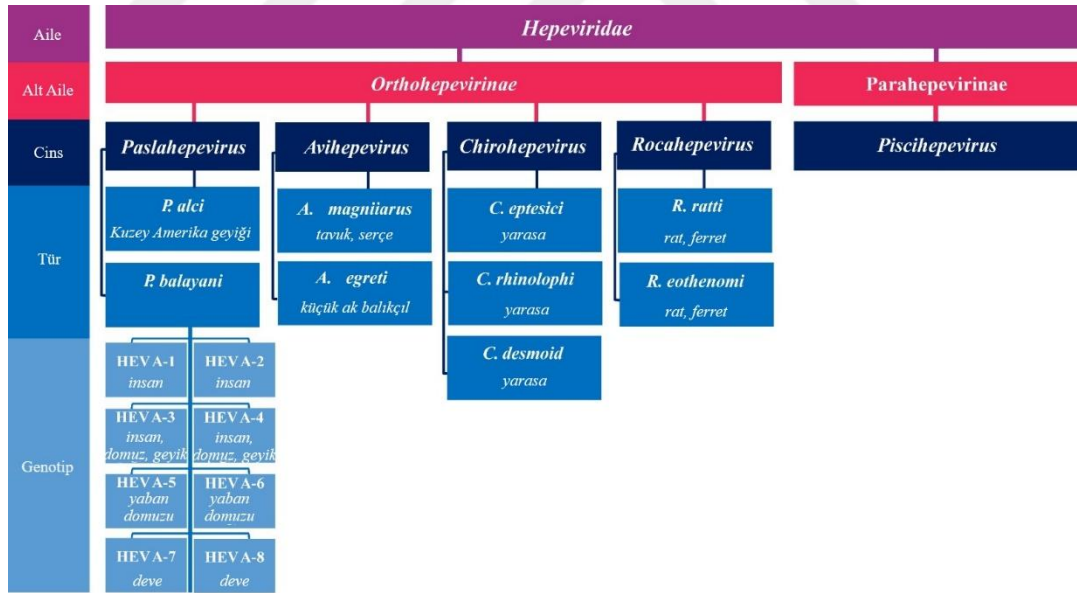
Virusların yol açtığı gıda kaynaklı enfeksiyonlar önemli bir küresel sağlık sorunu olup bu patojenler birçok ülkede ekonomik büyümeyi de olumsuz etkilemektedir (Shirazi ve ark., 2018). Norovirus, Rotavirus, Astrovirus, Hepatit A (HAV) ve Hepatit E (HEV) virusları gıda kaynaklı gastroenteritis ve hepatitis tablosuna yol açan önemli etkenler arasında sayılmaktadır (Appleton, 2000; Erol, 2007). Gıda kaynaklı viral enfeksiyonların başlıca kontaminasyon yolu fekal-oral yol olsa da etken enfekte personelin salgıları ile kontamine olmuş gıdaların ya da enfekte hayvan ürünlerinin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesi neticesinde de yaygın olarak bulaşmaktadır. Ayrıca yeterince ısıtılma işlemi görmüş olsa dahi enfekte personelin salgıları ile sonradan kontamine olan gıdalar da bulaşmada rol oynamaktadır (Erol, 2007). Kontamine gıdanın tüketilmesi sonucunda meydana gelen enfeksiyonların şiddeti vücuda alınan virus miktarı, virusun stabilitesi, gıdanın gördüğü ısıtılma işlemi ve süresinin yeterliliği ile konakçı duyarlılığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Koopmans ve ark., 2002). HEV'in endemik olarak seyrettiği ülkelere seyahat edenlerin de kontaminasyon açısından risk altında olduğu belirtilmektedir (Guerra ve ark., 2017; Jemers'ic' ve ark., 2019).

HEV, dünya çapında hem gelişmekte olan hem de sanayileşmiş ülkelerde meydana gelen akut viral hepatitis enfeksiyonlarının önde gelen nedeni olarak görülmektedir. Etken ilk olarak 1980'lerin başında tanımlandıktan kısa bir süre sonra, gelişmekte olan ülkelere önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiştir (Aggarwal, 2011; Ruggeri ve ark., 2013). Bin dokuz yüz doksanın başından bu yana yapılan çalışmalar, dünya çapında farklı hayvan türlerinde Anti-HEV antikorlarının varlığını da göstererek Hepatit E'nin zoonotik olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Emerson ve Purcell, 2003; Kamar ve ark., 2017). HEV gelişmekte olan ülkelere yaklaşık 20 milyon kişiyi enfekte etmekte ve yılda 3,3 milyon semptomatik vaka ile 44.000 kişinin ölümünden sorumlu tutulmaktadır (WHO, 2021).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

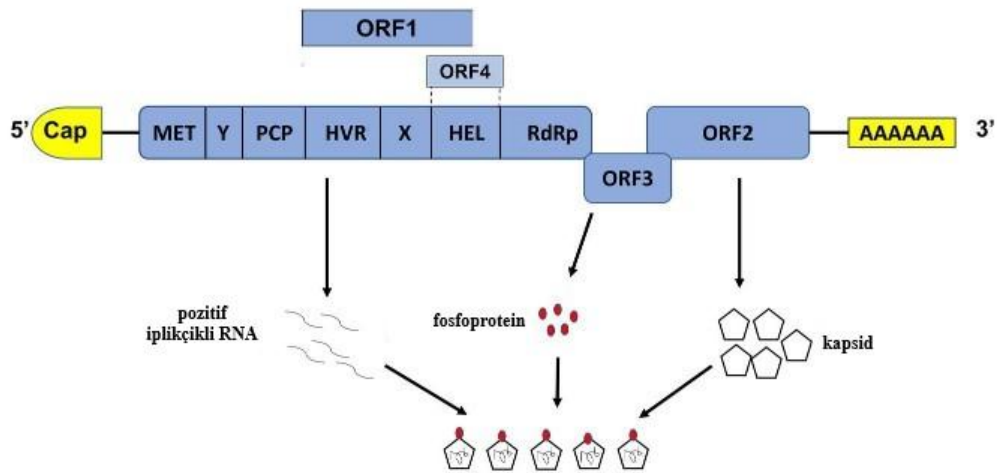
HEV, iki alt familya (*Orthohepevirinae* ve *Parahepevirinae*), beş cins (*Avihepevirus*, *Chirohepevirus*, *Paslahepevirus*, *Rocahepevirus*; *Piscihepevirus*) ve on tür (*A. magniiecur*, *A. egretti*, *C. eptesici*, *C. rhinolophi*, *C. desmoid*, *P. balayani*, *P. alci*, *R. rattii*, *R. Eothenomi* ve *P. heenan*) içeren Hepeviridae familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır (Purdy ve ark., 2022). *Parahepevirinae* alt familyasının üyeleri alabalık ve somon balıklarını enfekte ederken *Paslahepevirus*, *Avihepevirus*, *Rocahepevirus* ve *Chirohepevirus* olmak üzere dört cinse ayrılan *Orthohepevirinae* alt familyasının üyeleri memelileri ve kuşları enfekte etmektedir. *Paslahepevirus* cinsi, insanları ve çeşitli memeli türlerini enfekte edebilen HEV varyantlarını içeren *P. balayani* (önceki tür adı: *Orthohepevirus A*) ve geyikleri enfekte eden *P. alci* olmak üzere iki tür içermektedir (Primadharsini ve ark., 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. HEV taksonomisi (Zahmanova ve ark.'dan (2023) uyarlanmıştır).

P. balayani sınıfında yer alan HEV (Smith ve Simmonds, 2014); 6,4–7,2 kb uzunluğunda, 27–34 nm çapında, zarfsız, pozitif polariteli, ikozahedral simetriye sahip, tek zincirli bir RNA (Ribonükleik asit) virusudur (Purdy ve ark., 2017). HEV, 5' ve 3' uçlarında protein kodlamayan çevrilmemiş bölge (untranslated region-UTR)

taşımaktadır (King ve ark., 2012; Nair ve ark., 2016; Purdy ve ark., 2022; Wang ve Meng, 2021). Üst üste binen üç açık okuma çerçevesi (ORF), viral genomu karakterize etmektedir (Şekil 2.2). ORF1 yapısal olmayan proteinleri, ORF2 kapsid proteinlerini ve ORF3 küçük çok işlevli proteinleri kodlamaktadır (Emerson ve Purcell, 2003). HEV genotip 1, çevirisi viral replikasyonu uyaran ek bir ORF4'e sahiptir, bu proteinin görevi viral polimeraz aktivitesini uyarmaktır (Nair ve ark., 2016). Endoplazmik retikulum üzerindeki baskı, HEV RNA polimerazının düzgün çalışması için gerekli olan ORF4 proteininin sentezini başlatmaktadır (Nair ve ark., 2016). Ayrıca virus, enfekte hücrelerde 2.2 kb'lık subgenomik RNA üretmektedir (Graff ve ark., 2006). Genotip 1, 3 ve 4 HEV'deki alt genomik RNA'nın transkripsiyonu, 5'GC'nin ortak başlangıç dizisiyle başlamaktadır (Ichiyama ve ark., 2009). Hem ORF2 hem de ORF3, alt genomik RNA'dan çevrilmektedir (Graff ve ark., 2006). HEV ile enfekte hücrelerde subgenomik RNA bolluğunun genomik RNA'dan çok daha fazla olması, ORF2 ve ORF3 ürünlerinin ekspresyonunun daha yüksek olması gerektiğini göstermektedir (Yin ve ark., 2017).



Şekil 2.2. HEV genomu (Sayed ve ark.'dan (2023) uyarlanmıştır).

ORF1 poliproteini en az dört işlevsel alana sahip, yaklaşık 1693 amino asit (aa) uzunluğunda yapısal olmayan metiltransferaz, sistein proteaz, helikaz ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) proteinlerini kodlamaktadır. Diğer pozitif zincirli bitki ve hayvan RNA viruslarına benzer Y bölgesi, poliprolin bölgesi (PPR) (hiperdeğişken bölge (HVR)) ve makro bölge (X bölgesi) gibi bölgeler tanımlanmıştır (Kenney ve Meng, 2019). Sekans analizleri, Y bölgesinin metiltransferazın ayrılmaz

bir parçası olduğunu öne sürmektedir (Ahola ve Karlin, 2015). ORF1 poliproteininin ayrı proteinlere işlenip işlenmediği hala belirsizliğini korumaktadır (Kenney ve Meng, 2019). ORF1 ürünlerinin başlıca işlevleri; RNA başlıklandırma (Ahola ve Karlin, 2015; Magden ve ark., 2001), RNA çözülmesi (Karpe ve Lola, 2010), tRNA metabolizması (Parvez, 2015), viral RNA'nın replikasyon aşamalarına yönlendirilmesi, transkripsiyon ve replikasyon dahil olmak üzere viral RNA sentezinin doğrudan kolaylaştırılması olarak sıralanmaktadır (Mahilkar ve ark., 2016).

ORF2 ve ORF3 poliproteinleri örtüşür ayrıca bunların karşılık gelen proteinleri bisistronik ve subgenomik RNA'dan çevrilir. ORF2 poliproteini, S (kabuk), M (orta) ve P (çıkıntılı) olmak üzere üç alana bölünmüş 660 aa kapsid proteinini kodlamaktadır (Şekil 2.2.). Yapısal analizler, HEV-3'e ait kapsid proteininin bir N-terminal bölgesi, virus benzeri parçacık (VLP) ve C-terminal bölgesi içerdiğini göstermektedir (Xing ve ark., 2011). S bölgesi, viral RNA'yı koruyan sıkıca kapalı bir kabuk oluşturan "jöle rulosu (jelly roll)" β -varil kıvrımını (β -barrel fold) sergileyen kapsidin yapı taşı oluşturmaktadır (Coulibaly ve ark., 2005). P bölgesi, virionların duyarlı hücrelere bağlanmasından sorumludur ve virüsü nötralize eden epitoplara içermektedir (Yamashita ve ark., 2009). Kapsid proteinine karşı çeşitli nötralize edici monoklonal antikorların (mAb) epitoplara P bölgesine haritalanmıştır (Chen ve ark., 2018; Schofield ve ark., 2000; Zhao ve ark., 2015). Nötralize edici epitoplara ayrıca M ve C-terminal bölgesinde de bulunmaktadır (Chen ve ark., 2018; Tang ve ark., 2015). P bölgesi aynı zamanda kapsid proteininin homo-oligomerizasyonu için motif içermektedir (Xiaofang ve ark., 2001). VLP'ler, HEV'e özgü immunglobulinlerin tespiti için etkili bir antijen ve T ve B hücre epitoplarının baskın taşıyıcısı oldukları için (Aggarwal ve ark., 2007; Li ve ark., 1997) klinik örneklerin ELISA ile tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2005; Hu ve ark., 2008; Mazalovska ve ark., 2017; Taherkhani ve ark., 2014). Yakın zamanda ORF2'nin ayrıca gerçek kapsid proteini olan ORF2i'den (enfeksiyöz) farklı olan salgılanmış serbest bir kapsid proteini (ORF2s) kodladığı gösterilmiştir. ORF2i çevirisi daha önce tanınmayan bir iç başlangıç kodonunda başlatılmaktadır (Yin ve ark., 2018). ORF2s, hücre dışı boşluğa O, N glikozlanmış ve siyalillenmiş bir dimer olarak salgılanmaktadır.

ORF3 ise genotipe bağılı olarak 113 veya 114 aa fosfoprotein kodlamaktadır. Bu proteinin iyon kanalı aktivitesi vardır ve enfekte hücrelerden virus çıkışında rol oynamaktadır (Ding ve ark., 2017). Kanda dolaşan HEV, konak hücre zarlarında gizlendiği için yarı zarflıdır ancak safra tuzlarının etkisiyle lipidler uzaklaştırıldığı için zarfsız virionlar olarak dışkıyla atılmaktadır (Feng ve ark., 2014; Feng ve Lemon, 2014).

Enfekte organizmalar; bir lipid zarfa sarılmış yarı zarflı (eHEV) ve zarfsız (neHEV) olmak üzere iki tip HEV virionu üretmektedir (Nagashima ve ark., 2017). neHEV virionları dışkı ve safrada salgılanırken eHEV ise enfekte hücre kültürü süpernatantları aracılığıyla kanda ve in vitro olarak dolaşmaktadır (Takahashi ve ark., 2008). eHEV, konak içinde hücreden hücreye yayılmadan sorumlu iken (Feng ve Lemon, 2014) neHEV, zarflı virionlara kıyasla yüksek bir başlangıç hücre tutunması (~10 kat daha yüksek) ile karakterizedir. Virusun zarflı formları, konak zarının viral antijenleri tamamen maskeleymesi nedeniyle Anti-HEV antikoruna karşı daha geçirgen olamamaktadır (Yin ve ark., 2016).

İnsanları enfekte edebilen HEV genotipleri *Paslahepevirus balayani* (*P. balayani*) ve *Rocahepevirus ratti* (*R. ratti*) türlerine ait olup; *P. balayani*, HEV-1-HEV-8 arasında sekiz genotip içermektedir. HEV-1 ve HEV-2 yalnızca insanları enfekte etmekte ve sağlık koşullarının zayıf olduğu bölgelerde su kaynaklı enfeksiyonlar şeklinde yayılmaktadır (EFSA BIOHAZ, 2017; Nelson ve ark., 2019). HEV-3 ve HEV-4 ise insanları ve birçok hayvan türünü enfekte eden zoonotik türler olarak tanımlanmaktadır (Huang ve ark., 1995). Ayrıca HEV-3 ve HEV-4'ün ruminantların sütüne geçtiği ve gıda kaynaklı zoonotik enfeksiyonlara yol açtığı da rapor edilmiştir (Demirci ve ark., 2019; El-Mokhtar ve ark., 2020; Forni ve ark., 2018; Huang ve ark., 2016; Izopet ve Kamar, 2008; Sayed ve ark., 2020a; Yugo ve Meng, 2013). HEV-4, HEV-3'ten daha yüksek bir termal stabiliteye sahip ve ruminantlar arasında en yaygın görülen genotip (Imagawa ve ark., 2018) olmakla birlikte zoonotik HEV-4'ün neden olduğu yalnızca birkaç kronik hepatit E vakası rapor edilirken kronik HEV enfeksiyonu vakalarının neredeyse tamamı HEV-3 ile enfekte hastalarda rapor edilmiştir (Kamar ve Pischke, 2019). HEV-3 insanlarda genellikle sporadik vakalara yol açsa da (Kamar ve ark., 2014; Sayed ve ark., 2015) zoonotik bulaşma kabiliyeti ve

2.2.Epidemiyoloji

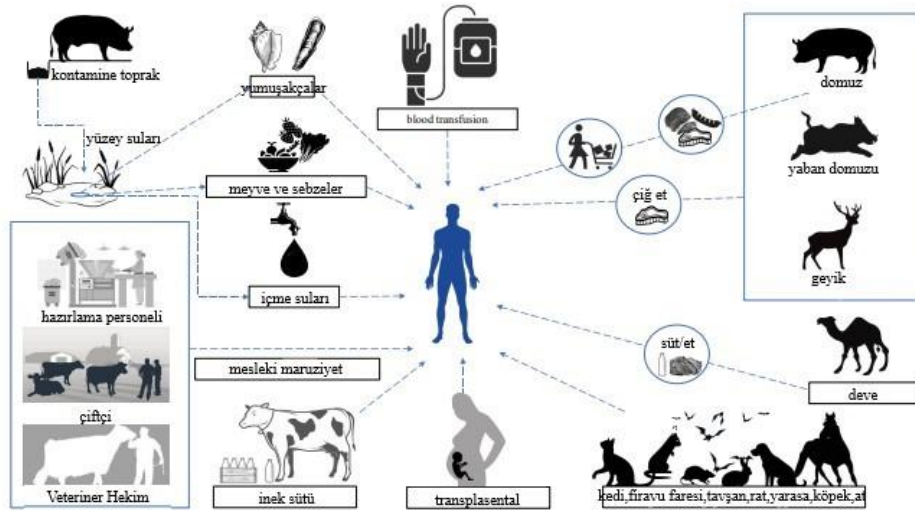
HEV enfeksiyonu zoonotik bir hastalık olarak kabul edilmekte ve domuz (Hsieh ve ark., 1999), deve (Lee ve ark., 2016), keçi (Long ve ark., 2017), tavşan (Cossaboom ve ark., 2011), sığır (Hu ve Ma, 2010), köpek, at (Liang ve ark., 2014), koyun, tavuk, kedi ve geyikler HEV'in doğal rezervuarlarını oluşturmaktadır. Rodentler de Anti-HEV antikorları taşımaları sebebiyle HEV'in potansiyel rezervuarları olarak kabul edilmektedir (Schlosser ve ark., 2019; Yang ve ark., 2015). Ek olarak, birkaç Avrupa ülkesinde geyik türlerinde de HEV enfeksiyonu rapor edilmekle birlikte geyikler yalnızca enfekte yaban domuzları ve onların dışkılarıyla yakın temas yoluyla enfekte olabildiğinden son bulgular geyiklerin gerçek bir viral rezervuar görevi gördüğü fikrini çürütmektedir (Anheyer-Behmenburg ve ark., 2017; Boadella ve ark., 2010; Rutjes ve ark., 2010; Trojnar ve ark., 2020).

Fekal-oral kontaminasyon, özellikle de kontamine su kaynaklı bulaş, HEV enfeksiyonunun önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Khuroo ve ark., 2016). HEV ile enfekte hastaların çoğunluğunun sosyoekonomik düzeyi düşük, yetersiz alt yapıya sahip ülkeler ile gelişmekte olan ülkelerde meydana geldiği (Asya ve Afrika) ve enfeksiyonun esas olarak fekal-oral yolla ve zoonotik olmayan HEV-1 ve HEV-2 nedeniyle meydana geldiği belirtilmektedir (Doceul ve ark., 2016; Khuroo ve ark., 2016; Khuroo, 2023; Meng, 2013). HEV'in çiğ/az pişmiş domuz eti, karaciğer veya süt tüketimi ile deniz ürünlerinden meyve ve sebzeye kadar değişen çeşitli gıda ürünleri aracılığıyla da insan veya primatlara bulaştığı rapor edilmiştir (Doceul ve ark., 2016; Hu ve Ma, 2010; Huang ve ark., 2016; Miyashita ve ark., 2012; Park ve ark., 2016; Pavio ve ark., 2015) (Şekil 2.4). HEV'in ana rezervuarları olduğu düşünülen enfekte domuz ve yaban domuzlarının az pişmiş veya çiğ etlerinin tüketimi yoluyla insanları enfekte etmesi (Meng, 2010; Pavio ve ark., 2017) sanayileşmiş ülkelerde artan vaka sayısının primer nedeni olarak gösterilmektedir (European Food Safety Authority, 2023; Grange ve ark., 2021).

HEV'e maruz kalmanın olası diğer bir yolunu hayvanlarla doğrudan temas oluşturmaktadır (Pavio ve ark., 2015). Enfekte hayvanlarla yakın temasta olan veteriner hekimler, domuz yetiştiricileri ve mezbaha çalışanlarında yüksek Anti-HEV

antikor prevalansı bildirilmiştir (Baymakova ve ark., 2021; Dremsek ve ark., 2012; Meng ve ark., 2002). Diğer bulaşma yolları kadar yaygın olmasa da genotip 1 ve 2 aynı zamanda transplasental olarak ve kan/organ transfüzyonu yoluyla (Şekil 2.4) insandan insana bulaşabilmektedir (Ahmed ve Nashari, 2023; Denner ve ark., 2019).

Farklı hayvan türlerinin bulunduğu, küçük aile çiftliklerde yüksek düzeyde hijyen standartlarına yönelik gereklilikler her zaman gerektiği gibi takip edilemediğinden çiğ sütün biyoaerosollerden ve toprak kaynaklı mikrobiyal organizmalar ile dışkı ve hayvan derisi mikroflorasını içeren tozdan dolayı çevresel HEV kontaminasyonuna yol açabilmektedir (Demirci ve ark., 2019). HEV'in 37°C'de 21, oda sıcaklığında ise 28 güne kadar enfektivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Johne ark., 2016).



Şekil 2.4. HEV bulaşma yolları (Zahmanova ve ark.'dan (2023) uyarlanmıştır).

Yapılan bir çalışma, süt yoluyla HEV enfeksiyonu bulaşma riskleri konusunda birçok endişeyi gündeme getirmiştir. Çalışmada, güneybatı Çin'in Xinjiang eyaletindeki Holstein süt ineklerinden toplanan 140 gaita ve süt örneğinin 52'sinde (%37) aktif HEV enfeksiyonu varlığı rapor edilmiştir. Bu çalışma inek sütünde HEV-4 varlığına ilişkin ilk kanıtı oluşturmaktadır (Hu ve Ma, 2010; Huang ve ark., 2016). Benzer şekilde, Yan ve ark. Doğu Çin'deki 254 sarı sığırın 120'sinde (%47) HEV spesifik antikorlar ve 8'inde (%3) HEV RNA'sı tespit etmiştir (Yan ve ark., 2016).

Mısır'da yapılan bir çalışmada da inek sütünde HEV RNA'sı saptanmıştır (Sayed ve ark., 2020a). Türkiye'de çiğ sütte HEV prevalansını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada da prevalansın yüksek olduğu bildirilmiştir (Demirci ve ark., 2019). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar inek sütünün insanlara yönelik önemli bir zoonotik risk oluşturabileceğini göstermektedir (Lee ve ark., 2016; Long ve ark., 2017; Rivero-Juarez ve ark., 2016). Çiğ sütün insanlar tarafından yaygın olarak tüketilmesi sebebiyle bu durum halk sağlığı açısından önem arz etmektedir (Santos-Silva ve ark., 2022).

HEV-1 suşları Asya'da ve birçok Sahra Altı Afrika ülkesinde yaygın olarak görülmektedir (Nelson ve ark., 2019). HEV-2, 1986 yılında Meksika'da meydana gelen Hepatit E salgını sırasında tespit edilmiştir; çeşitli çalışmalarda HEV-2'nin Afrika'da da yaygın olduğu bildirilmiştir (Buisson ve ark., 2000; Huang ve ark., 1992; Maila ve ark., 2004; Nicand ve ark., 2005). HEV-3 genotipi küresel olarak bulunurken, HEV-4'e ağırlıklı olarak Asya'da rastlanmaktadır (Bagulo ve ark., 2020; Nemes ve ark., 2023).

Dünya çapında ineklerde HEV seroprevalansı %0 ile %29,35 arasında değişmektedir. Avrupa'da, Anti-HEV antikorları Bulgaristan'da yalnızca bir çalışmada (%7,7) tespit edilmiştir (Tsachev ve ark., 2023). Amerika kıtasında ise veriler büyük farklılıklar göstermektedir; ABD'de %20,4 (Yugo ve ark., 2019) iken Brezilya'da ise %1,42 (Vital ve ark., 2005) olarak rapor edilmiştir. Asya ve Afrika'da Anti-HEV seroprevalansına ilişkin veriler nispeten yüksektir: Hindistan'da %6,9 (Arankalle ve ark., 2001); Çin'de %6,5 (Fu ve ark., 2010), %18,7 (Yu ve ark., 2009), %28,2 (Geng ve ark., 2010), %29,35 (Chang ve ark., 2009); Türkiye'de %16,5 (Tonbak ve Atasever, 2022); Ürdün'de %14,5 (Obaidat ve Roess, 2020); Mısır'da %21,6 (El-Tras ve ark., 2015); Burkina Faso'da %26,4'e kadar (Ouoba ve ark., 2019) olduğu bildirilmiştir. Güney Kore (Song ve ark., 2010) ve Nijerya'da ise seroprevalans %0 olarak tespit edilmiştir (Antia ve ark., 2018; Junaid ve ark., 2014).

Avrupa ve Amerika'daki yerli hepatit E, HEV-3'ten kaynaklanmaktadır (Izopet ve ark., 2019; Pavio ve ark., 2017; Zahmanova ve ark., 2023). HEV-4, Japonya, Çin ve Endonezya dahil olmak üzere Asya genelinde yaygın olarak görülmektedir (Takahashi ve Okamoto, 2014). HEV-3 ve 4'ün birincil hayvan rezervuarlarını evcil

domuzlar ve yaban domuzları oluşturmaktadır ancak geyiklerin de insan bulaşmasında rolü olduğu gösterilmiştir (Tei ve ark., 2003). Son yıllarda, birçok çalışma HEV-3 ve HEV-4'ün evcil ruminantları da enfekte edebileceğini ortaya koymuştur (Huang ve ark., 2016; Wu ve ark., 2015). HEV-3 ve HEV-4 ayrıca atlarda, eşeklerde ve katırlarda da tespit edilmiştir (García-Bocanegra ve ark., 2019; Rui ve ar., 2020).

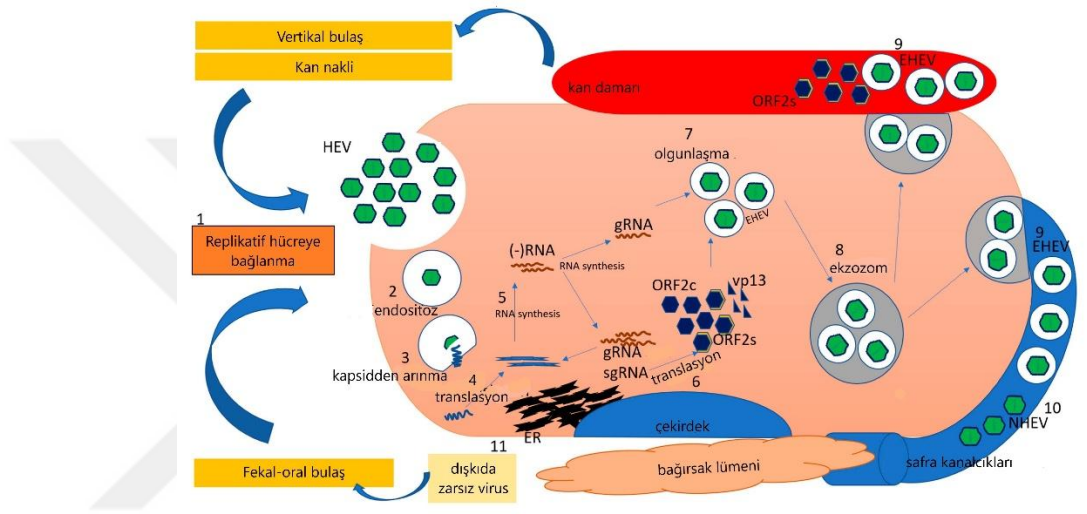
2.3. Patogenez

HEV'in çoğaldığı ana hücre tipini hepatositler oluşturmakla birlikte etken monositler, dalak, lenf düğümleri ve ince bağırsak gibi diğer hücrelerde ve dokularda da replike olabilmektedir (Pavio ve ark., 2010; Sayed ve ark., 2020c). Etken, intravenöz olarak verildiğinde domuz ve tavukların mide, böbrek, tükürük bezleri, bademcikler, akciğerler ve çoklu kas kütlelerinde tespit edilmiştir (Billam ve ark., 2008; Bouwknegt ve ark., 2009; Williams ve ark., 2001). Ayrıca granülositler, trombositler ve eritrosit hücreleri gibi kan bileşenleri, transfüzyonla bulaşan HEV'in ana kaynaklarını oluşturmaktadır (Huzly ve ark., 2014; Sayed ve ark., 2021).

Virus çoğunlukla fekal-oral yolla yayılmakta ve kan dolaşımı ile hepatositlere ulaşmaktadır. Viral adsorbsiyon için hücresel bir reseptör henüz tanımlanmamıştır. neHEV virionlar adsorbsiyon için heparan sülfat proteoglikana ihtiyaç duyarken eHEV virionlar hücre yüzeyine bağımsız olarak bağlanmaktadır (Kalia ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada, virionların konak hücrelere dinamin-2'ye bağlı klatrin aracılı endositoz yoluyla girebileceği öne sürülmüştür (Holla ve ark., 2015). HEV genomunun açığa çıkarılması için düşük bir pH gerekmektedir. Etkenin pozitif iplikçikli RNA genomu daha sonra sitozole salınmakta ve ORF1'in çevirisi için şablon olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.5) (Panda ve ark., 2000).

Transkripsiyon, RdRp'nin negatif polariteli ara RNA'yı üretmek için viral RNA'nın 3' UTR'ye bağlanmasıyla başlamakta ve pozitif polariteli RNA sentezlemek için bir şablon görevi gören ORF2 ve ORF3 proteinlerine çevrilmektedir (Oechslin ve ark., 2022). Yapısal proteinler, iki alt-genomik RNA'dan (3.7 kb ve 2.0 kb) ifade edilebilmektedir. ORF2 poliproteini, genomik pozitif iplikli RNA'yı yeni oluşan virionlarına paketlemekte (Montpellier ve ark., 2018) ve bu şekilde bir araya gelen

HEV virionları, çok veziküllü endosomların lümenine tomurcuklanarak yarı zarflı hale gelmektedir. Bu yüklü endosomlar daha sonra sitoplazmik membrana hareket ederek onunla kaynaşır ve eHEV virionları hücrelerin dışındaki boşluğa bırakır. Safra kanaliküllerinde, bu eHEV virionları zarflarını safraya kaybederek zarfsız partiküllere dönüşmekle birlikte az miktarda eHEV virionu, hepatositlerin bazolateral tarafı aracılığıyla kana salınmaktadır. Lipid tabakasının kaldırılması, eHEV virion partiküllerini daha enfektif hale getirmektedir (Şekil 2.5) (Orosz ve ark., 2024).



Şekil 2.5. HEV patogenezinin şematik gösterimi (Yadav ve Kenney'den (2021) uyarlanmıştır).

Fizyopatolojik açıdan bakıldığında HEV viremi sırasında, hepatositler, meme adenomerleri vb. gibi farklı hedef sitotipler kazanmaktadır. Enfeksiyöz virionun süt matriksi yoluyla atılma potansiyeli hem süt hayvanlarında hem de insanlarda yaygın olarak tespit edilmiş olup laktasyon piki sırasında yüksek HEV titreleri saptanmıştır. Bu gibi durumlarda, yüksek meme kan perfüzyonu ve viremi kombinasyonu, virion difüzyonunu ve atılımını kolaylaştırarak çiğ sütü, farklı alıcı konakçıları enfekte edebilen kontamine bir gıda matriksi haline getirmektedir (Singh ve ark., 2019).

2.4. Klinik Bulgular

HEV'in seyri ve klinik görünümü değişkenlik göstermektedir (Ahmed ve ark., 2015; WHO, 2010. Wedemeyer ve ark., 2013). Hem viral (genotip ve inokulum dozu)

hem de bireye ait (önceki karaciğer hastalığının varlığı, gebelik ve belirgin genetik polimorfizmler) faktörlerin enfeksiyonun seyrini belirlediği bilinmektedir (Wedemeyer ve ark., 2013). HEV sıklıkla birkaç günden haftalara kadar süren (ortalama 4-6 hafta), kendiliğinden iyileşen hastalık tablosuna neden olurken (Ahmed ve ark., 2015); organ transfüzyonu yapılan bireylerde ya da kanser veya AIDS hastalarında hızla siroza ilerleyen kronik hastalığa yol açabilmektedir (Kamar ve ark., 2014). HEV'in dünya çapında akut viral hepatitin en yaygın nedeni olduğu (Kamar ve ark., 2017; Lozano ve ark., 2012; Rein ve ark., 2012); her yıl 3,3 milyon kişide semptom meydana getirdiği ve yaklaşık 44.000 kişinin ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (WHO, 2021).

HEV'in inkübasyon periyodu 2-6 hafta olup inkübasyonu takiben ateş, mide bulantısı, abdominal kramp, kusma, iştahsızlık, halsizlik ve hepatomegali gibi yaygın hepatit semptomları ortaya çıkmaktadır (Ahmed ve ark., 2015; Kamar ve ark., 2014). Buna ilave olarak alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde hafif ya da orta düzeyde artış meydana gelebilmektedir (Rein ve ark., 2012). Bazı akut HEV vakalarında kaşıntı, açık renkli gaita ve koyu renkli idrar gibi tipik klinik semptomlarla birlikte ikterus gelişmektedir. Bu klinik semptomlar genellikle aminotransferaz seviyelerinin ($ALT > AST$) yükselmesinden kısa bir süre sonra başlamaktadır. Yükselen ALT seviyelerine sıklıkla bilirubin, alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) gibi değişen kolestaz parametreleri de eşlik etmektedir (Hoofnagle ve ark., 2012). İkterus, gelişmekte olan ülkelerde semptomatik vakaların yaklaşık %40'ında, gelişmiş ülkelerde ise semptomatik vakaların yaklaşık %75'inde rapor edilmektedir (Kamar ve ark., 2014). Etken hepatit dışında Guillain-Barré sendromu ve nevraljik amiyotrofi, glomerülonefrit ve pankreatit gibi hastalık tablolarına da yol açabilmektedir (Kamar ve ark., 2017). HEV genotip 1 enfeksiyonlarının seyri sırasında sıklıkla pankreatit gözlemlenirken; genotip 3 enfeksiyonlu hastalarda sıklıkla nörolojik, hematolojik, immünolojik ve nefrolojik hastalık tabloları görüldüğü bildirilmektedir (Horvatits ve ark., 2019). Semptomlar ve ikterus döneminin birkaç günden birkaç haftaya kadar sürebileceği ayrıca akut karaciğer yetmezliğine de yol açabileceği bildirilmektedir (Hoofnagle ve ark., 2012). Viremi genellikle erken semptomatik fazda zirveye ulaşmakta ve bundan yaklaşık iki

hafta sonra tespit edilemez hale gelmekte; virusun gaita ile atılımı ise 2-3 hafta daha sürmektedir (Aggarwal, 2000; Kamar ve ark., 2014).

HEV, immunkompetan hastalarda genellikle asemptomatik seyretmekte ya da kendi kendini sınırlamaktadır (self-limited) ve bu durum tanıyı güçleştirmektedir (Kamar ve ark., 2014). Asemptomatik ya da ikterus olmaksızın hafif karaciğer hasarı ile seyreden ve sadece nonspesifik semptomlar gösteren vakalarda (anikterik hepatitis) karaciğer tutulumunun tespitinin laboratuvar analizleri ile mümkün olabileceği belirtilmektedir (Aggarwal, 2011).

İmmunsupresif bireylerde ise hastalık tablosu kronik hepatit ve siroza dönüşebilmekte ve bu durum da karaciğer transplantasyonu gerektirebilmektedir (Damiris ve ark., 2022; Kamar ve ark., 2014; Takakusagi ve ark., 2023). Daha önce kronik karaciğer hastalığı geçirmiş ya da teşhis edilmemiş hastalığı olan bireylerde prognozun kötüye gidebileceği bildirilmektedir (Murali ve ark., 2015; WHO, 2010).

HEV'in mortalite oranı %0,5 ile %4 arasında değişirken gebe kadınlarda bu oran %25'e kadar çıkabilmektedir (Berglöv ve ark., 2019). Hindistan gibi tropikal ülkelerde gebelik sırasında HEV-1 enfeksiyonunun yüksek maternal morbidite ve mortalite (%20'ye kadar) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Navaneethan ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda HEV-4 enfeksiyonunun da erken doğum ve abort ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Gebelerde HEV enfeksiyonları sırasında eklampsi gravidarum, hemorajik komplikasyonlar ve karaciğer yetmezliği görülebilmektedir (Hoofnagle, ve ark., 2012; Jilani ve ark., 2007; Navaneethan ve ark., 2008). Bununla birlikte gebelerde ikterus, hepatik koagülopati ve hepatik ensefalopati ile seyreden akut karaciğer yetmezliği de meydana gelebilmektedir (Rein ve ark., 2012).

2.5. Teşhis

HEV enfeksiyonunun tanısının konulması klinik, epidemiyolojik ve laboratuvar verilerine dayanan karmaşık bir süreçten oluşmaktadır. HEV'in kesin tanısının konulması için serolojik ve nükleik asit amplifikasyon testlerinin

birleştirilmesi önerilmektedir. İmmunkompetan bireylerde, HEV'e özgü antikorların yüksek değerlerde varlığı genellikle tanı koymak için yeterli olmaktadır (Zahmanova ve ark., 2023).

Direkt testler, serum ve gaitada HEV RNA'sının tespitini içermektedir. Bu testler yüksek özgüllüğe sahip olmakla birlikte rutin olarak kullanılmamaktadır. İndirekt testler enfekte bir kişinin serumunda spesifik antikorların (Anti-HEV IgM, Anti-HEV IgG, Anti-HEV IgA) tespitine dayanmaktadır. HEV tanısında Anti-HEV IgM, Anti-HEV IgA ve IgG'yi tespit etmek için sandviç veya indirekt ELISA kullanılmaktadır (Dawson ve ark., 1992; Takahashi ve ark., 2005; Tsarev ve ark., 1993). Anti-HEV'e özgü antikorların tespiti için altın standart bulunmamaktadır (Norder ve ark., 2016).

Enfeksiyon sırasında konulan tanıda HEV RNA ve Anti-HEV IgM tespit edilirken enfeksiyonun ardından Anti-HEV IgG antikorları tespit edilmektedir. Serumda Anti-HEV IgM antikor pozitifliği akut enfeksiyon için önemli bir belirteç olarak düşünülmektedir. Anti-HEV IgM antikorları kısa bir süre (yaklaşık 3-4 ay) pozitiflik göstermekte ancak bazen bir yıl boyunca bu pozitiflik devam etmektedir (Huang ve ark., 2010). Anti-HEV IgG antikoru daha uzun ömürlü olmakla birlikte bu yanıtın kesin süresi belirsizliğini korumaktadır (Kamar ve ark., 2017). Ayrıca Anti-HEV IgG antikorunun aviditesi zamanla artmaktadır. HEV RNA'sı, etkenin alınmasından 3 hafta sonra kanda tespit edilebilmekte virus saçılımı gaitada yaklaşık 4-6 hafta sürebilmektedir (European Association for the Study of the Liver, 2018).

ELISA, HEV enfeksiyonunun tanısında Anti-HEV IgG ve IgM antikorlarının varlığının saptanması için en yaygın kullanılan serolojik yöntemi oluşturmaktadır. Anti-HEV IgM'nin tespiti ve Anti-HEV IgG antikorlarının yükselen titreleri bazı ticari testler bu antikorlar için yeterli özgüllüğe sahip olmadığından tek başına tanı için yeterli olmamaktadır. ELISA yalnızca Anti-HEV antikorlarının tespiti için değil aynı zamanda HEV kapsid antijeninin tespiti için de kullanılmaktadır (Wen ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2015).

HEV enfeksiyonu için bir diğer tanı yöntemini moleküler testler oluşturmaktadır. Kan veya dışkı örneklerinde HEV RNA'sının tespiti için; konvansiyonel reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), gerçek zamanlı RT-PCR (Real time RT-PCR) ve reverz transkriptaz döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) kullanılmaktadır (Aslan ve Balaban, 2020).

Gıda örneklerinde HEV'in tespiti için şu ana kadar standart bir yöntem tanımlanmamıştır ancak yakın zamanda Uluslararası Standardizasyon Örgütü tarafından HEV'in tespiti için standardizasyon süreci başlatılmıştır. Domuz ürünleri için HEV'i tespit etmek amacıyla çeşitli RT-PCR yöntemleri tanımlanmıştır; yakın zamanda yayınlanan bir derlemede bu yöntemler ele alınmış ve sonraki çalışmalarda ve anketlerde başarılı bir şekilde kullanılmasına odaklanılmıştır (Cook ve ark., 2022). Althof ve ark. tarafından et ve et ürünlerinde HEV RNA tespiti için geçerliliği kanıtlanmış bir yöntem tanımlanmıştır. Yöntem, yapay olarak kontamine edilmiş domuz karaciğer sosisi örnekleri kullanılarak dokuz bağımsız laboratuvarında yapılan bir halka denemesinde (ring trial) doğrulanmıştır (Althof ve ark., 2019).

Kontamine süt, HEV enfeksiyonu için potansiyel bir risk kaynağı oluşturmakta ve bu nedenle sütteki HEV varlığının değerlendirilmesi halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Huang ve ark., 2016; Mesquita ve ark., 2020). Süt bazlı gıda ürünlerinde HEV'in tespiti üzerine yakın zamanda yayınlanan bir çalışma, süt matrisine uyan ekstraksiyon prosedürünün seçilmesiyle HEV moleküler testinin iyileştirilebileceğini göstermektedir. Ayrıca süt numunesinden yağ ve kazein gibi inhibitör maddelerin uzaklaştırılması yanlış pozitif absorbansı azaltmakta bu da daha doğru bir cut-off hesaplaması sağlayarak ELISA performansını arttırmaktadır (Sayed ve ark., 2020a; Walsh ve ark., 2013).

2.6. Koruma ve Kontrol

HEV varlığına ilişkin moleküler analiz verileri ve epidemiyolojik veriler, virusun yayılımının izlenmesi ve etkili profilaktik önlemlerin tasarlanması için önem arz etmektedir (Zahmanova ve ark., 2024). HEV enfeksiyonlarını önleme faaliyetleri

coğrafi bölgelere, baskın genotiplere ve bulaşma yollarına göre farklılık göstermektedir. HEV prevalansının düşük olduğu bölgelerde genellikle zoonotik bulaşma baskın olarak görüldüğünden zoonotik riske ve gıda güvenliğine odaklanmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Salgınların daha sık görüldüğü bölgelerde ise enfeksiyon hijyenik olmayan uygulamalar ve yetersiz sanitasyon yoluyla bulaştığı için temiz içme suyu ve insan atıklarının bireysel hijyen ve sanitasyonunun iyileştirilmesi etkili bir önleyici yöntem olabileceği düşünülmektedir (Kamani ve ark., 2021).

Çiğ ve az pişmiş et ürünleri veya çiğ süt tüketimi yoluyla gıda kaynaklı HEV enfeksiyonu riski nedeniyle enfeksiyonu kontrol altına alabilmek için gıda işleme sırasında HEV virionunun termostabilitesinin anlaşılması ve uygun gıda işleme koşullarının uygulanması önem arz etmektedir. Yapılan bir çalışmada, sütün pastörizasyonunun HEV'i inaktive etmediğini ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 2016). Süt ve gıda ürünleri yoluyla HEV bulaşma riskini azaltmaya yönelik güvenlik önlemleri açısından yapılan bir çalışmada yüksek hidrostatik basınç işleminin (600MPa, 5 dk, 20 °C), pastörizasyon prosedüründen (62,5 °C, 20 dk) daha etkili olduğu ancak yine de etkenin tamamen elimine edilemediği, HEV inaktivasyonunda yüksek hidrostatik basınç işleminin etkinliğinin matrikse bağlı olduğu ve HEV enfeksiyonu riskini tamamen azaltmak için yeterli olmayabileceğini rapor edilmiştir (Bouquet ve ark., 2023). Feagins ve ark., 56 °C'de 1 saat inkübe edilen HEV ile kontamine olmuş domuz karaciğerinden elde edilen ekstraktın, domuzlara inokule edildiğinde enfeksiyona neden olabilecek HEV virionlarını hala içerdiğini rapor etmişlerdir (Feagins ve ark., 2008). Çeşitli çalışmalarda da HEV'in 56 °C veya 60 °C kısa süreli ısıtılı işlemler ile etkisiz hale getirilemeyeceği ortaya konulmuştur (Johne ve ark., 2016). Gıda kaynaklı HEV enfeksiyonunu önlemek için uygun gıda işleme koşullarının kullanılması esastır. Diğer bazı çalışmalarda ise kontamine etin 71 °C'de 20 dakika pişirilmesi veya kontamine sütün birkaç dakika (~100 °C) kaynatılması ile HEV'in etkisiz hale getirilebileceği bildirilmektedir (Huang ve ark., 2016; Johne ve ark., 2016). Ayrıca genotipleriyle ilgili yapılan çalışmada, HEV-4'ün, HEV-3'e göre daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğu ve HEV-4'ün ruminantlar arasında görülen en yaygın genotip olduğu belirtilmektedir (Imagawa ve ark., 2018). Kronik hepatit E vakalarının birkaçında zoonotik HEV-4 tespit edildiği bildirilirken vakaların

neredeyse tamamının HEV-3 kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Kamar ve Pischke, 2019).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Tasarımı ve Örnek Toplama

Bu araştırma, Türkiye, Burdur'daki süt sığırcı sürülerinde geçmiş HEV maruziyetinin prevalansını değerlendirmek için kesitsel bir seroepidemiolojik araştırma olarak tasarlanmıştır. Bu çalışmanın materyalini, Burdur ilinde faaliyet gösteren toplam 577 işletmenin bulunduğu bölgeleri temsilen toplamda 80 adet tanktan alınan süt örnekleri oluşturmaktadır. Sürü düzeyinde sürveyans için yaygın bir yaklaşım olan, bireysel sürüleri temsil etmek üzere toplam 80 tank sütü örneği toplanmıştır. Tüm örnekler, örnek bütünlüğünü ve temsil ediciliğini sağlamak için süt endüstrisi için standart işletme prosedürlerine uygun olarak toplanmıştır. Örneklemeye yapılan yerler ve numune sayıları Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Tank sütlerinden örneklemeye yapılan yerler ve numune sayıları

Örneklemeye Yapılan Yerler	Numune Sayısı
Altınyayla	1
Bucak	16
Çavdır	3
Çeltikçi	4
Tefenni	6
Göhlhisar	4
Karamanlı	6
Kemer	4
Merkez	24
Yeşilova	12
Toplam	80

Her bir toplu tanktan temsili bir örnek elde etmek için, süt toplama işleminden önce en az 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bu kritik adım, homojen bir karışım sağlar ve yağ ile diğer süt bileşenlerinin tabakalaşmasını önler. Örnekler, karıştırılmış sütün üstünden temiz, sterilize edilmiş bir kepçe yardımıyla toplanarak tek kullanımlık steril falkon tüplere (10 ml) aktarıldı. Her bir örnek şişesi, dondurma sırasında sütün genişlemesine izin verecek kadar doldurulmuştur. Her bir örnek için kod numarası verilerek tüpler etiketlendi. Aseptik koşullarda alınan örnekler, toplama sonrasında,

aşırı mikrobiyal çoğalmayı önlemek için derhal buz içeren saklama kabına konularak Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi ve daha sonra laboratuvar analizlerinde kullanmak için donduruldu.



Şekil 3.1. Süt toplama tanklarına gönderilen sütlerin elde edildiği bir sürü (A). Toplanan sütün hijyenik bir şekilde saklanması için kullanılan süt soğutma tankı (B). Süt tankından numune toplanması (C). Alınan numunenin etiketlenmesi (D).

3.1.2. Olası Risk Faktörlerine Yönelik Veri Toplama

Biyolojik örneklemeye ek olarak, potansiyel risk faktörlerine ilişkin veriler gözlem ve/veya yapılandırılmış formlar aracılığıyla toplanmıştır; dezenfektan kullanımı (evet/hayır, türü, sıklığı), temizlik sıklığı (günlük, haftalık vb.), diğer yabancı türlerin varlığı, su kaynağı ve sanitasyon uygulamaları, hayvan yoğunluğu ve barınma koşulları. Bu değişkenler, HEV IgG seropozitifliği ile olası ilişkilerin değerlendirilmesi amacıyla kaydedilmiştir.

3.2. Yöntem

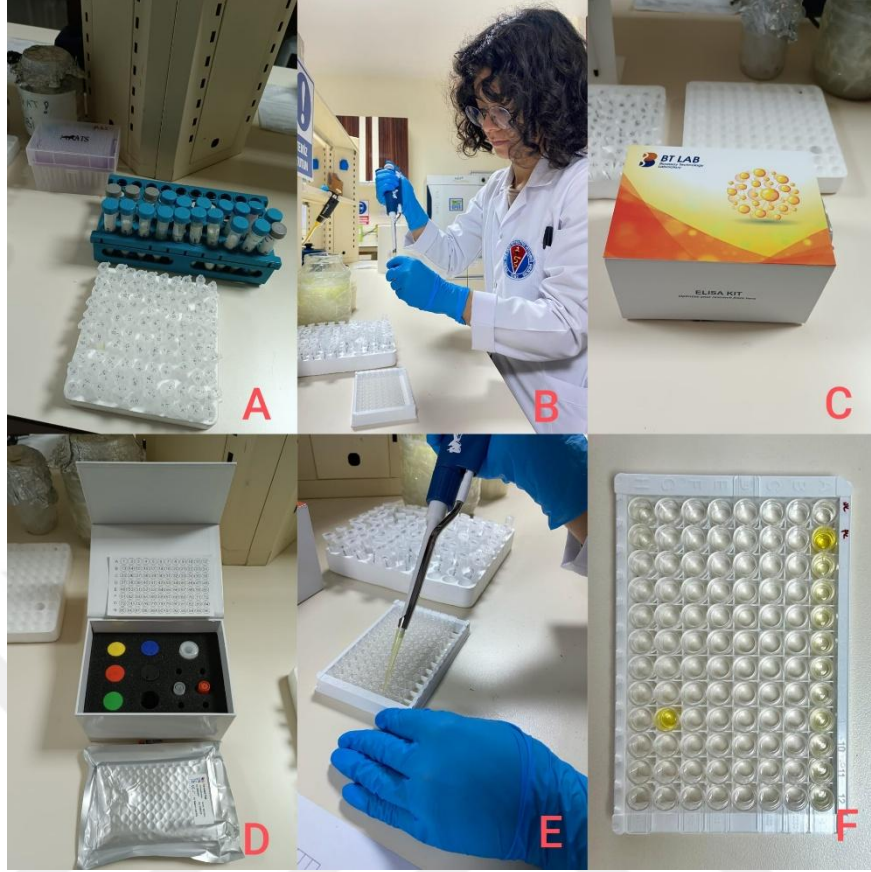
3.2.1. Süt Numunelerinin Hazırlanması

Steril koşullarda alınan ve soğuk zincirde laboratuvara getirilip dondurulan çiğ süt numuneleri kademeli olarak çözündürülüp Wisd VM-10 vortex cihazı kullanılarak homojen hale getirildikten sonra üzerine 0.2 ml renin enzimi ilave edildi. Enzim ilavesinden sonra 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakılan süt örnekleri bu sürenin sonunda Nüve NF800R santrifüj cihazı kullanılarak 4°C'de 30 dakika boyunca 4000×g'de santrifüj edilerek tüpün üst yüzeyine çıkan krema tabakası bir spatül yardımıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra süt serumları 2 ml'lik steril mikrotüplere porsiyonlanarak ELISA testi gerçekleştirilinceye kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tanklardan alınan süt numunelerinden elde edilen serumlarda indirekt ELISA kullanılarak HEV'e spesifik olan antikorların varlığı araştırıldı. Çiğ süt örneklerinde HEV varlığının tespiti ELISA testi ile gerçekleştirildi; bu amaçla BT Lab Human Hepatitis E Virus IgG ELISA test kiti (BT Lab, Zhejiang, Çin) kullanıldı. İzlenen tüm aşamalar için, üretici ticari firma tarafından bildirilen test prosedürü esas alındı. ELISA testinde kullanılacak yıkama solüsyonu distile su ile 1:25 oranında dilue edildi.

Özetle; 50'şer µl çiğ süt numuneleri ile birlikte aynı hacimlerde negatif ve pozitif kontroller ayrı ayrı kuyucuklara ilave edildi. Yavaşça karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 50'şer µl enzim konjugat ilave edildikten sonra aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Takiben yıkama işlemi yapıldı ve her bir kuyucuğa 50'şer µl substrat ilave edilip 10 dk inkubasyona bırakıldı. Son olarak stop solüsyonu ilave edildi ve ELISA pleyt okuyucuda (BioTek 800TS) 450 nm dalga boyunda okutuldu.



Şekil 3.2. Santrifüj edilen süt numuneleri (A). Süt serumlarının ayrılması (B). ELISA test kiti (C, D). ELISA pleytine numunelerin aktarılması (E). Test sonuçlarının elde edilmesi (F).

3.2.3. Cut-Off Değerinin Belirlenmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Her bir örnek için A1 kuyucuğunda bulunan negatif kontrolün Optimal Dansite (OD) değerine 0,15 ekleyerek cut-off değeri belirlendi.

Örneklerin 450 nm'deki absorbands değeri Cut-off değerinin altında ise negatif, eşit veya yüksek ise pozitif olarak değerlendirildi.

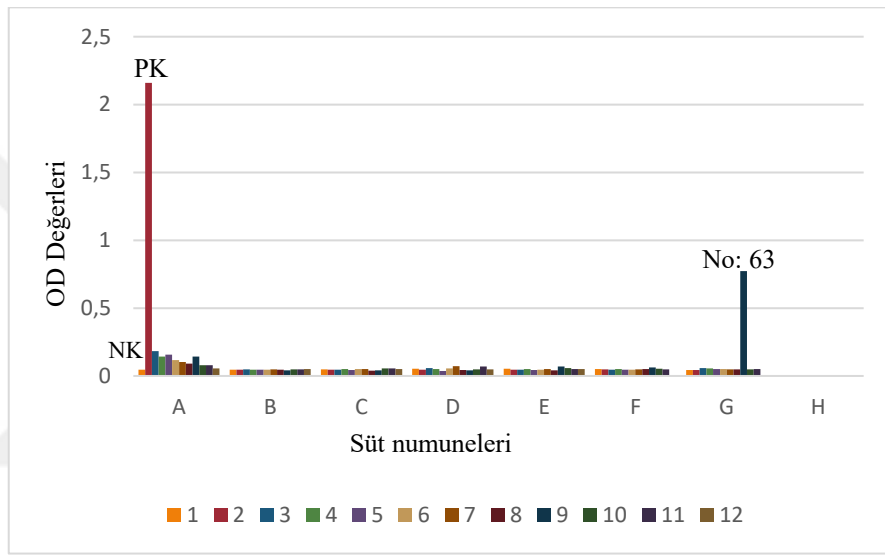
3.2.4. İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için IBM SPSS (v23) programıyla Pearson Ki-Kare (Chi-square - χ^2) testi kullanılması planlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 ELISA Bulguları

Bu tez çalışması kapsamında, süt tankı bulunan işletmelerden temin edilen toplam 80 süt numunesi, ELISA yöntemi kullanılarak HEV IgG varlığı açısından test edildi. Test sonuçlarına göre, değerlendirilen 80 numuneden 1'inde (%1,25) HEV IgG pozitifliği saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tank sütlerinden elde edilen Anti-HEV IgG ELISA sonuçları grafiği. A1: Negatif Kontrol (NK) A2: Pozitif Kontrol (PK) G9.

Toplam süt numuneleri içerisinde, Bucak ilçesinden alınan 16 örneğin 1'inde (%1,66) HEV IgG pozitifliği saptanırken Altınyayla, Çavdır, Çeltikçi, Gölhisar, Karamanlı, Kemer, Merkez, Tefenni ve Yeşilova ilçelerinden alınan toplam 64 numunede HEV IgG yönünden herhangi bir pozitif bulguya rastlanmamıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Burdur ilinde HEV seropozitiflik dağılımı

Örneklemeye Yapılan Yerler	Numune Sayısı (n)	HEV Ab		HEV Ab n (-)
		n (+)	%	
Altınyayla	1	0	0	1
Bucak	16	1	1,66	15
Çavdır	3	0	0	3
Çeltikçi	4	0	0	4
Göhlhisar	4	0	0	4
Karamanlı	6	0	0	6
Kemer	4	0	0	4
Merkez	24	0	0	24
Tefenni	6	0	0	6
Yeşilova	12	0	0	12
Toplam	80	1	1,25	79

HEV enfeksiyonlarına yol açan risk kriterleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Risk kriterleri

Köy	Su kaynağı	Tank yıkama sıklığı	Etraftaki hayvan varlığı
Çörten	S	her gün (ss+dzdn)	kedi, kuş
Alkaya	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, tavuk, kuş
Anbahan	S/Ş	her gün (ss+dtr+dzdn)	kedi, köpek, tavuk, kuş
Avdancık	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, kuş
Gündoğdu	S	her gün ss, ayda 1-2 dzdn	kedi, kuş
İncirdere	S	her gün (ss+dtr)	kedi, tavuk, kuş, keçi
Karapınar	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, kuş
Keçili	S	her gün (ss+dtr)	kedi, tavuk
Kestel	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, tavuk, kuş
Kızılcaoba	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, köpek, kuş
Seydiköy	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, kuş
Susuz	S	her gün ss, arada dtr	kedi, kuş, keçi
Uğurlu	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, tavuk, kuş
Ürkütlü	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, kuş
Üzümlübel	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, kuş
Yuva	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, tavuk, kuş
Yüreğil	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, tavuk, kuş
Büyükalan	Ş	her gün ss, haftada 2 dzdn	kedi, tavuk, kuş, koyun
İshakköy	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi, köpek, tavuk, horoz
Kayacık	Ş	gün aşırı (ss+dtr)	kedi
Bağsaray	Ş	her gün (ss+dzdn)	kedi
Cami mh.	Ş	her gün ss	kedi
Çebiş	Ş	her gün ss, ara ara dzdn	kedi
Konak mh.	Ş	her gün (ss+dtr)	yok

Tablo 4.2. Risk kriterleri (devam)

Köy	Su kaynağı	Tank yıkama sıklığı	Etraftaki hayvan varlığı
Hisarardı	Ş	her gün (ss+dz)	kedi, köpek
Sorkun	S	her gün ss, haftada 1 dzn	kedi, köpek, koyun, keçi
Yamadı	S	tank boşaldıkça su+dz	yok
Yusufça	S	2-3 günde bir ss+dz	kedi, kuş
Bademli	VY	VY	VY
Kağılcık	S	her gün (ss+dz)	kedi, kuş
Kayalı	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, kuş
Kılavuzlar	Ş	her gün (ss+dz)	kuş
Manca	S	her gün (ss+dz)	kedi, kuş
Mürseller	Ş	her gün (ss+dz)	kedi, köpek, kuş
Akören	S/Ş	her gün (ss+dtr+dz)	kedi, kuş
Belenli	Ş	gün aşırı ss+dz	kedi, tavuk, kuş
Elmacık	Ş	her gün (ss+dtr+dz)	kedi, kuş
Yakalar	Ş	her gün (ss+dz)	kedi, tavuk, kuş
Akyaka	Ş	her gün (ss+dtr)	yok
Askeriye	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi, köpek
Bağlar mh.	Ş	her gün (ss+dz)	kedi, köpek, tavuk, kaz
Bügdüz	Ş	gün aşırı ss+dz	kedi, kuş
Çallıca	S	gün aşırı ss+dtr+dz	kedi, köpek, kuş, kaz, keçi
Çatağıl	Ş	her gün (ss+dz)	yok
Çendik	Ş	her gün (ss+dtr+dz)	tavuk
Çine	Ş	VY	VY
Düğer	Ş	her gün (ss+dtr)	tavuk, koyun
Gökçebağ	S	her gün (ss+dtr+dz)	kedi, köpek, tavuk, kuş
Güneyyayla	Ş	gün aşırı (ss+dz)	yok
Hacılar	Ş	her gün (ss+dtr)	yok
İğdeli	Ş	her gün (ss+dtr+dz)	kedi, köpek, kuş
Karaçal	Ş	her gün (ss+dz)	tavuk
Kayaaltı	Ş	her gün (ss+dtr)	tavuk, kuş
Kışla	Ş	her gün (ss+dz)	kedi, köpek, tavuk
Kozluca	VY	VY	VY
Kuruçay	Ş	her gün (ss+dtr)	kedi
Suludere	KS	her gün (ss+dtr)	yok
Şeker evleri	S	her gün ss, haftada 2 dzn	kedi, tavuk, koyun, keçi
Yakaköy	Ş	her gün su, haftada 2 dzn	tavuk
Yarıköy	Ş	her gün (ss+dz)	yok
Yassıgüme	Ş	her gün (ss+dz)	yok
Yazıköy	S/Ş	her gün (ss+dz)	yok
Bayramlar	Ş	gün aşırı (ss+dz)	kedi, tavuk, kuş
Çaylı	S/Ş	gün aşırı (ss+dz)	kuş

Tablo 4.2. Risk kriterleri (devam)

Köy	Su kaynağı	Tank yıkama sıklığı	Etraftaki hayvan varlığı
Ece	S	her gün (ss+dtr+dzn)	kedi, köpek, kuş
Hasanpaşa	Ş	her gün (ss+dtr+dzn)	kuş
Karamusa	Ş	her gün (ss+dzn)	kedi, kuş
Yuvalak	Ş	her gün ss, haftada 1 dzn	kedi, kuş
Akçaköy	Ş	her gün (ss+dzn)	kedi, köpek
Alanköy	Ş	gün aşırı (ss+dtr)	kedi, köpek, kuş, kaz
Başkuyu	VY	VY	VY
Bedirli	Ş	gün aşırı (ss+dzn)	kedi, köpek, tavuk, kuş
Çaltepe	Ş	gün aşırı (ss+dzn)	kedi, tavuk, kuş
Çelteke	Ş	her gün (ss+dzn)	kuş
Dereköy	Ş	her gün (ss+dtr/dzn)	kedi, köpek, tavuk, kuş
Gençali	VY	VY	VY
Gökçeyaka	S/Ş	her gün (ss+dtr/dzn)	kedi, kuş
Harmanlı	S	gün aşırı (ss+dtr/dzn)	kedi, köpek, kuş, domuz
Kayadibi	Ş	VY	kuş
Yarıslı	S	her gün (ss+dtr)	kedi, köpek, kuş

* dtr: deterjan; dzn: dezenfektan; KS: kaynak suyu; S: sondaj; ss: sıcak su; Ş: sebeke VY: Veri Yok

4.2. İstatistik Bulguları

Araştırmada elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için IBM SPSS (v23) programıyla Pearson Ki-Kare (Chi-square - χ^2) testi kullanılması planlanmıştır. Ancak, elde edilen pozitiflik oldukça düşük olduğu için %95 güven aralığı (CI), nadir sonuçlar ve küçük örneklem boyutları için önerilen Clopper–Pearson exact yöntemi kullanılarak hesaplandı (Reiczigel ve ark., 2010). Bu doğrultuda, gözlemlenen oran ile HEV maruziyeti olmadığı varsayımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için, %0 prevalans hipotezi kullanılarak bir binom testi yapıldı.

Sıfır (Null) hipotezi olarak %0 kullanım yöntemi bölgede sütte HEV varlığının daha önce bildirilmemiş olduğu ilk kez yapılan bir keşif çalışması için istatistiksel ve epidemiyolojik olarak değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu yaklaşım, maruz kalma konusunda herhangi bir kanıt olup olmadığını test eder.

Sıfır hipotezi (H_0): Gerçek prevalans = %0

Alternatif hipotez (H_1): Gerçek prevalans > %0 (yani, sütte HEV mevcuttur)

Çalışmamızın yapıldığı bölgede sütte HEV'in ilk serolojik araştırması olduğundan, daha önce belirlenmiş bir referans değeri olmaması nedeniyle referans değeri (sıfır hipotezi) seçilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Binom testi, gözlemlediğiniz oranı (örneğin, %1,25) varsayılan popülasyon oranıyla (örneğin, %0, %5 vb.) karşılaştırarak gözlemlenen farkın tesadüf eseri olup olmadığını değerlendirir. Tercih edilen bu analizler HEV maruz kalmasının temel kanıtını oluşturmak olan hedefimiz göz önüne alındığında, sonuçlarını istatistiki olarak değerlendirmek açısından en iyi seçim olduğu düşünülmüştür.

Hepatit E virusuna karşı antikorların görünür seroprevalansı, %95 CI %0,03 ile %6,77 güven aralığında %1,25 (1/80) olarak hesaplandı. Sonuçta elde edilen bulgulara göre nokta tahminin düşük olmasına rağmen daha büyük örneklem düzeyinde prevalansın %6,77'ye kadar çıkabileceğini göstermektedir. Bu durum HEV'nin süt sığırlarında düşük seviyelerde de olsa dolaşımda olabileceğine işaret etmektedir. Kalan 79 numune negatifti, bu da çalışmaya dahil edilen süt tanklarında yapılan örneklemelerde HEV'ye maruz kalmanın sınırlı veya sporadik olduğunu göstermektedir. Pozitif örnek sayısının çok düşük olması nedeniyle, HEV maruziyeti ile çevresel veya yönetimsel risk faktörleri (dezenfektan kullanımı, temizlik uygulamaları, yabani hayvan varlığı vb.) arasındaki ilişkileri değerlendirecek istatistiksel bir analiz yapılmadığından bulgular kısmında buna ilişkin bilgilere yer verilmemiştir.

Yalnızca 1 adet HEV IgG pozitif örnek (%1,25) tespit edilmesi nedeniyle, seropozitiflik ile potansiyel risk faktörleri arasındaki ilişkilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi mümkün olmamıştır. Ki-kare testi veya lojistik regresyon gibi çıkarımsal istatistiksel yöntemler, karşılaştırma gruplarında yeterli sayıda vaka bulunmasını gerektirir. Sadece bir pozitif vaka ile yapılacak herhangi bir ilişki analizi, istatistiksel güçten yoksun olacak ve yanıltıcı sonuçlar doğurabilecektir. Bu nedenle, risk faktörlerine yönelik ek analiz yapılmamış, değerlendirme yalnızca seroprevalansın tanımlanması ile sınırlı kalmıştır.

5. TARTIŞMA

Son dönemde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde HEV seroprevalansının küresel ölçekte artış göstermesi, bu enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı sorunu hâline getirmiştir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, insan ve hayvan popülasyonlarında HEV epidemiyolojisine ilişkin bilimsel literatürün sınırlı olması ve subklinik vakaların yaygınlığıyla birlikte değerlendirildiğinde HEV enfeksiyonu, dikkate değer bir “gizli epidemi” (silent epidemic) niteliği taşımaktadır. Literatürde yer alan çeşitli çalışmalar hem evcil hem de yabani hayvan türlerinde (domuz, yaban domuzu, geyik, dağ gelinciği ve fırvun faresi gibi) HEV varlığının serolojik ve moleküler yöntemlerle tespit edildiğini bildirmektedir. Fekal-oral bulaş yolunun yanı sıra HEV'in hayvanlarla direkt ya da indirekt temas ve kontamine hayvansal ürünlerin tüketimi aracılığıyla zoonotik olarak bulaşabildiği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ayrıca farklı hayvan türleri arasında ve hayvandan insana HEV'in deneysel ve doğal yollarla bulaşabileceğini destekleyen bilimsel kanıtlar da bulunmaktadır (Antia ve ark., 2018).

HEV-3 ve HEV-4'ün ana rezervuarı olan evcil domuzlar, insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonların başlıca kaynağını oluşturmakta buna kıyasla evcil ruminantların zoonotik yayılımındaki rolü çok daha sınırlı görünmektedir. Ancak evcil ruminantlar, et ve süt üretimi yoluyla küresel gıda zincirinde temel rol oynadığından bu hayvanlarda HEV epidemiyolojisinin ve ekolojisinin daha ayrıntılı biçimde anlaşılması gerekmektedir. Bu kapsamda, HEV'in bu türlerdeki yayılımını etkileyen risk faktörlerinin tanımlanması, özellikle farklı çiftlik tiplerinde (karma, yarı endüstriyel, endüstriyel) virus dolaşımının izlenmesi ve viral yükün farklı gıda matrislerinde, özellikle sütte nicel olarak belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Zahmanova ve ark., 2024).

Spesifik antikor üretimi viral enfeksiyonlara karşı gelişen immün yanıtın önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Enfeksiyonun erken fazında ilk olarak IgM antikorları üretilmektedir. IgM antikorları, enfeksiyonun klinik belirtilerinin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra veya etkene maruziyetten dört hafta sonra saptanabilmekte ve bu nedenle akut enfeksiyonların tanısında değerli bir biyolojik

belirteç olarak rol oynamaktadır. Enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde IgG antikorları devreye girmekte ve varlığını yıllarca sürdürebilmektedir. IgG varlığı, geçirilmiş enfeksiyonların veya aşılama ya bağlı bağışıklığın göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Zhao ve ark., 2015). Çalışmamızda yalnızca Anti-HEV IgG düzeylerinin incelenmiş olmasının akut enfeksiyonların saptanmasını sınırladığı düşünülmektedir. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda Anti-HEV IgM ve HEV RNA analizlerinin de dahil edilmesi, enfeksiyonun dinamiklerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Literatürde HEV tespiti için alınan numune türlerinin duyarlılık ve güvenilirlik açısından farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Virus, özellikle akut faz sırasında serumda yüksek düzeyde tespit edilebilmekte ve bu nedenle serum örnekleri tanısal açıdan en yaygın kullanılan materyaller arasında yer almaktadır (Baechlein ve Becher, 2017; Sayed ve ark., 2020b). Bununla birlikte, enfeksiyonun viremi evresi kısa sürdüğü için geç dönemde alınan serum örneklerinde HEV RNA saptanamayabilir. Dışkı örnekleri, HEV'in gastrointestinal sistem yoluyla uzun süre atılabilmesi nedeniyle çevresel yayılımı değerlendirme açısından önemli bir örnek türünü oluşturmakta dışkıdaki HEV RNA varlığı, vireminin sona ermesinden sonra dahi birkaç hafta boyunca saptanabilir düzeyde seyretmektedir. Ancak dışkı örneklerinde PCR inhibitörlerinin (safra asitleri, kompleks lipitler gibi) bulunmasının analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebileceği bilinmektedir (Kamar ve ark., 2019). Karaciğer, HEV'in yoğun replikasyon gösterdiği hedef organlardan biri olduğundan nekropsi sonrası yapılan çalışmalar için yüksek duyarlılık sunmakta ancak canlı hayvanlardan alınamaması bu örnek türünün epidemiyolojik veya rutin taramalarda kullanılmasını kısıtlamaktadır (Huang ve ark., 2016). Süt ise özellikle zoonotik bulaş açısından kritik bir örnek materyali olarak öne çıkmaktadır. Ancak süt bileşenlerinde bulunan yağ, kazein ve kalsiyum gibi maddeler, nükleik asit izolasyonunu zorlaştırarak moleküler analizlerde inhibitör etki oluşturabilmektedir (Geng ve ark., 2019). Bu örneklerle kıyasladığımızda çalışmamızda kullandığımız tank sütü numunelerine rennin ilavesi ve santrifüjasyon işlemleriyle süttten serum fazı elde edilmiş olmasına rağmen süt matrisine özgü inhibitörlerin varlığının test duyarlılığını düşürmüş olabileceği düşünülmektedir.

HEV enfeksiyonlarının tanısında hem moleküler hem de serolojik yöntemler yaygın olarak kullanılmakta olup bu yöntemlerin her biri enfeksiyonun farklı evrelerine yönelik bilgi sunmaktadır. Moleküler yöntemler, özellikle viremi döneminde HEV RNA'nın doğrudan tespiti yoluyla tanıda yüksek duyarlılık sağlamaktadır. Son yıllarda, dijital PCR (dPCR)'ın, gıda örneklerindeki virusların tespiti ve miktarının belirlenmesinde qPCR'a faydalı bir alternatif olduğu düşünülmektedir. qPCR'a benzer şekilde dPCR da farklı hedeflerin eş zamanlı olarak kantifikasyonuna olanak tanımaktadır. RT-dPCR, RT-qPCR'a kıyasla daha pahalı ve zaman alıcı olmakla birlikte kantifikasyon için harici kalibrasyon eğrilerine ihtiyaç duyulmamakta, kantifikasyonda daha yüksek hassasiyet sunmakta ve belirli koşullar altında inhibitörlerden ve primer-şablon uyumsuzluklarından daha az etkilenmektedir (Nemes ve ark., 2023). Virus suşlarının tiplendirilmesi, gıda kaynaklı salgınların olası kaynaklarının belirlenmesine olanak tanımakta ayrıca, virusların epidemiyolojisinin ve bulaşma yollarının incelenmesine de yardımcı olmaktadır. Viremi süresinin genellikle kısa olması ve viral yükün düşük düzeylerde seyretmesi, bu testlerin duyarlılığını olumsuz etkileyebilmektedir. Yeni nesil dizileme, patojenlerin moleküler tiplendirilmesinde hassas ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Amplikon bazlı dizilemeye kıyasla, tüm genom dizileme yöntemleri virus suşlarının daha doğru bir şekilde izlenmesini sağlamaktadır. Sanger dizilemesi ve yeni nesil dizileme için HEV'in moleküler tiplemesinde hem ORF 1 hem de ORF2 bölgeleri kullanılmakta ve farklı alt tipler belirlenebilmektedir. Sanger dizilemesi ve yeni nesil dizileme hala viral tespit ve tiplendirme için kullanılan başlıca yöntemler olsa da Oxford Nanopore Dizilemesi gibi üçüncü nesil dizileme yöntemleri, epidemiyolojik çalışmalar için yaygın bir yöntem haline gelmektedir. Serolojik yöntemler, Anti-HEV IgM ve IgG antikorlarının tespiti yoluyla hem akut hem de geçirilmiş enfeksiyonlara ilişkin bilgi sağlamaktadır. Ancak serolojik testlerin duyarlılığı, kullanılan ELISA kitine göre değişiklik gösterebilmekte ve bazı kitlerin özgüllüğü konusunda tartışmalar bulunmaktadır. Ayrıca immunsupresif bireylerde antikor yanıtı sınırlı olabileceğinden serolojik testlerin bu gruplarda tanısız yeterliliğinin düşük olabileceği bilinmektedir (Kamar ve ark., 2014). Dolayısıyla HEV tanısında yalnızca tek bir yöntemle başvurmak yetersiz kalabileceğinden moleküler ve serolojik testlerin birlikte kullanılmasının enfeksiyonun farklı evrelerinin tespiti açısından daha güvenilir sonuçlar verebileceği

düşünülmektedir. HEV'e özgü standartlaştırılmış ve geliştirilmiş tanı yöntemlerine dayanan dünya çapında detaylı ve geniş kapsamlı deneysel çalışmaların, ruminantların HEV epidemiyolojisindeki rolünü ve zoonotik bulaşma riskini daha iyi anlamak için faydalı olacağı düşünülmektedir.

Kontamine sütün, HEV enfeksiyonu için potansiyel bir risk kaynağı olması nedeniyle sütteki HEV varlığının değerlendirilmesi halk sağlığı açısından büyük bir önem arz etmektedir (Huang ve ark., 2016; Mesquita ve ark., 2020). Son yıllarda, insanlar da dahil olmak üzere birçok memeli türünün sütünde HEV varlığının tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışma sayısı giderek artmaktadır (Dziedzinska ve ark., 2020; Rivero-Juarez ve ark., 2016). Elde edilen veriler, süt yoluyla HEV bulaşma potansiyelini ortaya koymakta ve sütün insan tüketimindeki önemi göz önünde bulundurulduğunda konu hakkında daha detaylı çalışmalar yapılmasının gerektiği konusu gündeme gelmektedir (Santos-Silva ve ark., 2022). Bu da yapmış olduğumuz çalışmanın çiğ süt ve süt ürünleri tüketimine bağlı oluşabilecek HEV enfeksiyonlarının önlenmesi açısından ciddi bir öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 5.1. İnek sütünde HEV varlığı araştırılan çalışmalar

Çalışmanın yapıldığı ülke	HEV pozitifliği (%)
Çin (Huang ve ark., 2016)	37,14 (52/140)
Almanya (Baechlein ve Becher, 2017)	0 (0/400)
Belçika (Vercouter ve ark., 2018)	0 (0/504)
Çin (Geng ve ark., 2019)	0 (0/276)
Türkiye (Demirci ve ark., 2019)	29,16 (14/48)
Mısır (Sayed ve ark., 2020b)	0,2 (1/480)
Çin (Hu ve ark., 2025)	0 (0/102)

Huang ve ark. (2016) tarafından yürütülen çalışmada geleneksel karma hayvancılık yapılan çiftliklerden toplanan süt örneklerinin %37,14'ünde (52/140) HEV RNA varlığı tespit edilmiştir. Pozitiflik tespit edilen tüm izolatların genotip 4h olduğu belirlenmiştir. Sütteki viral yük, eşleştirilmiş serum ve dışkı seviyeleriyle karşılaştırıldığında benzer bulunmuştur. İnek sütlerinden elde edilen HEV izolatlarının tüm genom dizi analizi, insan ve domuz izolatlarına yüksek oranda (%99,2-99,4 ve %99,5-99,8) benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulguların insan, domuz ve ineklerdeki HEV izolatlarının kökeninin aynı olduğuna dair güçlü kanıt olduğu

düşünülmektedir. İnek sütünde HEV varlığına dair bir diğer çalışma Mısır'da gerçekleştirilmiş olup marketlerden, süt satışı yapılan dükkanlardan, sokak satıcılarından ve çiftliklerden toplanan toplam 480 örnekte %0,2 (1/480) oranında HEV RNA ve antijen, (8/480) Anti-HEV IgG olduğu saptanmıştır. Pozitif bulunan bu tek örneğin bir çiftlik ineğine ait olduğu, düşük düzeyde viral yük (8×10^2 IU/ml) içerdiği ve aynı zamanda Anti-HEV IgG yönünden de pozitif olduğu bildirilmiştir (Sayed ve ark., 2020b).

Almanya'daki süt çiftliklerinden 2008 yılında toplanan 400 süt örneğinde RT-PCR yöntemiyle HEV RNA'sının varlığı araştırılmış ancak hiçbir örnekte pozitif sonuca ulaşamamıştır (Baechlein ve Becher, 2017). Benzer şekilde Vercouter ve ark. (2018), Belçika'nın Flanders bölgesinde, domuz çiftliklerinde HEV-3 varlığını ortaya koymalarına rağmen aynı bölgedeki karma ve karma olmayan çiftliklerden elde edilen inek gaita ve süt örneklerinde HEV RNA veya Anti-HEV antikor varlığı saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Çin'in Hebei kentinde toplanan 276 süt örneğinden Nested-RT PCR yöntemi kullanılarak yapılan bir başka araştırmada da HEV RNA varlığı saptanamamıştır (Geng ve ark., 2019). Hu ve ark. (2025) tarafından Çin'de yapılan bir diğer çalışmada da toplanan 102 süt örneğinin RT-qPCR sonucunda herhangi bir pozitif sonuca rastlanmamıştır. Süt içerisinde yüksek oranda bulunan mineraller (kalsiyum, potasyum, fosfor, sodyum, magnezyum gibi), özellikle de kalsiyum, ayrıca protein ve yağ varlığı moleküler/serolojik analizlerin özgüllüğünün azalmasına veya hatalı negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Bickley ve ark., 1996; Rossen ve ark., 1992). Bu durumun daha önceki çalışmalarda pozitif sonuç elde edilememesini açıklayabileceği düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgular, literatür verilerinin (Baechlein ve Becher, 2017; Geng ve ark., 2019; Hu ve ark., 2025; Vercouter ve ark., 2018) aksine sütte Anti-HEV IgG varlığı yönünden pozitiflik saptanabileceğini ortaya koymaktadır (Tablo 5.1).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre seropozitifliğin düşük olmasına rağmen, daha büyük örneklem düzeyinde prevalansın %6,77'ye kadar çıkabileceğine işaret etmektedir. Bu durum HEV'nin süt sığırlarında düşük seviyelerde de olsa dolaşımda olabileceği gerçeğini değiştirmeyecektir.

Bu tez çalışmasında, %1,25 oranında Anti-HEV IgG varlığının tespit edilmesi bölgedeki süt sığırlarının daha önce HEV ile enfekte olmuş olabileceğine işaret etmektedir. Anti-HEV IgG'nin varlığı, enfeksiyonun geçirilmiş olduğunu ve hayvanlarda immün yanıtının geliştiğini göstermektedir. Elde edilen bu oran, Almanya (Baechlein ve Becher, 2017), Belçika (Vercouter ve ark., 2018) ve Çin'de (Geng ve ark., 2019; Hu ve ark., 2025) yürütülen çalışmalarda bildirilen %0 pozitiflik oranlarının üzerinde ancak Çin'de bir başka çalışmada bildirilen yüksek pozitiflik oranının (%37,14; Huang ve ark., 2016) oldukça altındadır. Bu durum, HEV yayılımının coğrafi dağılımının heterojen olduğunu ve bölgesel farklılıklar gösterebildiğini düşündürmektedir. Öte yandan Mısır'da Sayed ve ark. (2020b) tarafından yapılan çalışmada %0,2 oranında bildirilen pozitiflik bizim bulgularımızdan daha düşüktür. Benzer şekilde, Türkiye'de yürütülen sınırlı sayıda çalışmadan alınan süt örneklerinin %29,16'sında HEV RNA varlığı rapor edilmiştir. HEV RNA pozitif çiğ süt örneklerinin ORF2 bölgesinde yapılan DNA dizi analizi sonucunda HEV genotip 1 olduğu tespit edilmiştir (Demirci ve ark., 2019). Bu bulgular ülkemizde virus dolaşımının mevcut olabileceğine işaret etmektedir. Bu farklılıkların çalışmalarda alınan örnek sayısı, örnekleme zamanı, coğrafi bölge, hayvan yetiştiriciliği uygulamaları, virus dolaşımı, hijyenik koşullar, kullanılan yöntemlerin duyarlılığı (ELISA, RT-PCR vs.) gibi birçok etkene bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, HEV genotiplerinin coğrafi dağılımı da pozitiflik oranlarını etkileyen önemli bir faktördür.

Çalışmamızda pozitiflik saptanmış olması Anti-HEV IgG'nin sütte düşük oranlarda da olsa bulunabileceğini ve potansiyel bir zoonotik risk taşıdığını ortaya koymaktadır (Huang ve ark., 2016; Sayed ve ark., 2020b). Huang ve ark. (2016), HEV ile enfekte olmadığı bilinen rhesus makaklarına oral gavaj yoluyla HEV ile kontamine çiğ ve pastörize süt örnekleri inoküle ederek meydana getirdikleri deneysel enfeksiyon sonucunda inokülasyondan 4 hafta sonra rhesus makaklarında HEV genomik RNA'sını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Pastörizasyonun HEV enfeksiyonu üzerine etkilerini daha net bir şekilde ortaya koymak amacıyla yaptıkları başka bir deneysel enfeksiyon çalışmasında, çiğ süte uyguladıkları 62°C'de 30 dakika, 72°C'de 30 saniye pastörizasyon işleminin ardından virusun inaktive olmadığını ancak 100°C'de 3 dakika

kaynatılmasının ardından tam inaktivasyonun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar hem çiğ hem de pastörize inek sütünün potansiyel zoonotik riskine dikkat çekmekte ve potansiyel halk sağlığı etkileri konusunda endişelere yol açmaktadır.

Bu çalışma, Akdeniz Bölgesi'ndeki toplu süt tankı gözetimine dayalı olarak süt sığırlarında HEV maruziyetine ilişkin ilk serolojik kanıtı sunmaktadır. Süt örneklerinin %1,25'inde antikorların saptanması, düşük olmakla birlikte, diğer Avrupa ve Asya çalışmalarında bildirilen sporadik bulgularla uyumludur. Bu çalışmalarda, bölge, sürü büyüklüğü ve test duyarlılığına bağlı olarak sütteki sürü düzeyinde seroprevalans oranları %0 ile %37,14 arasında değişmektedir (Baechlein ve Becher, 2017; Demirci ve ark., 2019; Geng ve ark., 2019; Hu ve ark., 2025; Huang ve ark., 2016; Sayed ve ark., 2020b; Vercouter ve ark., 2018). Yaptığımız çalışmada elde edilen düşük pozitiflik oranının, örneklerin tank sütünden alınmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde negatif veya düşük pozitif sonuçların bildirilmiş olması bu durumun kullanılan numune tipi, numune hazırlama protokolleri ve analiz yöntemleriyle de yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir (Baechlein ve Becher, 2017; Demirci ve ark., 2019; Geng ve ark., 2019; Hu ve ark., 2025; Huang ve ark., 2016; Sayed ve ark., 2020b; Vercouter ve ark., 2018). Bu açıdan değerlendirildiğinde, çalışmamızda elde edilen bulguların literatür bilgileriyle paralellik gösterdiği ve tank sütü numunelerinin HEV varlığının serolojik olarak araştırılmasında dikkat edilmesi gereken önemli metodolojik sınırlılıklar içerdiği sonucuna varılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan son araştırmalarda, inek, koyun, keçi, deve gibi hayvanların sütlerinde HEV tespit edilmesi kontamine çiğ sütün potansiyel bir rezervuar olabileceğini ve ciddi bir kontaminasyon riski taşıdığını düşündürmektedir. Yapılan bazı çalışmalar, kontamine süt ürünlerinin tüketilmesi yoluyla HEV bulaşma riskini doğrudan veya dolaylı olarak destekler nitelik taşımaktadır. Örneğin, düzenli olarak deve eti ve sütü tüketen bir karaciğer nakli hastasında kronik HEV teşhisi konulduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2016). El-Mokhtar ve ark. (2020) tarafından Mısır'da yürütülen bir başka çalışmada ise yakın zamanda seropozitif keçilere sahip olan ve düzenli olarak keçi sütü ürünleri tüketen insanların %80'inde HEV seropozitifliği bulunmuştur. Benzer şekilde,

Mesquita ve ark. (2020) Portekiz'de obanlar ve koyun sütü peynircilerinde çalışan işçiler arasında HEV enfeksiyonu riskinin arttığını bildirmiştir. Bunların yanı sıra süt örneklerinden izole edilen insan ve hayvan HEV suşları arasında yakın bir filogenetik ilişki bulunduğunu ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Demirci ve ark., 2019; Huang ve ark., 2016; Long ve ark., 2017). Tüm bu veriler, kontamine sütün HEV enfeksiyonu için potansiyel bir risk kaynağı olduğunu doğrulamaktadır. Bu nedenle, sütte HEV varlığının araştırılması halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda gelir düzeyi yüksek ülkelerde HEV enfeksiyonlarının artış göstermesi, alternatif hayvan rezervuarlarının varlığına ilişkin soru işaretlerini gündeme getirmiş ve enfeksiyonun diğer potansiyel kaynaklarının daha kapsamlı biçimde araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Dikkat çekici bir şekilde, giderek artan sayıda çalışma, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli memeli türlerinin sütünde HEV varlığına işaret etmektedir. Bu bulgular, sütün olası bir bulaşma yolu olabileceğini düşündürmekte olup sütün insan tüketimindeki önemi göz önünde bulundurulduğunda konunun daha ayrıntılı ve disiplinler arası araştırmalarla ele alınmasını gerekli kılmaktadır.

Evcil ruminantlar et ve süt üretimi yoluyla küresel gıda güvenliğinde kritik bir rol üstlendiklerinden, hayvancılık sektöründe HEV'in epidemiyolojisi ve ekolojisine ilişkin bilgi düzeyimizin artırılması ile potansiyel bulaşma yollarına dair risk faktörlerinin doğru biçimde tanımlanması büyük önem arz etmektedir. Bu durum, evcil ruminantlardaki HEV ile ilgili mevcut tutarsız verilerin, özellikle farklı gıda matrislerinde (özellikle süt) viral yükün nicel olarak belirlenmesi ve virusun sığırlardaki dolaşımının izlenmesi ile karışık hayvan türlerinin bulunduğu geleneksel çiftlikler ile yarı-endüstriyel ve endüstriyel çiftliklerdeki yaygınlığının araştırılmasına odaklanarak kullanılan tespit yöntemleri açısından eleştirel bir değerlendirmesini gerektirmektedir.

Elde edilen veriler ve yapılan değerlendirmeler ışığında sütün gerçek prevalansını belirlemek ve inek sütlerinin HEV bulaşma döngüsünde potansiyel rolünü değerlendirmek amacıyla daha kapsamlı moleküler ve epidemiyolojik çalışmaların yapılması katkı sağlayacaktır. HEV tespiti için standart bir yöntemin geliştirilmesinin ardından HEV ile ilgili daha fazla araştırma ve anket çalışması yapılması gıda ve hayvansal ürünlerin HEV'in insanlara bulaşmasında daha iyi bir risk değerlendirmesi yapılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acosta J, Galimberti A, Marziali F, Costaguta A, Bessone F, Tanno H, Gardiol D, Reggiardo MV, Cavatorta AL (2022).** Zoonotic transmission of hepatitis E virus in a pig farmer from Argentina: a case report. *Zoonoses Public Health*, **69** (3), 235-241.
- Aggarwal R (2011).** Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.*, **161**, 15–22.
- Aggarwal R, Shukla R, Jameel S, Agrawal S, Puri P, Gupta VK, Patil AP, Naik S (2007).** T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *J. Viral. Hepat.*, **14**, 283–292.
- Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S (2015).** Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int. J. Hepatol.*, 872431.
- Ahmed R, Nashari N (2023).** Animal reservoirs for hepatitis E virus within the *Paslahepevirus* genus. *Vet. Microbiol.*, **278**, 109618.
- Ahola T, Karlin DG (2015).** Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biol. Direct.*, **10**, 16.
- Althof N, Trojnar E, Bohm T, Burkhardt S, Carl A, Contzen M, Kilwinski J, Mergemeier S, Moor D, Made D, Johne R (2019).** Interlaboratory Validation of a Method for Hepatitis E Virus RNA Detection in Meat and Meat Products. *Food Environ. Virol.*, **11**, 1–8.
- Anheyer-Behmenburg HE, Szabo K, Schotte U, Binder A, Klein G, Johne R (2017).** Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013–2015. *Emerg. Infect. Dis.*, **23**, 130–133.
- Antia RE, Adekola AA, Jubril AJ, Ohore OG, Emikpe BO (2018).** Hepatitis E Virus Infection Seroprevalence and the Associated Risk Factors in Animals Raised in Ibadan, Nigeria. *J. Immunoass. Immunochem.*, **39**, 509–520.
- Appleton H (2000).** Control of food-borne viruses. *Br. Med. Bull.*, **56**, 172-183.
- Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, Mishra AC, Padbidri VS (2001).** Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus Antibodies in Different Indian Animal Species. *J. Viral. Hepat.*, **8**, 223–227.
- Aslan AT, Balaban HY (2020).** Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J. Gastroenterol.*, **26**(37), 5543–5560.
- Baechlein C, Becher P (2017).** No evidence for zoonotic HEV infection through dairy milk in Germany. *Hepatology*, **65**, 394–395.

Bagulo H, Majekodunmi AO, Welburn SC (2020). Hepatitis E in Sub Saharan Africa – a significant emerging disease. *One Health.*, **11**, 100186.

Baymakova M, Terzieva K, Popov R, Grancharova E, Kundurzhiev T, Pepovich R, Tsachev I (2021). Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection among Blood Donors in Bulgaria. *Viruses*, **13**, 492.

Berglöv A, Hallager S, Weis N (2019). Hepatitis E during Pregnancy: Maternal and Foetal Case-Fatality Rates and Adverse Outcomes— A Systematic Review. *J. Viral. Hepat.*, **26**, 1240–1248.

Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, **22**, 153-158.

Billam P, Pierson FW, Li W, LeRoith T, Duncan RB, Meng XJ (2008). Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of Hepatitis E virus: identification of nonliver replication sites. *J. Clin. Microbiol.*, **46(8)**, 2630–2634.

Boadella M, Casas M, Martín M, Vicente J, Segalés J, de la Fuente J, Gortázar C (2010). Increasing Contact with Hepatitis E Virus in Red Deer, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 1994–1996.

Bouquet P, Alexandre V, De Lamballerie M, Ley D, Lesage J, Goffard A, Cocquerel L (2023). Effect of High Hydrostatic Pressure Processing and Holder Pasteurization of Human Milk on Inactivation of Human Coronavirus 229E and Hepatitis E Virus. *Viruses*, **15**, 1571.

Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CBEM, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong M, de Roda Husman AM, van der Poel WHM (2009). The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.*, **5(1)**, 1–12.

Buisson Y, Grandadam M, Nicand E, Cheval P, van Cuyck-Gandre H, Innis B, Rehel P, Coursaget P, Teyssou R, Tsarev S (2000). Identification of a Novel Hepatitis E Virus in Nigeria. *J. Gen. Virol.*, **81**, 903–9.

Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, Li L, Wang X, Zhuang H (2009). Zoonotic Risk of Hepatitis E Virus (HEV): A Study of HEV Infection in Animals and Humans in Suburbs of Beijing. *Hepatol. Res.*, **39**, 1153–1158.

Chen HY, Lu Y, Howard T, Anderson D, Fong PY, Hu WP, Chia CP, Guan M (2005). Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 593–598.

Chen Y, Liu B, Sun Y, Li H, Du T, Nan Y, Hiscox JA, Zhou EM, Zhao Q (2018). Characterization of Three Novel Linear Neutralizing B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Swine Hepatitis E Virus. *J. Virol.*, **92**.

Cook N, D'Agostino M, Wood A, Scobie L (2022). Real-Time PCR-Based Methods for Detection of Hepatitis E Virus in Pork Products: A Critical Review. *Microorganisms*, **10**, 428.

Cossaboom, CM, Cordoba L, Dryman BA, Meng XJ (2011). Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 2047-2049.

Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, **120**, 761–772.

Damiris K, Meybodi MA, Niazi M, Pyrsopoulos N (2022). Hepatitis E in Immunocompromised Individuals. *World J. Hepatol.*, **14**, 482–494.

Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM, Yarbough PO, Reyes GR, Mushahwar IK (1992). Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Hepatitis E Virus IgG and IgM Antibodies Utilizing Recombinant Antigens and Synthetic Peptides. *J. Virol. Methods*, **38**, 175–186.

Demirci M, Yigin A, Ünlü Ö, Altun SK (2019). Detection of HEV RNA Amounts and Genotypes in Raw Milks Obtained from Different Animals. *Mikrobiyoloji Bul.*, **53**, 43–52.

Denner J, Pischke S, Steinmann E, Blümel J, Glebe D (2019). Why All Blood Donations Should Be Tested for Hepatitis E Virus (HEV). *BMC Infect. Dis.*, **19**, 541.

Ding Q, Heller B, Capuccino JM, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, Contreras JE, Ploss A (2017). Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1147–1152.

Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N (2016). Zoonotic hepatitis E virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses*, **8**, 270.

Dremsek P, Wenzel JJ, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH, Werdermann S, Mohn U, Dorn S, Motz M, Mertens M, Jilg G, Ulrich RG (2012). Seroprevalence Study in Forestry Workers from Eastern Germany Using Novel Genotype 3- and Rat Hepatitis E Virus-Specific Immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol.*, **201**, 189–200.

Dziedzinska R, Krzyzankova M, Bena M, Vasickova P (2020). Evidence of hepatitis E virus in goat and sheep milk. *Viruses*, **12**(12), 18–23.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R (2017). Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a foodborne pathogen. *EFSA J.*, **15**, e04886.

El-Mokhtar MA, Elkhawaga AA, Sayed IM (2020). Assessment of hepatitis E virus (HEV) in the edible goat products pointed out a risk for human infection in Upper Egypt. *Int. J. Food Microbiol.*, **330**, 108784.

El-Tras WF, Tayel AA, El-Kady NN (2013). Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Humans and Geographically Matched Food Animals in Egypt. *Zoonoses Public Health*, **60**, 244–251.

Emerson SU, Purcell RH (2003). Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.*, **13**, 145–154.

European Association for the Study of the Liver (2018). EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.*, **68**, 1256–1271.

European Food Safety Authority (EFSA), Berezowski J, de Balogh K, Dórea FC, Rüegg S, Broglia A, Gervelmeyer A, Kohnle L (2023). Prioritisation of Zoonotic Diseases for Coordinated Surveillance Systems under the One Health Approach for CrossBorder Pathogens That Threaten the Union. *EFSA J.*, **21**, e07853.

Fanelli A, Tizzani P, Buonavoglia D (2022). A Systematic Review and Meta-Analysis of Hepatitis E Virus (HEV) in Wild Boars. *Res. Vet. Sci.*, **142**, 54–69.

Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ (2008). Inactivation of Infectious Hepatitis E Virus Present in Commercial Pig Livers Sold in Local Grocery Stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.*, **123**, 32–37.

Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM (2014). Naked Viruses that aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu. Rev. Virol.*, **1**, 539–560.

Feng Z, Lemon SM (2014). Peek-a-Boo: Membrane Hijacking and the Pathogenesis of Viral Hepatitis. *Trends Microbiol.*, **22**, 59–64.

Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M (2018). Origin and dispersal of hepatitis e virus. *Emerg. Microbes Infect.*, **7**, 11.

Fu H, Li L, Zhu Y, Wang L, Geng J, Chang Y, Xue C, Du G, Li Y, Zhuang H (2010). Hepatitis E Virus Infection among Animals and Humans in Xinjiang, China: Possibility of Swine to Human Transmission of Sporadic Hepatitis E in an Endemic Area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 961–966.

García-Bocanegra I, Rivero A, Caballero-Gómez J, López-López P, Cano-Terriza D, Frías M, Jiménez-Ruiz S, Rialde MA, Gómez-Villamandos JC, Rivero-Juarez A (2019). Hepatitis E Virus Infection in Equines in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.*, **66**, 66–71.

Geng Y, Wang C, Zhao C, Yu X, Harrison TJ, Tian K, Wang Y (2010). Serological Prevalence of Hepatitis E Virus in Domestic Animals and Diversity of Genotype 4 Hepatitis E Virus in China. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **10**, 765–770.

Geng Y, Zhao C, Huang W, Wang X, Xu Y, Wu D, Du Y, Liu H, Wang Y (2019). 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.*, **291**, 5–9.

Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU (2006). A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.*, **80**, 5919–5926.

Grange ZL, Goldstein T, Johnson CK, Anthony S, Gilardi K, Daszak P, Olival KJ, O'Rourke T, Murray S, Olson SH, Togami E, Vidal G, Expert Panel, PREDICT Consortium, Mazet JAK, University of Edinburgh Epigroup members those who wish to remain anonymous (2021). Ranking the Risk of Animal-to-Human Spillover for Newly Discovered Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **118**, e2002324118.

Guerra JAA, Kampa KC, Morsoletto DGB, Junior AP, IvantesCAP (2017). Hepatitis E: A literature review. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **5**, 376–383.

Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S (2015). Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic*, **16**, 398–416.

Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH (2012). Hepatitis E. *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1237–1244.

Horvatits T, zur Wiesch JS, Lütgehetmann M, Lohse AW, Pischke S (2019). The Clinical Perspective on Hepatitis E. *Viruses*, **11**, 617–636.

Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam WA, Lin DY, Liaw YF (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3828–3834.

Hu GD, Ma X (2010). [Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region]. *Chin. J. Virol.*, v.26, p.27–32, 2010.

Hu WP, Lu Y, Precioso NA, Chen HY, Howard T, Anderson D, Guan M (2008). Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vaccine Immunol.*, **15**, 1151–1157.

Hu X, Wang J, Wang Y, Yuan W, Wang J, Xu X (2025). Detection and Characterization of Paslahepevirus balayani (Hepatitis E Virus) in Dairy Products from Hebei Province, China. *Pathogens*, **14**, 564.

Huang C-C, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, Tam AW, Reyes GR (1992). Molecular Cloning and Sequencing of the Mexico Isolate of Hepatitis E Virus (HEV). *Virology*, **191**, 550–558.

Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, He Z, Yang C, Bi Y, Cao W, Liu C, Hua X, Pan Q (2016). Excretion of Infectious Hepatitis E Virus into Milk in Cows Imposes High Risks of Zoonosis. *Hepatology*, **64**, 350.

- Huang R, Nakazono N, Ishii K, Kawamata O, Kawaguchi R, Tsukada Y (1995).** Existing Variations on the Gene Structure of Hepatitis E Virus Strains from Some Regions of China. *J. Med. Virol.*, **47**, 303–308.
- Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JW, Ng MH, Zhu F, Zhang J, Xia N (2010).** Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One*, **5**, e13560.
- Huzly D, Umhau M, Bettinger D, Cathomen T, Emmerich F, Hasselblatt P, Hengel H, Herzog R, Kappert O, Maassen S (2014).** Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Eurosurveillance*, **19**(21), 20812.
- Ichiyama K, Yamada K, Tanaka T, Nagashima S, Jirintai, Takahashi M, Okamoto H (2009).** Determination of the 50'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. *Arch. Virol.*, **154**, 1945–1951.
- Imagawa T, Sugiyama R, Shiota T, Li T-C, Yoshizaki S, Wakita T, Ishii K (2018).** Evaluation of Heating Conditions for Inactivation of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4. *J. Food Prot.*, **81**, 947–952.
- Izopet J, Kamar N (2008).** Hepatitis E: From zoonotic transmission to chronic infection in immunosuppressed patients. *Med. Sci.*, **24**, 1023–1025.
- Izopet J, Tremeaux P, Marion O, Miguères M, Capelli N, Chapuy-Regaud S, Mansuy J-M, Abravanel F, Kamar N, Lhomme S (2019).** Hepatitis E Virus Infections in Europe. *J. Clin. Virol.*, **120**, 20–26.
- Jemersić L, Prpić J, Brnić D, Keros T, Pandak N, Đaković Rodeo (2019).** Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017. *BMC Infect. Dis.*, **19**, 269.
- Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyay D, Gupta RK, Sardana S, Kar P (2007).** Hepatitis e virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22**, 676–682.
- Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J (2016).** Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 4225–4231.
- Junaid SA, Agina SE, Jaiye K (2014).** Seroprevalence of Hepatitis E Virus among Domestic Animals in Plateau State–Nigeria. *Microbiol. Res. J. Int.*, **4**, 924–934.
- Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S (2009).** Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.*, **83**, 12714–12724.
- Kamani L, Padhani ZA, Das JK (2021).** Hepatitis E: Genotypes, strategies to prevent and manage, and the existing knowledge gaps. *JGH Open*, **5**(10), 1127–1134.
- Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J (2014).** Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **27**, 116–138.

Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR (2017). Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **3**, 17086.

Kamar N, Pischke S (2019). Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **9**, a031872.

Karpe YA, Lole KS (2010). NTPase and 50 to 30 RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J. Virol.*, **84**, 3595–3602.

Kenney SP, Meng XJ (2019). Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **9**.

Khuroo MS (2023). Discovery of Hepatitis E and Its Impact on Global Health: A Journey of 44 Years about an Incredible Human-Interest Story. *Viruses*, **15**, 1745.

Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS (2016). Hepatitis E: Discovery, Global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.*, **22**, 7030-7045.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 1023.

King NJ, Hewitt J, Perchec-Merien AM (2018). Hiding in plain sight? It's time to investigate other possible transmission routes for hepatitis E virus (HEV) in developed countries. *Food Environ. Virol.*, **10**(3), 225–252.

Koopmans M, Bonsdorff CH, Vinje J, De Medici D, Monroe S (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 187-205.

Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK, Purdy MA, Teo CG (2016). Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology*, **150**, 355-357.

Li M, Bu Q, Gong W, Li H, Wang L, Li S, Sridhar S, Cy Woo P, Wang L (2019). Hepatitis e virus infection and its associated adverse fetomaternal outcomes among pregnant women in qinhuangdao, china. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, **33**(21), 3647-3651.

Li P, Liu J, Li Y, Su J, Ma Z, Bramer WM, Cao W, de Man RA, Peppelenbosch MP, Pan Q (2020). The global epidemiology of hepatitis E virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Liver Int.*, **40**(7), 1516–1528.

Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T (1997). Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.*, **71**, 7207–7213.

Liang H, Chen J, Xie J, Sun L, Ji F, He S, Zheng Y, Liang C, Zhang G, Su S, Li S (2014). Hepatitis E Virus Serosurvey among Pet Dogs and Cats in Several Developed Cities in China. *PLoS ONE*, **9**, e98068.

Lin S, Zhang YJ (2021). Advances in Hepatitis E Virus Biology and Pathogenesis. *Viruses*, **13**, 267.

Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, Huang F (2017). High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J. Med. Virol.*, **89**, 1981–1987.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, et al. (2012). Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **380**, 2095–2128.

Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L (2001). Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J. Virol.*, **75**, 6249–6255.

Mahilkar S, Paingankar MS, Lole KS (2016). Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase: RNA template specificities, recruitment and synthesis. *J. Gen. Virol.*, **97**, 2231–2242.

Maila HT, Bowyer SM, Swanepoel R (2004). Identification of a New Strain of Hepatitis E Virus from an Outbreak in Namibia in 1995. *J. Gen. Virol.*, **85**, 89–95.

Mazalovska M, Varadinov N, Koynarski T, Minkov I, Teoharov P, Lomonossoff GP, Zahmanova G (2017). Detection of Serum Antibodies to Hepatitis E Virus Based on HEV Genotype 3 ORF2 Capsid Protein Expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Ann. Lab. Med.*, **37**, 313–319.

Meng XJ (2010). Hepatitis E Virus: Animal Reservoirs and Zoonotic Risk. *Vet. Microbiol.*, **140**, 256–265

Meng XJ (2013). Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.*, **33**, 41–49.

Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette Dakika, Toth TE, Engle RE (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin Microbiol.*, **40**, 117–122.

Mesquita JR, Oliveira D, Rivadulla E, Abreu-Silva J, Varela MF, Romalde JL, Nascimento, MS (2016). Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol.*, **58**, 13–15.

Mesquita JR, Santos-Ferreira N, Ferreira AS, Albuquerque C, Nobrega C, Esteves F, Cruz R, Vala H, Nascimento MSJ (2020). Increased risk of hepatitis E virus infection in workers occupationally exposed to sheep. *Transbound. Emerg. Dis.*, online ahead of print.

Miyashita K, Kang JH, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida T (2012). 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.*, **42**, 870–878.

Murali AR, Kotwal V, Chawla S (2015). Chronic hepatitis E: A brief review. *World J. Hepatol.*, **7**, 2194–2201.

Mykytczuk O, Harlow J, Bidawid S, Corneau N, Nasheri N (2017). Prevalence and molecular characterization of the hepatitis E virus in retail pork products marketed in Canada. *Food Environ. Virol.*, **9**, 208–218.

Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Nishizawa T, Nishiyama T, Primadharsini PP, Okamoto H (2017). Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *J. Virol.*, **91**, e00822-17.

Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, Shalimar Nayak B, Ct RK, Surjit M (2016). Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.*, **12**, e1005521.

Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT (2008). Hepatitis e and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver Int.*, **28**, 1190–1199.

Nelson KE, Labrique AB, Kmush BL (2019). Epidemiology of Genotype 1 and 2 Hepatitis E Virus Infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **9**, a031732.

Nemes K, Persson S, Simonsson M (2023). Hepatitis a virus and hepatitis E virus as food- and waterborne pathogens—transmission routes and methods for detection in food. *Viruses.*, **15**(8), 1725.

Nicand E, Armstrong GL, Enouf V, Guthmann JP, Guerin J-P, Caron M, Nizou JY, Andraghetti R (2005). Genetic Heterogeneity of Hepatitis E Virus in Darfur, Sudan, and Neighboring Chad. *J. Med. Virol.*, **77**, 519–521.

Norder H, Karlsson M, Mellgren Å, Konar J, Sandberg E, Lasso A, Castedal M, Magnus L, Lagging M (2016). Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis E Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 549–555.

Obaidat MM, Roess AA (2020). Individual Animal and Herd Level Seroprevalence and Risk Factors of Hepatitis E in Ruminants in Jordan. *Infect. Genet. Evol.*, **81**, 104276.

Oechslein N, Da Silva N, Szkolnicka D, Cantrelle FX, Hanouille X, Moradpour D, Gouttenoire J (2022). Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase is involved in RNA replication and infectious particle production. *Hepatology*, **75**, 170-181.

Orosz L, Sárvári KP, Dernovics A, Rosztóczy A, Megyeri K (2024). Pathogenesis and clinical features of severe hepatitis E virus infection. *World J. Virol.*, **13**(2), 91580.

Ouoba JB, Traore KA, Rouamba H, Setondji KV-M, Minoungou GL, Ouoba BL, Ouedraogo A, Mactar S, M'Bengue AK, Kakou SN, Doumbia M, Traore AS, Roques P, Barro N (2019). Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus Antibodies in Domestic Animal from Three Representative Provinces of Burkina Faso. *Vet. Anim. Sci.*, **7**, 100059.

Panda SK, Ansari IH, Durgapal H, Agrawal S, Jameel S (2000). The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J. Virol.*, **74**, 2430-2437.

Park WJ, Park BJ, Ahn HS, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee SB, Yoo HS, Choi IS (2016). Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *J. Vet. Sci.*, **17**, 1-11.

Parvez MK (2015). The hepatitis E virus ORF1 'X-domain' residues form a putative macrodomain protein/Appr-1"-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication. *Gene*, **566**, 47–53.

Pavio N, Doceul V, Bagdassarian E, Johne R (2017). Recent Knowledge on Hepatitis E Virus in Suidae Reservoirs and Transmission Routes to Human. *Vet. Res.*, **48**, 78.

Pavio N, Meng X-J, Doceul V (2015). Zoonotic Origin of Hepatitis E. *Curr. Opin. Virol.*, **10**, 34–41.

Pavio N, Meng XJ, Renou C (2010). Zoonotic Hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.*, **41**(6), 46.

Purdy MA, Drexler JF, Meng X-J, Norder H, Okamoto H, Van der Poel WHM, Reuter G, de Souza WM, Ulrich RG, Smith DB (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *J. Gen. Virol.*, **103**, 001778.

Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Vander Poel W, Smith DB (2017). ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J. Gen. Virol.*, **98**, 2645–2646.

Raji YE, Toung OP, Mohd Taib N, Sekawi ZB (2021). A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus infection in south – eastern asia. *Virulence*, **12**(1), 114–129.

Reiczig J, Földi J, Ózsvári L (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology & Infection*, **138**(11), 1674-1678.

Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST (2012). The Global Burden of Hepatitis E Virus Genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, **55**, 988–997.

Rivadulla E, Varela MF, Mesquita JR, Nascimento MSJ, Romalde JL (2019). Detection of hepatitis E virus in shellfish harvesting areas from Galicia (Northwestern Spain). *Viruses.*, **11**(7), 618.

Rivero-Juarez A, Frias M, Rodriguez-Cano D, Cuenca-López F, Rivero A (2016). Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. *Clin. Infect. Dis.*, **62**, 1464.

Rossen L, Holmstrom K, Olsen JE, Rasmussen OF (1991). A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 145-152.

Ruggeri F, Bartolo ID, Ponterio E, Angeloni G, Trevisani M, Ostanello F (2013). Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol.*, **36**, 331–344.

Rui P, Zhao F, Yan S, Wang C, Fu Q, Hao J, Zhou X, Zhong H, Tang M, Hui W, Li W, Shi D, Ma Z, Song T (2020). Detection of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4 in Donkeys in Northern China. *Equine Vet. J.*, **52**, 415–419.

Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknegt M, de Roda Husman AM (2010). Seroprevalence and Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Wild Boar and Red Deer in The Netherlands. *J. Virol. Methods*, **168**, 197–206.

Santos-Silva S, Gonçalves HMR, Rivero-Juarez A, Van der Poel WHM, Nascimento MSJ, Mesquita JR (2022). Detection of Hepatitis E Virus in Milk: Current Evidence for Viral Excretion in a Wide Range of Mammalian Hosts. *Transbound. Emerg. Dis.*, **69**, 3173–3180.

Sayed IM, Elhameed ZAA, El-kareem DMA, Russell R (2021). Hepatitis E Virus Persistence and / or Replication in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Acute HEV-Infected Patients. **12(7)**, 1–11.

Sayed IM, Elkhawaga AA, El-Mokhtar MA (2020b). Circulation of hepatitis E virus (HEV) and/or HEV-like agent in non-mixed dairy farms could represent a potential source of infection for Egyptian people. *Int. J. Food Microbiol.*, **317**, 108479.

Sayed IM, Hammam ARA, Elfaruk MS, Alsaleem KA, Gaber MA, Ezzat AA, Salama EH, Elkhawaga A, El-Mokhtar MA (2020a). Enhancement of the Molecular and Serological Assessment of Hepatitis E Virus in Milk Samples. *Microorganisms*, **8**, 1-14.

Sayed IM, Seddik MI, Gaber MA, Saber SH, Mandour SA, El-Mokhtar MA (2020c). Replication of Hepatitis E Virus (HEV) in Primary Human-Derived Monocytes and Macrophages In Vitro. *Vaccines* (Basel), **8**.

Sayed IM, Vercauteren A, Abdelwahab S, Vercauteren K, Meuleman P (2015). Is hepatitis E virus an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology*, **62**, 1883–1892.

Schlosser J, Dähnert L, Dremsek P, Tauscher K, Fast C, Ziegler U, Gröner A, Ulrich RG, Groschup MH, Eiden M (2019). Different Outcomes of Experimental

Hepatitis E Virus Infection in Diverse Mouse Strains, Wistar Rats, and Rabbits. *Viruses*, **11**, 1.

Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH (2000). Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J. Virol.*, **74**, 5548–5555.

Shirazi R, Pozzi P, Wax M, Bar-Or I, Asulin E, Lusting Y, Mendelson E, Ben-Ari Z, Schwartz E, Mor O (2018). Hepatitis E in Israel: Seroprevalence, molecular characterization and potential impact on humans. *Euro Surveill*, **23**, 1800067.

Singh S, Daga MK, Kumar A, Husain SA, Kar P (2019). Role of oestrogen and its receptors in HEV-associated fetomaternal outcomes. *Liver Int.*, **39**, 633–639.

Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng X-J, Norder H, Okamoto H, van der Poel WHM, Reuter G, Purdy MA (2020). Update: Proposed Reference Sequences for Subtypes of Hepatitis E Virus (Species Orthohepevirus A). *J. Gen. Virol.*, **101**, 692–698.

Smith DB, Simmonds P (2014). Members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepviridae Study Group, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel W, Purdy MA. Consensus proposal for classification of the family Hepviridae. *J. Gen. Virol.*, **95**(10), 2223–2232.

Song Y-J, Jeong H-J, Kim Y-J, Lee S-W, Lee J-B, Park S-Y, Song C-S, Park H-M, Choi I-S (2010). Analysis of Complete Genome Sequences of Swine Hepatitis E Virus and Possible Risk Factors for Transmission of HEV to Humans in Korea. *J. Med. Virol.*, **82**, 583–591.

Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, Woo PCY (2017). Hepatitis E virus genotypes and evolution: Emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 869.

Taherkhani R, Makvandi M, Farshadpour F (2014). Development of enzyme-linked immunosorbent assays using 2 truncated ORF2 proteins for detection of IgG antibodies against hepatitis E virus. *Ann. Lab. Med.*, **34**, 118–126.

Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H (2005). Simultaneous Detection of Immunoglobulin A (IgA) and IgM Antibodies against Hepatitis E Virus (HEV) Is Highly Specific for Diagnosis of Acute HEV Infection. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 49–56.

Takahashi M, Okamoto H (2014). Features of Hepatitis E Virus Infection in Humans and Animals in Japan. *Hepatol. Res.*, **44**, 43–58.

Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H (2008). Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.*, **153**, 1703–1713.

Takakusagi S, Kakizaki S, Takagi H (2023). The Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment of Chronic Hepatitis E Virus Infection—A Condition Affecting Immunocompromised Patients. *Microorganisms*, **11**, 1303.

Tang ZM, Tang M, Zhao M, Wen GP, Yang F, Cai W, Wang SL, Zheng ZZ, Xia NS (2015). A novel linear neutralizing epitope of hepatitis E virus. *Vaccine*, **33**, 3504–3511.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003). Zoonotic Transmission of Hepatitis E Virus from Deer to Human Beings. *Lancet*, **362**, 371–373.

Tonbak F, Atasever M (2022). Determination of Hepatitis E Virus in Sheep and Cattle by Serological and Molecular Methods DNA Sequences Analysis. *Acta. Vet. Eurasia*, **48**, 94–100.

Trojnar E, Kästner B, Johne R (2020). No Evidence of Hepatitis E Virus Infection in Farmed Deer in Germany. *Food Environ. Virol.*, **12**, 81–83.

Tsachev I, Gospodinova K, Pepovich R, Takova K, Kundurzhiev T, Zahmanova G, Kaneva K, Baymakova M (2023). First Insight into the Seroepidemiology of Hepatitis E Virus (HEV) in Dogs, Cats, Horses, Cattle, Sheep, and Goats from Bulgaria. *Viruses*, **15**, 1594.

Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Kapikian AZ, Ticehurst J, London W, Purcell RH (1993). ELISA for Antibody to Hepatitis E Virus (HEV) Based on Complete Open-Reading Frame-2 Protein Expressed in Insect Cells: Identification of HEV Infection in Primates. *J. Infect. Dis.*, **168**, 369–378.

Vercouter AS, Sayed IM, Lipkens Z, De Bleecker K, De Vlieghe S, Colman R, Koppelman M, Supré K, Meuleman P (2018). Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *Int. J. Food Microbiol.*, **281**, 54–59.

Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AMC (2005). Serological Evidence of Hepatitis E Virus Infection in Different Animal Species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **100**, 117–122.

Walsh RB, Kelton DF, Hietala SK, Duffield TF (2013). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of neosporosis and leukosis in lactating dairy cows. *Can. Vet. J.*, **54**, 347–352.

Wang B, Meng X-J (2021). Structural and Molecular Biology of Hepatitis E Virus. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 1907–1916.

Wedemeyer H, Rybczynska J, Pischke S, Krawczynski K (2013). Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection. *Semin. Liver Dis.*, **33**, 71–78.

Wen GP, Tang ZM, Yang F, Zhang K, Ji WF, Cai W, Huang SJ, Wu T, Zhang J, Zheng ZZ, Xia NS (2015). A valuable antigen detection method for diagnosis of acute hepatitis E. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 782-788.

WHO (2010). The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70513/1/WHO_IVB_10.14_eng.pdf

WHO (2021). Hepatitis E. Retrieved from <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/hepatitis-e>

Williams TPE, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ (2001). Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.*, **39**(9), 3040–3046.

Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Cao K-Y, Wernery U, Schountz T, Chiu TH, Tsang AKL, Wong P-C, Wong EYM, Yuen KY (2016). New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 2219–2221.

Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, Tang Y, Sivakumar S, Xie J, Bai R, Wernery R, Wernery U, Yuen KY (2014). New Hepatitis E Virus Genotype in Camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1044–1048.

Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M (2015). Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Sheep from Southern Xinjiang, China. *Virus Genes.*, **50**, 410–417.

Xiaofang L, Zafrullah M, Ahmad F, Jameel S (2001). A C-Terminal Hydrophobic Region is Required for Homo-Oligomerization of the Hepatitis E Virus Capsid (ORF2) Protein. *J. Biomed. Biotechnol.*, **1**, 122–128.

Xing L, Wang JC, Li TC, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH (2011). Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.*, **85**, 1117–1124.

Yadav KK, Kenney SP (2021). Hepatitis E virus immunopathogenesis. *Pathogens*, **10**(9), 1180.

Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y (2009). Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **106**, 12986–12991.

Yan B, Zhang L, Gong L, Lv J, Feng Y, Liu J, Song L, Xu Q, Jiang M, Xu A (2016). Hepatitis E Virus in Yellow Cattle, Shandong, Eastern China. *Emerg. Infect. Dis. J.-CDC*, **22**, 2211.

Yang Y, Shi R, She R, Soomro MH, Mao J, Du F, Zhao Y, Liu C (2015). Effect of swine hepatitis E virus on the livers of experimentally infected Mongolian gerbils by swine hepatitis E virus. *Virus. Res.*, **208**, 171-9.

Yin X, Li X, Ambardekar C, Hu Z, Lhomme S, Feng Z (2017). Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog.*, **13**, e1006417.

Yin X, Li X, Feng Z (2016). Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. *Viruses*, **8**, 229.

Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, Zheng Z, Feng Z (2018). Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 4773–4778.

Yu Y, Sun J, Liu M, Xia L, Zhao C, Harrison TJ, Wang Y (2009). Seroepidemiology and Genetic Characterization of Hepatitis E Virus in the Northeast of China. *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 554–561.

Yugo DM, Cossaboom CM, Heffron CL, Huang YW, Kenney SP, Woolums AR, Hurley DJ, Opriessnig T, Li L, Delwart E, Kanevsky I, Meng XJ (2019). Evidence for an unknown agent antigenically related to the hepatitis E virus in dairy cows in the United States. *J. Med. Virol.*, **91**, 677–686.

Yugo DM, Meng XJ (2013). Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 4507–4533.

Zahmanova G, Takova K, Lukov GL, Andonov A (2024). Hepatitis E Virus in Domestic Ruminants and Virus Excretion in Milk—A Potential Source of Zoonotic HEV Infection. *Viruses*, **16**, 684.

Zahmanova G, Takova K, Tonova V, Koynarski T, Lukov LL, Minkov I, Pishmisheva M, Kotsev S, Tsachev I, Baymakova M, Andonov AP (2023). The Re-Emergence of Hepatitis E Virus in Europe and Vaccine Development. *Viruses*, **15**, 1558.

Zhao C, Geng Y, Harrison TJ, Huang W, Song A, Wang Y (2015). Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.*, **22**, 957-963.

Zhao M, Li XJ, Tang ZM, Yang F, Wang SL, Cai W, Zhang K, Xia NS, Zheng ZZ (2015). A Comprehensive Study of Neutralizing Antigenic Sites on the Hepatitis E Virus (HEV) Capsid by Constructing, Clustering, and Characterizing a Tool Box. *J. Biol. Chem.*, **290**, 19910–19922.

