

PRIMEIRA AVALIAÇÃO DA SEROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE E no Norte de Portugal

GUILHERME MACEDO, TERESA PINTO, J. ALEXANDRE SARMENTO,
ANA MARIA H. VALE, TOMÉ RIBEIRO

Unidade de Gastrenterologia. Hospital de S. João. Faculdade de Medicina do Porto. Porto.

RESUMO

A hepatite E é uma infecção aguda de transmissão entérica provocada por um agente de recente identificação e caracterização molecular, o vírus de hepatite E (VHE). Ocorre sobretudo em epidemias nos países em vias de desenvolvimento, e em casos esporádicos nas regiões endémicas. Os autores apresentam a primeira avaliação serológica no nosso meio, da eventual presença do anticorpo IgG anti VHE, utilizando teste Elisa (EIA, HEV, Abbott) em amostras de sangue de 50 hemodadores e 103 doentes hepáticos crónicos. Detectaram 2 amostras positivas nos hemodadores (4%) e 7 (6,8%) nos doentes hepáticos, sendo o quociente de densidades ópticas/ "cutoff" sempre inferiores a 2,5. Só um dos doentes tinha permanecido em região endémica, e a presença do anticorpo não se associa de forma significativa à presença de outros vírus hepatotrópicos. Os autores concluem que a detecção de anticorpo anti VHE, por este teste, revelou seropositividade em 4% dos hemodadores, que nos doentes hepáticos crónicos a prevalência não é significativamente superior (6,8%) e que uma nova geração de ensaios imunológicos para diagnóstico, facilitará a caracterização epidemiológica de hepatite E.

SUMMARY

First Assessment of Hepatitis E Virus Seroprevalence in the North of Portugal

Hepatitis E is an enterically transmitted acute viral hepatitis, etiologically associated with a recently characterized virus, the hepatitis E virus (HEV). Outbreaks mainly occur in developing countries and as sporadic cases in endemic regions. The authors present the first serological assessment in northern Portugal to assess the presence of anti HEV IgG, using the Elisa test, the EIA and HEV Abbott, in samples from 50 blood donors and 103 chronic liver disease patients. In 2 blood donors (4%) and in 7 (6,8%) liver patients, the HEV antibody was detected with optic densities/cut off always below 2.5. Only one patient had a sojourn in an endemic region; the presence of anti-HEV was not significantly associated with other hepatotropic viruses. With this test the authors conclude that 4% of our blood donors are seropositive for anti-HEV antibody and that this percentage is not significantly higher in chronic liver disease patients (6,8%). They also think that a new generation of immunological assays, designed for serological diagnosis of HEV infection, will provide a further understanding of hepatitis E epidemiology.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite E é considerado como o agente etiológico mais importante da hepatite não-A, não-B de transmissão entérica¹. A doença por si induzida, a hepatite E (também designada hepatite ETNANB enterically transmitted non-A non-B hepatitis²) é autolimitada e ocorre frequentemente por surtos epidémicos em muitos países em vias de desenvolvimento (Ásia, África e subcontinente indiano). Esta forma de hepatite aguda também é responsável por um número significativo de casos esporádicos em regiões endémicas², e ocasionalmente foi observada em países industrializados³.

No entanto, recentes estudos mostram³ que a hepatite E apresenta uma maior difusão no globo do que anteriormente se supunha⁴ e foi documentada a transmissão parentérica. Tendo Portugal possuído territórios em áreas de risco (África e Ásia) e tendo mantido fluxo migratório intenso com a América do Sul (Brasil e Venezuela), avaliamos a presença do anticorpo do vírus da hepatite E (VHE) em amostras de sangue de hemodadores benévolos assintomáticos e de doentes hepáticos portugueses.

MATERIAL E MÉTODOS

Analizaram-se soros de 50 dadores de sangue benévolos assintomáticos (DSBA) sem marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B ou C, e com aminotransferases normais, com média de idade de 36 anos.

Avaliaram-se também soros de 103 doentes hepáticos crónicos, com média de idades de 48 anos. Em 30 doentes, a etiologia era infecção crónica pelo vírus da hepatite B, em 42 pelo vírus da hepatite C, e em 25 a etiologia da doença hepática crónica era o etanol sendo seis restantes, hepatopatias autoimunes.

Todas as amostras foram analisadas com o teste HEV EIA (Abbot Diagnostic) que utiliza antigéneos recombinantes da *Open Reading Frames* (ORF) 2 e 3 (SG3 e 8-5) expressos na *Escherichia coli* que codificam respectivamente proteínas não estruturais e estruturais do vírus de estirpe birmanesa. O antigéneo recombinante SG-3 compreende 327 aminoácidos do terminal carboxil de ORF 2, que codifica a proteína estrutural maioritária de VHE, e o antigéneo 8-5 consiste em 123 aminoácidos representando toda a extensão de ORF3. Este teste detecta unicamente anticorpos de classe IgG. Foram consideradas negativas as amostras cujas absorbâncias eram iguais ou superiores a 0.005, mas inferiores ao valor *cut-off*. As amostras de absorbância superior ou igual ao *cut-off* foram consideradas reactivas inicialmente, e foram retestadas. Se de novo fossem reactivas, as amostras seriam consideradas repetidamente reactiva para o anticor-

po IgG. Se ambos os testes fossem negativos, a amostra seria negativa. Quando as absorbâncias se encontravam nos $\pm 10\%$ do valor *cut-off*, seriam considerados pertencentes à zona cinzenta.

Todos os indivíduos com amostras positivas ou de reactividade pertencente à zona cinzenta, foram inquiridos quanto à estadia em países da América Latina, Brasil, Extremo Oriente e África.

RESULTADOS

O anti HEV foi detectado em 2/50 amostras (4%) dos dadores e em 7/103 (6,8%) dos doentes com hepatopatia crónica. Os quocientes de reacção densidade óptica (D.O.)/*cut-off* encontrados nas amostras de dadores foram de 1,1 e 1,5, e nos sete doentes variavam entre 1,0 e 2,3 (média 1,5). Em seis destes doentes, a histologia era cirrose (dois de etiologia alcoólica, dois por vírus B e dois por vírus C). A média de idade destes sete doentes era de 58 anos, sendo a dos dadores, de 34 anos. Apenas um doente cirrótico por hepatite C, tinha vivido na Venezuela. Nenhum doente ou hemodador tinha antecedentes de hepatite aguda icterica.

DISCUSSÃO

A clonagem do VHE, a sequenciação do genoma vírico e a expressão das proteínas recombinantes do VHE, induziram um progresso significativo no desenvolvimento de métodos para identificação da infecção pelo VHE em doentes e em animais do laboratório².

Depois de em 1977 ter sido postulada a existência de 2 agentes distintos para a etiologia da hepatite vírica NANB, por Mosley⁵, foi no início da década de 80 que foi atribuída a imputabilidade a um vírus NANB da responsabilidade por epidemias e hepatite aguda na Índia⁶, e descrita a associação de hepatites fulminantes nas grávidas ao vírus NANB de transmissão entérica. Em 1983 foi descrita a transmissão de hepatite entérica NANB a um voluntário⁷ e identificaram-se partículas víricas de 27 a 30 nm em fezes de doentes. Outro passo contributivo para a futura caracterização genómica, foi a demonstração de hepatite entérica em primatas não humanos bem como a sua transmissão⁸. A caracterização antigénica e fisicoquímica do vírus da hepatite E foi feita em 1988⁹, tendo sido proposto como calicivírus¹⁰, e foi feita a identificação etiológica de infecção por vírus em diferentes regiões do globo¹¹. Seguiu-se em 1989, a clonagem e sequência de genoma de VHE, por Reyes¹ e em 1991, a definição de 3 *opening reading frames* (ORF)¹⁷. Depois da revisão taxonómica em 1992, passou-se a considerar o VHE como pertencendo ao sub-

grupo *alpha-like* dos vírus RNA de cadeia positiva¹².

Em 1993 passaram-se a dispôr de ensaios imunoenzimáticos usando antigêneos recombinantes (para *Escherichia coli*, baculovírus) da ORF 2 e 3, das estirpes da Birmania¹³, México¹⁴ e Paquistão¹⁵.

A utilização destes testes enzimáticos demonstrou que a maioria das epidemias ETNANBH foram provocadas pelo VHE, e que existiriam apenas dois serótipos¹⁶. A comparação da sequência de VHE de diversas regiões, revelou também um elevado grau de homologia^{17,18} embora já tenha sido descrito existirem deleções na ORF de algumas estirpes indianas.

A utilização de ensaios imunoenzimáticos deste tipo tem permitido elaborar estudos de seroprevalência, em países desenvolvidos do hemisfério ocidental (EUA, França, Espanha, por exemplo) e em países sem relato de epidemias de hepatites entéricas NANB (Hong Kong²⁰, Egipto²¹).

Embora existam indicadores de que nos países ocidentais a hepatite E é rara^{22,23}, o IgG anti VHE foi detectado em 2,7% dos hemodadores voluntários nos EUA e Alemanha¹⁴, sugerindo que uma pequena proporção de residentes em países ocidentais tiveram contactos prévios com o VHE e que o IgG anti VHE pode persistir por longo período de tempo¹⁶. Este aspecto pode justificar uma aparente associação da seropositividade com idade mais avançada²⁴, embora também já haja evidência de que o IgG anti-VHE pode-se tornar indetectável 6-12 meses após infecção aguda^{20,21}. Nesta situação levanta-se a possibilidade de poder haver reinfecção após o desaparecimento deste anticorpo.

A relativa importância que a prevalência do anticorpo para o VHE tem nas diferentes latitudes pode reflectir não só a facilidade da transmissão fecal oral causada maioritariamente por contaminação fecal das águas fluviais sazonais, mas também a eventual importância da transmissão parentérica, já documentada e proposta por alguns autores^{3,25}. Esses achados, contribuem para um relativo desconhecimento de facto, dos factores de risco associados à positividade anti-VHE²⁴ e foram propostas duas relações estreitas entre a sua maior prevalência e os grupos etários mais avançados²⁶, e a associação com a infecção pelo VHC²⁴.

Embora geralmente considerada menos relevante em países conhecidos como pouco afectados por hepatites víricas em geral, alguns grupos de risco para a transmissão de hepatites víricas parecem ter, realmente, uma significativa maior prevalência do antiVHE²⁷. Por outro lado, a eventual facilidade de contágio pela viagem a zonas endémicas foi também recentemente contestada²⁸,

postulando-se ainda que a via interfamiliar de contágio, num contexto de circulação franca de agentes hepatotrópicos²⁴, possa ter muito impacto, sobretudo nos anos em que a infecção pelo VHE tenha maior importância epidemiológica.

No nosso estudo, embora numa amostra total de 153 sócios, observamos uma prevalência em hemodadores de 4% (na ordem de grandeza de valores descritos nos EUA, Alemanha, Barcelona, Bélgica²⁹ e Suíça²⁷), e nos doentes hepáticos de 6,8%.

Embora não atingindo significado estatístico, também foi possível observar nos sete doentes anti VHE positivos, uma média de idade (58 anos) superior à dos restantes 96 doentes, sendo a etiologia da doença hepática uniformemente distribuída pelo vírus C, B e álcool, sugerindo assim não serem nenhum destes factores maioritariamente associados ao VHE, ao contrário do que alguns autores têm sugerido^{24,29}.

Só um doente tinha vivido em área de risco (Venezuela), e nem ele nem os outros seropositivos para VHE tiveram antecedentes de icterícia associada a síndromes clínicas de hepatite aguda.

No entanto, podendo ser a hepatite E endémica, mesmo em países sem descrições de epidemia por hepatites NANB entérica, as viagens ao estrangeiro, para qualquer destino, podem ser factor de risco de aquisição desta infecção, que na nossa série teria sido sempre assintomática. A demonstração de que a infecção pode ser adquirida por outras vias que não por transmissão orofecal²⁵, pode justificar a inaparencia da fonte de contágio sobretudo se se confirmar a maior prevalência em hemodialisados³ e toxicod dependentes²⁹, em que os vírus hepatotrópicos são bastante mais comuns que na população em geral.

Sublinha-se no entanto que nenhuma das nove amostras positivas apresentou quociente de D.O. *cutoff* superior a 2,5, valor que habitualmente se considera mais seguro para afirmar real positividade. Na ausência de testes confirmatórios para a infecção pelo VHE, poder-se-á sempre questionar a eventual falsa positividade dum teste Elisa que use antigêneos recombinantes. Nas nossas amostras, a positividade associou-se a presença de cirrose, sem etiologia preferencial, em que a média de idades é mais elevada que no restante grupo. Os primeiros testes serológicos de hepatite C também mostraram pouca especificidade na presença de hipergamaglobulinemia, mas a prevalência que encontramos (4% nos dadores, 6,8% em doentes hepáticos) acompanha os valores que noutros países europeus têm sido publicados.

A reactividade para a IgG de HEV pelo teste Elisa actualmente disponível em 153 soros de portugueses, mostra uma prevalência sobreponível e outras séries. Não sendo prova inequívoca de que o vírus da hepatite E exista entre nós, e na presença de densidades ópticas baixas, reforça-se a necessidade de testar com ensaios de 2ª e 3ª geração a nossa população, e procurar o impacto real que este novo vírus hepatotrópico terá no nosso meio.

BIBLIOGRAFIA

1. REYES GR, PURDY MA, KIM JP et al: Isolation of CDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-39
2. KRAWCZYNSKI K, HEPATITIS E: *Hepatology* 1993; 17, 5: 932-941
3. HALFON PH, OUZAN D, CHANA M et al: High prevalence of Hepatitis E virus antibody in hemodialysis patients. *Lancet* 1994; 344: 746
4. BRADLEY D.W. HEPATITIS E: Epidemiology, etiology and molecular biology. *Rev. Med. Virology* 1992; 2: 19-28
5. MOSLEY JW, REEDER AG, FEINSTONE SM, PURCELL RH: Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. *N Eng J Med* 1977; 296: 75-78
6. KHUROO MS: Study of an epidemic non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post transfusion non-A-non-B type. *Am J Med* 1980; 68: 818-824
7. BALAYAN MS, ANDJAPARIDZE AG, SAVINSKAYA SS et al: Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20: 23-31
8. KANE MA, BRADLEY DW, SHRESTHA SM et al: Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 1984; 252: 3140-3145
9. BRADLEY D., ANDJAPARIDGE AG, COOK EH, et al: Etiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gen Virol* 1988; 69: 731-738
10. BRADLEY DW, BALAYAN MS: Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; I: 819
11. ARANKALLE VA, TICEHURST J, SCREENIVAN MA et al: Etiological association of a virus-like particles with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; I: 550-554
12. KOONIN EV, GORBALENYA AE, PURDY MA, ROZANOV MN, REYES GR, BRADLEY DW: Computer assisted of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of a new group of animal and plant positive-strand RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci: USA* 1992; 89: 8259-8267
13. YARBOUGH PO, TAM AW, FRY KE et al: Hepatitis E virus (HEV): identification of common virus epitopes. *J Virol* 1991; 65: 5790-7
14. DAWSON GL, CHAN KH, CABAL CM, YARBOUGH PO, REYES GR, MUSHAHUVAR IK: Solid phase enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Meth* 1992; 38: 175-86
15. TSAREV SA, TSAREVA TS, EMERSON SU et al: Elisa for antibody to HEV based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J Int Dis* 1993; 168: 369-78
16. KHUROO MS, KAMITI S, DAR MY, MOCCKLIJ R, JAMEEL S: Hepatitis E and long term antibody status. *Lancet* 1993; 341: 1355
17. TAM AW, SMITH M, GUERRA ME et al: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full length viral genome. *Virology* 1991; 185: 120-131
18. TSAREV TS, EMERSON SU, REYES GR et al: Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 559-63
19. RAY R, JAMEEL S, MANIVEL V, RAY R: Indian hepatitis E virus shows a major deletion in the small open reading frame. *Virology* 1992; 189: 359-62
20. LOK ASF, KWAN WK, MOECKTE R et al: Seroepidemiology survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. *Lancet* 1992; 340: 1205-8
21. GOLDSMITH R, YARBOUGH PO, REYES GR et al: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 1992; 339: 328-31
22. LIANG TJ, JEFFERS L, REDDY RK et al: Fulminant or subfulminant non-A, non-B viral hepatitis: the role of hepatitis C and E viruses. *Gastroenterology* 1992; 189: 359-362
23. PHAM BN, GRIGONIS V, DURAND F, BERNUAU J, UDIN L, BEZEAND A: Anti-HEV antibodies in acute hepatitis in France. *J Hepatology* 1994; 20: 679
24. PISANTI F, COPPOLA A, GALLI C: Association between hepatitis C and hepatitis E viruses in Southern Italy. *Lancet* 1994; 344: 746-747
25. PAWLOTSKY JM, DUVOUX C, UDIN L, DUVAL J, DHUMEAUX D: Presence of markers of hepatitis E virus infection in native European who never travelled out of their country of origin. VI International Symposium on viral hepatitis. Madrid, Feb. 3-5, 1994
26. THOMAS DL, MABLEY RW, BADUR S, PALAOGLN KE, QUINN TC: Epidemiology of hepatitis E virus infection in Turkey. *Lancet* 1993; 341: 1561-62
27. LAVANCHY D, MOUL B, FREI PC: Seroprevalence of hepatitis E virus in Switzerland. *Lancet* 1994; 344: 747-748
28. VANDENVELDE C, HEYVAERT F, MAES F, KADI L, OPSTELTEN R: Hepatitis E virus infection in Belgian soldiers. *Lancet* 1994; 344: 747
29. LOK A, SOLDEVILA-PICO C: Epidemiology and serologic diagnosis of hepatitis E *J Hepatol* 1994; 20: 567-569.