

Farklı Hayvanlardan Elde Edilen Çiğ Sütlerde HEV RNA Miktarının ve Genotiplerinin Tespiti

Detection of HEV RNA Amounts and Genotypes in Raw Milks Obtained from Different Animals

Mehmet DEMİRCİ¹, Akın YİĞİN², Özge ÜNLÜ¹, Serap KILIÇ ALTUN³

¹ Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Beykent University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Turkey.

² Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

² Harran University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Genetics, Şanlıurfa, Turkey.

³ Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

³ Harran University Veterinary of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Şanlıurfa, Turkey.

Makale Atfı: Demirci M, Yiğın A, Ünlü Ö, Kılıç Altun S. Farklı Hayvanlardan Elde Edilen Çiğ Sütlerde HEV RNA Miktarının ve Genotiplerinin Tespiti. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):43-52

ÖZ

Hepatit E virüsü (HEV), fekal oral yolla geçen, önemli gıda kaynaklı viral patojenlerinden birisidir. İnsanları enfekte eden dört HEV genotipi bilinmekte ve zoonotik geçişlerde farklı HEV tiplerinin etken olduğu bildirilmektedir. HEV enfeksiyonları ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, HEV genotip 1 ve HEV genotip 2 enfeksiyonlarının, genellikle akut, HEV genotip 3 enfeksiyonlarının ise kronik seyrettiği bilinmekte, bu nedenle genotiplerin tespitinin tedaviye yön verebilmesi açısından da önemini ortaya koymaktadır. Ekonomik oluşu sebebiyle çiğ sütler sıklıkla toplumlarda kullanılmasına karşın ülkemizde ve dünyada, bu tür örneklerde HEV varlığı ve genotipleri ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, 231 çiğ süt örneğinde, (48 inek sütü, 65 keçi sütü, 65 koyun sütü ve 53 eşek sütü) HEV RNA miktarının ve genotiplerinin tespit edilerek epidemiyolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çiğ süt örneklerinden viral RNA izolasyonları yapılarak HEV RNA'nın varlığını kantitatif olarak saptamak için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) yöntemi ile HEV'in ORF2 bölgesi incelenmiştir. Ayrıca HEV RNA pozitif saptanan örneklerde, HEV'in ORF2 bölgesi nested PCR ile çoğaltılarak, elde edilen ampikondan dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen çiğ süt örneklerinin 47'sinde (%20.34) HEV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Bunlar arasında inek sütlerinin 14'ünde (%29.16), keçi sütlerinin 12'sinde (%18.46), koyun sütlerinin 8'inde (%12.3) ve eşek sütlerinin 13'ünde (%24.5) RNA pozitifliği saptanmıştır. İnek sütlerinde oran ve miktar olarak en yüksek düzeyde HEV RNA olduğu bulunurken pozitif saptanarak genotiplendirilen 47 örnekteki, HEV genotiplerinin dağılımı incelendiğinde, bunların 27 (%57.44)'sinin HEV genotip 1a, 10 (%21.27)'unun HEV genotip 1b, 4 (%8.5)'ünün HEV genotip 4c, 2 (%4.2)'sinin HEV genotip 3a, birer (%2.13) tanesinin HEV genotip 1c, HEV genotip 3e, HEV genotip 3f ve HEV genotip 3g olduğu saptanmıştır. Genotipler incelendiğinde, ülkemizde 1a yoğunlukta olmak üzere farklı genotiplerin var olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada gıda kaynaklı önemli viral etkenlerden birisi olan HEV'in çiğ sütlerde olabileceği, insanlarda enfeksiyona neden olan tiplerin özellikle hayvan kaynaklı çiğ sütlerde

bulunabildiği saptanmıştır. Gıda kaynaklı salgınların engellenmesi açısından, çiğ sütlerde HEV varlığının göz ardı edilmemesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Hepatit E virüsü; HEV genotipleri; çiğ süt.*

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is one of the major foodborne viral pathogens transmitted through the fecal-oral route. Four genotypes of HEV are known to infect humans and it is reported that different types of HEV are active in zoonotic transitions. It is known that the HEV genotype 1 and HEV genotype 2 infections are generally acute and the HEV genotype 3 infections are chronic. Therefore, in the studies related to HEV infections, it is important to determine the genotypes to monitor treatment regimens. Although raw milk is often used in communities due to its low cost, there are limited data on the rates and the genotypes of HEV in our country and in the world. In light of this information, we aimed to investigate epidemiologically the quantity and genotypes of HEV RNA in 231 raw milk (48 cow milk, 65 goat milk, 65 sheep milk, and 53 donkey milk) samples. Viral RNAs were isolated from raw milk samples and the ORF2 region of HEV was investigated by the qRt-PCR method to determine quantitatively the presence of HEV RNA. In addition, among HEV RNA positive samples, the ORF2 region of HEV was amplified by nested PCR and the amplicons were sequenced. HEV RNA was detected in 47 (20.34%) raw milk samples, Positivity was detected in 14 (29.16%) of cow milk, 12 (18.46%) of goat milk, 8 of sheep milk (12.3) and 13 of donkey milk (24.5%). The amount of HEV RNA in cow milk found as the highest in both proportion and quantity. When the distribution of the HEV genotypes in the 47 positive samples was examined, 27 (57.44%) HEV genotype 1a, 10 (21.27%) HEV genotype 1b, 4 (8.5%) HEV genotype 4c, 2 (4.2%) HEV genotype 3a, (2.13) HEV genotype 1c, 1 (2.13%) HEV genotype 3e, 1 (2.13%) HEV genotype 3f and 1 (2.13%) HEV genotype 3g were determined. Although genotype 1a is more frequent, it has been revealed that different genotypes encountered in our country. In conclusion, it has been determined that HEV, one of the major foodborne viral agents, may be encountered in raw milk, and the genotypes that can cause infections in human are found especially in raw milk from animal sources. For the prevention of foodborne outbreaks, the presence of HEV in raw milk should not be ignored.

Keywords: *Hepatitis E virus; HEV genotypes; raw milk.*

GİRİŞ

Hepatit E virüsü (HEV), 7.2 kb büyüklüğünde genomu bulunan, tek zincirli, pozitif RNA içeren Hepeviridae ailesinden bir virüstür^{1,2}. HEV, fekal oral yolla bulaşan, önemli gıda kaynaklı viral patojenlerinden biri olmasının yanı sıra akut hepatit E'nin etiyolojik ajanı ve enterik olarak geçen hepatitlerin önde gelen nedenidir^{1,3,4}. HEV'in, tanımlanmış 8 genotipi bulunmaktadır⁵. HEV genotip 1 ve 2'nin, insanlarda gelişmekte olan bölgelerde endemik olduğu bilinmektedir. HEV genotip 3 ve 4 ise dünya genelinde HEV'in sporadik salgınlarıyla ilişkili zoonotik ajanlardır^{2,4,6}. HEV genotip 3 ve 4'ün Avrupa'da yapılan çalışmalarda besin kaynaklı zoonotik geçişlerde sıklıkla iyi pişmemiş domuz etlerinin kaynak olduğu belirtilmektedir^{7,8}. Japonya'da, yaban domuzlarında HEV genotip 5 ve 6 gibi yeni HEV genotiplerinin saptanması, tavuk, tavşan, fare, güvercin ve tilki gibi farklı türlerde, yeni HEV varyantlarının tanımlanması ve karakterize edilmesi farklı zoonotik kaynakların düşünülmesine neden olmuştur⁹⁻¹². Ortadoğu'da karaciğer transplant hastasının, yoğun olarak deve eti ve sütünü tüketimi sonrasında HEV genotip 7 ile enfekte olduğunun bildirilmesi ve yine HEV genotip 8'in, genotip 7 gibi develerde tanımlanması ile bu virüs ailesinde, çeşitliliğin arttığını ve bu virüsün yüksek bir zoonotik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir^{5,13}. İnek sütlerinde yapılan bir çalışmada ise çiğ sütlerde yük-

sek titrelerde HEV RNA'sının saptandığının rapor edilmesi, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde, HEV'in, tüketimde sıklıkla kullanılan ve iyi bir besin kaynağı olarak düşünülen farklı hayvanlardan elde edilen çiğ sütlerde, rutin enfeksiyon kaynağı olarak düşünülmesi gerektiğini ispatlamıştır⁶. HEV enfeksiyonları ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, HEV genotip 1 ve HEV genotip 2 enfeksiyonlarının, genellikle akut, HEV genotip 3 enfeksiyonlarının ise kronik seyrettiği bilinmekte, bu nedenle genotiplerin tespitinin tedaviye yön verebilmesi açısından da önemini ortaya koymaktadır¹⁴. Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada farklı hayvan türlerinden elde edilen ve gündelik yaşantımızda sıklıkla tüketime sunulan çiğ sütlerde, HEV RNA'nın miktarının kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) yöntemi ile saptanması ve HEV RNA pozitifliği saptanan örneklerde, DNA dizi analizi yöntemi ile HEV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik Örnekler

Ocak 2016-Nisan 2016 arasında, 231 çiğ süt örneği (48 inek sütü, 65 keçi sütü, 65 koyun sütü ve 53 eşek sütü) toplandı. Tüm örnekler steril cam şişelere alınarak hızlıca laboratuvara ulaştırıldı ve RNA izolasyonu aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

RNA İzolasyonu

HEV RNA'nın tespiti, kantitasyonu ve qRt-PCR ile pozitif saptanması durumunda DNA dizi analizi için çiğ sütlerin 200 µl'sinden RNA izolasyonları, QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRt-PCR)

Yöntemi ile HEV RNA'nın Kantitasyonu

Sütlerde HEV RNA'nın saptanması ve kantitasyonu için ORF2 kapsit gen bölgesine özgül, "Hepatitis E virus Genesig Advanced kit (Primer Design, Birleşik Krallık)" üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. qRt-PCR reaksiyonuna her bir örnek için, "Precision PLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix (Primer Design, Birleşik Krallık) 10 µl, HEV primer/probe karışımı 1 µl ve DNaz/RNaz içermeyen saf su 4 µl olacak şekilde 15 µl reaksiyon karışımı ve 5 µl kalıp RNA eklendi. qRt-PCR reaksiyonu protokolü; 55°C'de 10 dakika ters transkripsiyon ve 95°C'de 2 dakika enzim aktivasyon aşamalarını takiben, 95°C'de 10 saniye denatürasyon ve 60°C'de 60 saniye çoğaltma ve veri toplaması olacak şekilde 50 döngü, amplikon çoğaltma aşamasını içerecek şekilde uygulandı.

HEV RNA Genotiplerinin Saptanması

HEV RNA pozitif örneklerde HEV RNA genotiplerinin bulunabilmesi için komplementer DNA (cDNA) örneklerinden ORF2 bölgesinin 5' end RNA dizileme tekniği kullanıldı¹⁵. qRt-PCR yöntemi ile HEV RNA pozitif saptanan örneklerin cDNA'larından özgül primerler kullanılarak "nested PCR" gerçekleştirildi (Tablo I) ve bu amplikonlarda ORF2 özgül HEV3

Tablo I. HEV RNA'nın ORF2 Bölgesinin, DNA Dizi Analizi İçin Pozitif Örneklerde Kullanılan Nested PCR Primerleri⁶

İsim	Primer dizileri	Pozisyon
ORF2 HEV1	AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)GTTG	5729 - 5750
ORF2 HEV3	GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT	6014 - 6035
ORF2 HEV4	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	6361 - 6340
ORF2 HEV2	CCCTTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC	6457 - 6437

oligonükleotit primeri kullanılarak MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Birleşik Krallık) cihazı ile üretici firma önerileri doğrultusunda okundu, fasta dizileri çıkarıldı. Elde edilen fasta dosyaları "NCBI nucleotid blast software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)" ve MEGA7 software kullanılarak analiz edildi¹⁶.

BULGULAR

Bu çalışma kapsamındaki 231 çiğ süt örneğinin (48 inek sütü, 65 keçi sütü, 65 koyun sütü ve 53 eşek sütü) 47'sinde (%20.34) HEV RNA'sı pozitif olarak saptanmıştır. İnek sütlerinin 14 (%29.16)'ünde, keçi sütlerinin 12 (%18.46)'sinde, koyun sütlerinin sekiz (%12.3)'ünde ve eşek sütlerinin 13 (%24.5)'ünde HEV RNA pozitifliği saptanmıştır (Tablo II).

HEV RNA varlığı saptanan örneklerdeki kantitatif miktarlar incelendiğinde inek sütlerinde saptanan HEV RNA pozitifliklerinin, keçi, koyun ve eşek sütlerinde saptanan miktarlara göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo III).

HEV RNA pozitif çiğ süt örneklerinin ORF2 bölgesinde yapılan DNA dizi analizi ile elde edilen genotipleri Tablo IV'te verilmiştir. Tüm süt çeşitlerinde HEV genotip 1 ve özellikle 1a'nın sıklıkla bulunduğu görülmüştür. Koyun sütleri diğer sütlere göre daha farklı genotipleri barındırırken, eşek sütlerinde ise sadece HEV genotip 1 saptanmıştır (Tablo IV).

HEV RNA pozitif saptanarak genotiplendirilen 47 örnekte, HEV genotiplerinin dağılımı incelendiğinde, 27 (%57.44) HEV genotip 1a, 10 (%21.27) HEV genotip 1b, 4 (%8.5) HEV genotip 4c, 2 (%4.2) HEV genotip 3a, birer (%2.13) HEV genotip 1c, HEV genotip 3e, HEV genotip 3f ve HEV genotip 3g olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

Tablo II. Farklı Çiğ Sütlerde, HEV RNA Varlığının Dağılımı

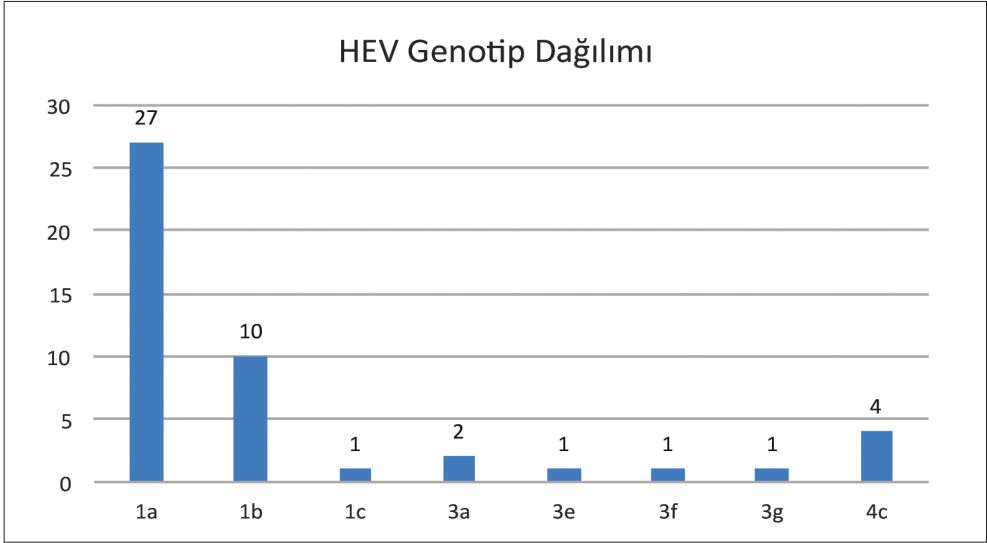
Çiğ süt tipi	Pozitif n (%)
İnek sütü (n= 48)	14 (29.16)
Keçi sütü (n= 65)	12 (18.46)
Koyun sütü (n= 65)	8 (12.3)
Eşek sütü (n= 53)	13 (24.5)
Toplam (n= 323)	47 (14.55)

Tablo III. HEV RNA Pozitif Çiğ Sütlerde HEV RNA Miktarının Dağılımı (kopya/ml)

No	İnek sütü (n= 14)	Keçi sütü (n= 12)	Koyun sütü (n= 8)	Eşek sütü (n= 13)
1	17600	375	1020	1020
2	12100	1020	133	1930
3	12400	1080	1130	133
4	11700	1100	2110	1130
5	18300	12700	2010	1080
6	18200	3370	4640	1060
7	18900	5270	1820	1100
8	20100	389	10600	1880
9	10800	1100	-	1210
10	4640	4200	-	1960
11	5090	3400	-	1730
12	16600	11800	-	114
13	19300	-	-	1890
14	3400	-	-	-

Tablo IV. HEV RNA Pozitif Çiğ Süt Örneklerinde, 5' ORF2 Bölgesi Dizi Analizi Fasta Dosyalarının NCBI'da Kontrolü Sonrası Saptanan Genotipler ve NCBI Erişim (Accession) Numaraları

No	İnek sütü (n= 14)	Keçi sütü (n= 12)	Koyun sütü (n= 8)	Eşek sütü (n= 13)
1	1a (M73218)	1a (DQ079624)	4c (AB220971)	1b (D11092)
2	1a (M73218)	1a (DQ079624)	1a (DQ079624)	1b (D11092)
3	1b (D11092)	4c (AB220971)	1b (D11092)	1b (D11092)
4	1a (DQ079624)	4c (AB220971)	1b (D11092)	1a (M73218)
5	1b (D11092)	3a (AB089824)	1c (X98292)	1a (DQ079624)
6	4c (AB220971)	1a (DQ079624)	3f (KC166970)	1a (DQ079624)
7	1a (M73218)	1a (DQ079624)	3e (JQ013795)	1b (D11092)
8	3a (AB089824)	1b (D11092)	1b (D11092)	1a (DQ079624)
9	1b (D11092)	3g (AF455784)	-	1a (DQ079624)
10	1a (DQ079624)	1a (DQ079624)	-	1a (DQ079624)
11	1a (X99441)	1a (M73218)	-	1a (M73218)
12	1a (DQ079624)	1a (M73218)	-	1a (M73218)
13	1a (DQ079624)	-	-	1a (M73218)
14	1a (DQ079624)	-	-	-



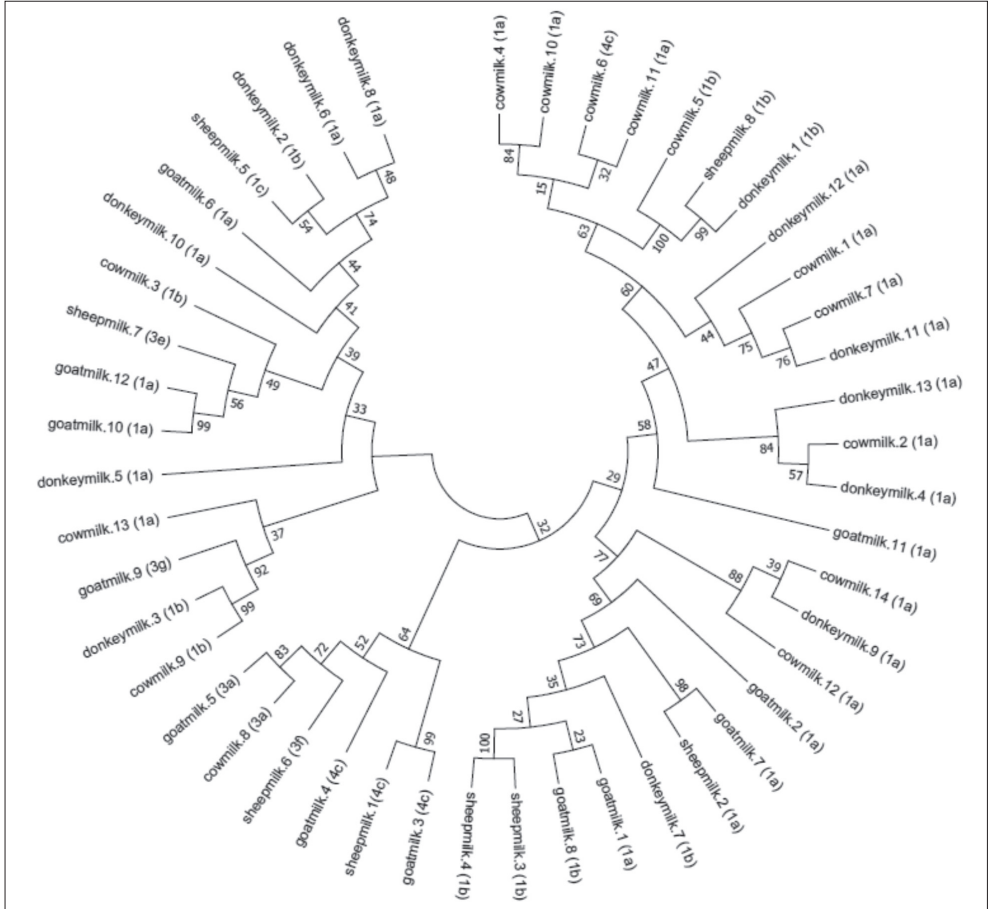
Şekil 1. HEV pozitif saptanan tüm örneklerdeki HEV genotiplerinin dağılımı.

Elde edilen fasta dizileri analiz edilerek sütlerde saptanan HEV RNA dizilerinin filogenetik analizleri için dendrogram oluşturulmuştur. Farklı hayvan türlerinden alınan çiğ sütlerde HEV RNA'lar saptanmış olmasına karşın, HEV RNA'ların genotipik olarak birbirlerine benzerlikleri bu şekilde incelenmiştir (Şekil 2). Önceki çalışmalarda evrimsel olarak birbirine yakın olduğu bilinen genotip 1a ve 1b'nin çalışmamızda da birbirine daha yakın olduğu ve genellikle aynı kolda yer aldığı görülmüştür. Genotip 3a ve 3f'nin genotipik olarak birbirine ve genotip 4c'ye yakın olduğu ve genotip 1a ve 1b kolundan ayrı bir kolda yer aldığı tespit edilmiştir. Buna karşın, genotip 3e ile 3g'nin genotip 1a ve 1b'ye olan yakınlıklarının, genotip 3a ve 3f'ye olan yakınlıklarından fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı hayvan türlerinden izole edilen aynı genotipler ile farklı hayvan türlerinden izole edilen aynı genotipteki HEV'lerin birbirleri ile olan filogenetik ilişkileri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 2).

TARTIŞMA

HEV, fekal-oral yolla bulaşan akut hepatitlerin başlıca etkenlerinden biridir. HEV ile enfekte olmuş ineklerin sütü ile insanlara zoonotik olarak HEV bulaşması literatürde tanımlanmış olmakla birlikte, keçi ve koyun sütlerindeki HEV riskine ait araştırmalar kısıtlıdır¹⁹⁻²¹. İçeriği dolayısıyla insana yararlı olduğu düşünülen eşek sütlerine özellikle Avrupa'da ilgi artmaktayken, bu sütlerde HEV'in durumu ile ilgili bilgi bulunmamaktadır²². Farklı hayvan türlerinin HEV'i insanlara bulaştırabileceği yıllar içinde çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir. Bunun yanı sıra HEV için kaynak teşkil eden hayvan türlerinin ve bunlarda saptanan farklı genotiplerin sayısı yıllar içinde artmaktadır^{5,13,23}.

Günümüzde hijyen koşullarının yetersiz olduğu ülkelerde genellikle HEV genotip 1 ve HEV genotip 2'ye bağlı enfeksiyonlar görülürken, iyi hijyenik koşullara sahip ülkelerde ise



Şekil 2. HEV RNA pozitif çiğ süt örneklerindeki HEV tiplerinin filogenetik ağacı ve evrimsel ilişkisi^{16-18*}.

*Evrimsel tarih, Neighbor-joining yöntemi kullanılarak çıkarıldı¹⁷. Şube uzunluğu= 17.24549919 olan optimal ağaç gösterilmiştir. Ağaç, filogenetik ağacı ortaya çıkarmak için kullanılan evrimsel mesafelerle aynı birimlerdeki dal uzunlukları kullanılarak ölçeklendirildi. Evrimsel uzaklık, Maximum Composite Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplandı¹⁸ ve her bir baz değişimi miktarı yer almaktadır. Analiz, 47 nükleotit sekansı içermiştir. Kodon pozisyonları 1+2+3+ kodlama içermiyordu. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elendi. Son veri kümesinde toplam 329 pozisyon vardı. Evrim analizleri MEGA7 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir¹⁶.

HEV genotip 3 ve HEV genotip 4'e bağlı zoonotik enfeksiyonların daha sık geliştiği bildirilmektedir. Bu durum, çiğ olarak tüketilen farklı hayvan türlerine ait sütlerde, moleküler epidemiyolojik açıdan hangi HEV genotipinin olabileceği sorusunu ve bu genotiplerin, hastalarda nasıl bir zoonotik enfeksiyona yol açabileceği sorusunu ortaya çıkarmaktadır²⁴.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Geng ve arkadaşları²⁵, 2011 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada, inek sütlerinde %14.29 (40/280) oranında anti-HEV pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Huang ve arkadaşları⁶, 2016 yılında yine Çin'de yaptıkları çalışmalarında inek sütlerinde 10^4 seviyesinde HEV RNA pozitifliği bildirmiş ve bu izolatların genotip 4h olduğunu saptamışlardır. Long ve arkadaşları²¹, 2017 yılında Çin'de yaptıkları çalışma-

larında keçi sütlerinden 10^4 - 10^5 seviyesinde HEV RNA saptamışlar ve aynı bölgede Huang ve arkadaşlarının⁶ 2016'daki çalışmasına benzer şekilde keçi sütlerinde genotip 4h olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada aynı bölgede insan, domuz ve ineklerden alınan süt örneklerinde saptanan HEV tiplerinin, keçilerde saptanan HEV tipleri ile > %99.6 homoloji gösterdiği tespit edilmiştir²¹. Baechlein ve Becher²⁶ ise, Huang ve arkadaşlarının⁶ superscript 2016'daki yaptığı çalışmaya atfen 2017 yılında Almanya'da yaptıkları çalışmada, tanklardan ve ineklerden alınan sütleri havuzlayarak HEV RNA varlığını qRt-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışma sonucunda inekler sütlerinde HEV RNA saptamadıklarını belirtmişlerdir²⁶. Vercouter ve arkadaşları²⁷ Belçika'da 2018 yılında, inek çiftliklerinde bulunan 30 inekten aldıkları 60 süt örneğinde ve hükümete bağlı süt kontrol merkezine ait 504 inek süt tankından aldıkları örneklerde ve süt kontrol merkezine kontrol için gelen 1104 inek sütü örneğinde HEV RNA'ya rastlamadıklarını Baechlein ve Becher²⁶'in 2017'de Almanya'da yaptıkları çalışmaya benzer şekilde bildirmişlerdir²⁷. Bu çalışmalarda saptanan ve çalışmamız sonuçlarıyla eşleşmeyen verilerin, çalışmalarda^{6,21,25} havuzlama yapılmış olmasından ve/veya çalışmaya dahil edilen sütlerdeki koruyuculardan kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. HEV pozitifliklerinin gözleendiği diğer çalışmalardaki veriler ise, özellikle aynı bölgede gelişen bir HEV enfeksiyon kaynağının, farklı türlerde enfeksiyonlara neden olabileceğini ve farklı türlerde aynı genotip HEV'in karışımıza çıkabileceğini düşündürmektedir. Schlosser ve arkadaşları⁸ 2014 yılında yaptıkları çalışmada, bu varsayımın doğru olabileceğini göstermiştir. Çalışmada yaban domuzlarındaki HEV genotip 3 tiplerinin evcil domuzlara bulaştığı belirtilmiştir⁸. Aynı şekilde Drobeniuc ve arkadaşları²³, 2001 yılında domuzlardan insana HEV bulaşının olabileceğini ve insanlara HEV bulaşında hayvanların rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Her ne kadar aynı örnek ve yöntemle olmasa da; Li ve arkadaşları²⁸ 2017 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada, keçi kanlarında %46.7 oranında anti-HEV saptadıklarını ve bu örneklerde HEV genotip 4h bulunduğunu bildirmişlerdir. Vitral ve arkadaşları²⁹, 2005 yılında Brezilya'da farklı hayvanlarda yaptıkları seroprevalans çalışmasında, ineklerde anti-HEV IgG saptadıklarını koyun ve keçilerde ise saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Her iki çalışma, bu hayvanlarda HEV enfeksiyonlarının gözlenebileceğini kanıtlamaktadır²⁹.

Yaptığımız literatür taramalarında şu ana kadar, koyun sütlerinde ve eşek sütlerinde HEV RNA'sının incelenmemiş olduğunu belirledik. Her ne kadar çalışılan örnek, süt örneği olmasına karşın, Wu ve arkadaşları³⁰ 2015 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada, koyun eti ve ciğerinde %35.2 oranında pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir. Bu izolatların genotipleri incelendiğinde, HEV genotip 4'ün en fazla olduğu tespit edilirken, bunu genotip 1, genotip 3 ve genotip 2'nin izlediği saptanmıştır³⁰. Geng ve arkadaşları²⁵ 2011 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada, Wu ve arkadaşları³⁰'nın 2015 yılında yaptıkları çalışmaya benzer şekilde, koyun et örneklerinde HEV RNA saptanmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada her ne kadar farklı örnek olsa da eşek etlerinde de HEV RNA saptanmadığı bildirilmiştir²⁵. Literatür taramaları sonucunda, şu ana kadar ülkemizde HEV RNA ile ilgili sıkça günlük kullanımda olan süt ve süt ürünlerinde bir çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmadaki veriler ülkemiz için ilk verileri oluşturacaktır. Uluslararası çalışmalara ait veriler ile ulusal verilerimiz karşılaştırıldığında, ülkemizde farklı hayvan türlerinden elde edilen sütlerde HEV genotip 1'in daha sık

bulunduğu belirlenmektedir. İnek sütleri, keçi sütleri ve koyun sütlerinde genotip 1 yanında genotip 3 ve 4'ün de bulunabildiği görülürken, genotip 2 süt örneklerimizde saptanmamıştır. Özellikle Avrupa'da ticari olarak önemi artan eşek sütlerinde HEV genotip 1'in varlığını saptadık. Literatürde eşek sütlerinde bu yönde yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda farklı hayvan türlerinden sağlanan ve günlük hayatımızda kullanılan çiğ sütlerde, hepatit E virüsü saptadık ve genotiplerini belirledik. İnek sütü, koyun sütü ve keçi sütünde zoonotik enfeksiyon potansiyeline sahip farklı genotiplerin, çeşitlilik içinde olabildiği fakat eşek sütlerinde özellikle genotip 1 varlığının olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, çiğ süt satışı ve tüketiminde HEV enfeksiyonları göz önüne alınarak, hijyen koşullarına dikkat edilmesi gerektiğini ve bu ürünlerin HEV yönüyle ciddi enfeksiyonlara neden olabileceği düşünülerek taktiklerinin yapılmasını gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca çiğ sütler ile ilgili yapılmış çalışmaların azlığı, bu alanda daha kapsamlı çalışmalar yapılarak, epidemiyolojik verilerin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses* 2016;8(10):270.
2. McElroy A, Hiraide R, Bexfield N, Jalal H, Brownlie J, Goodfellow I, et al. Detection of hepatitis E virus Antibodies in dogs in the United Kingdom. *PLoS One* 2015;10(6):e0128703.
3. Sekse C, Holst-Jensen A, Dobrindt U, Johannessen GS, Li W, Spilsberg B, et al. High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens. *Front Microbiol* 2017;8:2029.
4. Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med* 2014;6:45-59.
5. Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, Woo PCY. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int J Mol Sci* 2017;18(4):E869.
6. Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, et al. Excretion of infectious hepatitis E virus in to milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* 2016;64(2):350-9.
7. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 2010;202(6):825-34.
8. Schlosser J, Eiden M, Vina-Rodriguez A, Fast C, Dremsek P, Lange E, et al. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet Res* 2014;45:121.
9. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, et al. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 2014;180:59-69.
10. Meng XJ. From Barnyard to Food Table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 2011;161(1):23-30.
11. Raj V, Smits SL, Pas SD, Provacia LB, Moorman-Roest H, Osterhaus AD, et al. Novel hepatitis E virus in Ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2012;18(8):1369-70.
12. Bodewes R, Ruiz-Gonzalez A, Schapendonk CM, van den Brand JM, Osterhaus AD, Smits SL. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virol J* 2014;11:89.
13. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. Chronic infection with Camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology* 2016;150(2):355-7.

14. Nijssens CM, Pas SD, van der Eijk AA, de Man RA. Hepatitis E in Europe: Diagnosis and treatment. *EMJ Gastroenterol* 2015;4(1):121-7.
15. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;16(1):5-36.
16. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33(7):1870-74.
17. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4(4):406-25.
18. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(30):11030-5.
19. Mirazo S, Gardinali NR, Cecilia D, Verger L, Ottonelli F, Ramos N, et al. Serological and virological survey of hepatitis E virus (HEV) in animal reservoirs from Uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. *Vet Microbiol* 2018;213:21-7.
20. Kaiser M, Kamili S, Hayden T, Blümel J, Baylis SA. Genome sequence of a genotype 2 hepatitis E virus World Health Organization reference strain. *Genome Announc* 2017;16:5(7):e01664-16.
21. Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, et al. High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol* 2017;89(11):1981-7.
22. Ragona G, Corrias F, Benedetti M, Paladini M, Salari F, Altomonte L, et al. Amiata donkey milk chain: animal health evaluation and milk quality. *Ital J Food Saf* 2016;5(3):5951.
23. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184(12):1594-7.
24. Widén F, Ayrat F, Artois M, Olofson AS, Lin J. PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virol J* 2014;11:90.
25. Geng J, Wang L, Wang X, Fu H, Bu Q, Liu P, et al. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis E virus in human and various animals in Beijing, China. *J Viral Hepat* 2011;18(10):e583-90.
26. Baechlein C, Becher P. No evidence for zoonotic hepatitis E virus infection through dairy milk in Germany. *Hepatology* 2017;65(1):394-5.
27. Vercoouter AS, Sayed IM, Lipkens Z, De Bleecker K, De Vlieghe S, Colman R, et al. Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *Int J Food Microbiol* 2018;281:54-9.
28. Li S, Liu M, Cong J, Zhou Y, Miao Z. Detection and characterization of hepatitis E virus in goats at slaughterhouse in Tai'an region, China, *BioMed Research International* 2017;Article ID 3723650.
29. Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(2):117-22.
30. Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes* 2015;50(3):410-7.