

Çeşitli Gruplarda ve Normal Popülasyonda E Hepatiti Seroprevalansı

Selim Badur¹, O.Şadi Yenen², Derya Yüksel¹, Nilgün H.İşık¹

Özet: Oral-fekal yoldan bulaşan, gelişmekte olan ülkelerde salgınlara yol açan, gelişmiş ülkelerde ise akut sporadik hepatitlerden sorumlu tutulan hepatit E virusu (HEV) infeksiyonlarının serolojik tanısı için son yıllarda çeşitli laboratuvar teknikleri geliştirilmiştir. Ülkemizde HEV infeksiyonlarının dağılımını araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada, farklı coğrafi bölgelerden toplanan 1580 sağlıklı kişiye ait serum örneği ile 1255 asker ve çeşitli gruplardan 397 olmak üzere toplam 3232 örnekte anti-HEV antikorları taranmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, normal popülasyonda % 5.3, akut ne A ne B hepatiti (NANBH) olgularında % 9.4, iki akut sporadik E hepatiti olgusunun yakın çevresinde ise % 11.3 oranında HEV sero-pozitivitesine rastlanmış, hemodiyaliz hastaları ve damar içi uyuşturucu kullananlarda ise antikor varlığına rastlanmamıştır. Bu bulgular her ne kadar beklediğimizin altında rastlanmış ise de NANBH etkenlerinden HCV'na oranla HEV infeksiyonunun ülkemizde daha yaygın olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Hepatit E virusu, sağlıklı bireyler.

Summary: Seroprevalence of hepatitis E virus in different groups and normal population. Laboratory methods for the diagnosis of hepatitis E virus (HEV) which is responsible of epidemic outbreaks in developing countries and sporadic cases in developed countries have been improved in recent years. In order to investigate the prevalence of HEV infection in our country a total of 3232 sera (1580 samples of healthy people from different geographic area, 1255 from soldiers and 397 from different groups) was screened for HEV antibodies. HEV positivity was detected as 5.3 % in normal population, 9.4 % in non A non B hepatitis cases and 11.3 % in the relatives of the two acute hepatitis cases. No antibody was found against HEV in hemodialysis patients and intravenous drug users. These results can be considered as low according to our estimation. But these findings show that HEV infection rate is more common than HCV infection in Turkey.

Key Words: Hepatitis E virus, healthy population.

Giriş

Epidemik ne A ne B hepatiti (NANBH) olarak tanımlanan ve oral-fekal yoldan bulaşan NANBH etkeni konusunda yapılan çalışmalar sonucunda virusun cDNA'sı elde edilerek, genomun nükleotid sekansları belirlenmiş ve böylece rekombinan antijenlerin elde edilmesi mümkün olmuştur (1). Bu ilerlemeleri takiben, gelişmekte olan ülkelerde salgınlara yol açan gelişmiş ülkelerde ise sporadik NANBH'lerinden sorumlu tutulan ve hepatit E virusu (HEV) şeklinde isimlendirilen etkene karşı oluşmuş anti-HEV antikorlarının incelenmesi amacıyla çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmada, ülkemizde sağlıklı normal popülasyonda ve bazı hasta gruplarında anti-HEV antikorları araştırılmıştır.

Yöntemler

Çalışmamızda, ülkemizin dört farklı bölgesini temsil eden kentlerden (İstanbul, Trabzon, Adana ve Aydın) toplanan ve sağlıklı normal popülasyonu temsil eden toplam 1580 serum örneğinin yanı sıra 1255 askerden alınan örnekte; 85 adet akut NANBH tanısı konmuş (anti-HAV-IgM, HBsAg, anti-HBc-IgM, anti-HCV, anti-CMV-IgM ve anti-EBV-VCA-IgM testleri negatif bulunan) olgu, ne A ne B ne C hepatiti (NANBNCH) salgını olarak değerlendirilen bir salgın sırasında toplanan 112 kişiye ait serum örneği; ayrıca akut sporadik E hepatiti tanısı konmuş iki bireyin yakın çevresi (n=62); 32 hemodiyaliz hastası; 30 damar içi uyuşturucu kullanan ve 41 akut A tipi viral hepatit olgusu (anti-HAV-IgM pozitif) anti-HEV antikorları yönünden incelenmiştir. Olası çapraz reaksiyonları belirlemek amacıyla A, B veya C hepatiti göstergeleri pozitif bulunan 35 hastanın serum örnekleri aynı deney koşullarında incelemeye alınmıştır. Yapılan çalışmada HEV'nun yapısal bölgesine ait iki farklı rekombinan antijen (ORF2 ve ORF3) ile kaplı bilyalar kullanılmış; üretici firmanın (Abbott Di-

agnostics) önerdiği yöntem uyarınca, antijen kaplı bilyalar ile inkübe edilen örneklerde anti-HEV antikorlarının varlığı, katı faza bağlanan immüno globulinlerin, peroksidaz işaretli anti-insan IgG'leri ve deneyin son aşamasında o-fenilendiamin (substrat) ilavesiyle gösterilmiştir. Deney sonuçları enzim-substrat etkileşimi sonucunda belirtilen renklenenim şiddeti 492 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiştir.

Sonuçlar

Yapılan incelemeler sonucunda, 1580 sağlıklı kişiye ait serum örneklerinin 84'ünde (% 5.3); 1255 askerin birinde (% 0.08); akut NANBH'li 85 olgunun 8'inde (% 9.4), NANBNCH salgınında saptanan 112 örneğin 13'ünde (% 11.6), akut sporadik E hepatiti tanısı konmuş iki olgunun yakın çevresindeki bireylerden toplam 62 örneğin 7'sinde (% 11.3); A tipi viral hepatit geçiren 41 hastadan birinde (% 2.4), anti-HEV antikorlarının varlığı saptanmıştır. Hemodiyaliz hastaları (n=32) ve damar içi uyuşturucu kullanan 35 bireyde ise seropozitiviteye rastlanmamıştır. Kontrol grubu olarak incelenen ve serolojik yöntemlerle A, B veya C hepatiti tanısı konmuş 35 hasta serumunda ise, yapılan incelemede anti-HEV pozitifliğine rastlanmamıştır. Elde edilen bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çeşitli Gruplarda Anti-HEV Taraması

	Sayı	Anti-HEV pozitif	
		n	(%)
Normal popülasyon	1580	84	(5.3)
Asker	1255	1	(0.08)
NANBNCH salgını	112	13	(11.6)
Akut NANBNCH	85	8	(9.4)
İki E hepatiti olgusunun aile çevresi	62	7	(11.3)
Hemodiyaliz hastası	32	0	-
Damar içi uyuşturucu kullanımı	30	0	-
A/B/C hepatiti	35	0	-
Akut AVH	41	1	(2.4)

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul

(2) GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Tablo 2. İncelenen 1580 Sağlıklı Kişinin Yaş Gruplarına Göre Dağılımları ve Seropozitiflik Oranları

Yaş grubu	Sayı	Anti-HEV-pozitif
14	240	0
15-20	105	0
21-25	464	19 (% 4.1)
26-35	308	29 (% 9.4)
36-45	141	9 (% 6.4)
46-55	161	14 (% 8.7)
56-65	116	8 (% 6.7)
66-75	45	5 (% 11.1)
Toplam	1580	84

Anti-HEV antikorlarının incelendiği 1580 sağlıklı bireyin yaş gruplarına göre dağılımları ve bu gruplarda saptanan seropozitiflik ise, Tablo 2'de gösterilmiştir.

İrdeleme

Günümüzde, epidemik NANBH'lerine (ENANBH) yol açan etken, HEV olarak isimlendirilmekte olup, bu tip epidemilerin öyküsü 1955'li yıllara uzanmaktadır. Tıp kayıtlarına geçen ve yıllar sonra sorumlu etkenin HEV olduğu anlaşılan bu özellikteki ilk salgın, belirtilen tarihte Hindistan'da meydana gelmiştir. İlk ENANBH salgını olarak kabul edilen bu tablonun benzerleri, sonraki yıllarda Nepal, Burma, Endonezya, Tayland, Cezayir, Etiyopya, Sudan, Somali ve Meksika gibi çeşitli ülkelerden bildirilmiştir (2); ayrıca aynı etkenin sorumlu olduğu ileri sürülen sporadik bulgular belirlenmiştir (3).

ENANBH tablosuna yol açan etken virusun belirlenmesi çalışmalarına 1980'li yıllarda başlanmıştır. Bu amaçla yapılan deneylerde, akut dönemde alınan hasta dışkılarından virus partikülleri incelenmiş ve ilk kez 1983 yılında Balayan ve arkadaşları (4) bu tip partikülleri oral yoldan verdiği gönüllülerde, 28-45 gün sonra enfeksiyonun geliştiğini ve immün elektron mikroskopisi (IEM) ile 27-30 nm'lik viral partiküllere karşı antikorların oluştuğunu belirlemiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar, etkenin fizikokimyasal özellikleri konusunda yoğunlaşmış ve virusun, kılıfsız, dış etkenlere duyarlı, 183 S çökme sabitesine sahip, 1.29 d yoğunluğunda, 8500 nükleotidlik genoma sahip bir RNA virusu olup; yuvarlak, yüzeyinde çıkıntılar taşıyan bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (3,5). Hücre kültürlerinde üretilemeyen HEV'nun biyofiziksel özellikleri kalisivirüslerin çeşitli özelliklerini andırmaktadır. HEV enfeksiyonlarının klinik özelliklerine bakıldığında, inkübasyon süresinin 15-40 gün arasında değiştiği, kronikleşmenin söz konusu olmadığı, özellikle gebelerde fulminan hepatite yol açtığı saptanmıştır (6,7).

Son yıllarda çalışmalar hayvan deneyleri ve moleküler biyoloji konularında yoğunlaşmış (6,8) ve bazı hayvan türlerinde HEV'nun seri pasajlarının yapılabilirdiği gösterilmiştir (9). Krawczynski (10) deneysel olarak infekte ettiği makak maymunlarının hepatositlerinin sitoplazmalarında HEV antijenini immünofluoresans yöntemi ile göstermiştir. Anti-HEV antikorlarının gösterilmesi amacıyla, IEM tekniği ve "immünofluoresans blokajı" yöntemini kullanan bazı araştırma grupları ise, infekte ettikleri deney hayvanlarının karaciğer kesitlerini antijen kaynağı olarak kullanmışlar ve olumlu sonuçlar almışlardır (11). Bu şekilde araştırılan anti-HEV antikorları, olguların % 77-100'ünde gösterilmekte, ayrıca farklı coğrafi bölgelerden sağlanan hasta serumlarında pozitif sonuç alınması, ENANBH olgularından aynı virusun ya da ortak antijenik özellik taşıyan bir virus grubunun sorumlu olduğunu göstermektedir (10). Ancak IEM tekniğinin geniş taramalar için elverişli bir yöntem olmaması, araştırmacıları ELISA gibi pratik tanı tekniklerinin geliştirilmesine itmiştir. Bu arada HEV'nun moleküler klonlanması çalışmaları başarılı sonuçlar vermiş (1), elde edilen

cDNA'lar ile yapılan hibridizasyon testleri, virusa özgü ilk klon olan Et1.1'in belirlenmesini sağlamıştır. Sonuçta, çeşitli suşların ortak epidemik bölgelerine tekabül eden rekombinan antijenlerin hazırlanması ile serolojik çalışmalar başlamış ve rekombinan C2 proteininin kullanıldığı Western-blot (WB) tekniği ile anti-HEV antikorları araştırılmıştır. Bu çalışmalarında, Favorov ve arkadaşları (12), akut NANBH olgularının % 93'ünde spesifik IgG antikorlarını; % 73'ünde ise IgM'leri belirlemişler ve IgG'leri ortalama 12 ay, IgM'leri ise iki ay süre ile saptayabildiklerini bildirmişlerdir. İlk olarak 4 farklı rekombinan antijen kullanımı ile gerçekleştirilen ELISA testi ile, Mısır'da yapılan bir taramada akut NANBH tanısı ile incelemeye alınan 36 çocuğun 15'inde (% 41.7) IgG sınıfından, incelenen 15 çocuğun altısında ise (% 40) IgM sınıfından spesifik antikorların varlığı saptanmıştır; bu çalışmada kontrol grubunda ele alınan örneklerde IgM antikorlarına rastlanmamış, ancak % 25 oranında IgG antikorları belirlenmiştir (13). Bu bulgulara benzer biçimde, Sudan'da pediyatrik akut hepatit olgularında HEV'nun önemli rol oynadığı saptanmıştır (14). Ancak Hong Kong'da yapılan bir çalışmada ise 20 yaşın üzerindeki sağlıklı popülasyonda % 24 olarak belirlenen seropozitiflik oranı, 20 yaş altında % 4 olarak saptanmıştır (15). Bizim çalışmamızda da hem normal popülasyonu temsil eden grupta hem de tamamı ve ortalama 20 yaş kesimini temsil eden asker popülasyonunda seropozitifliğe rastlanmamıştır.

Çeşitli ülkelerde yapılan ve normal popülasyonu hedef alan çalışmalara bakıldığında, Hollanda'da % 1.1-1.8 (16,17); ABD'de % 3.4; Almanya'da % 0; Singapur'da % 3.4; Sudan'da % 4.8; Hong Kong'da ise % 16.1 oranında anti-HEV seropozitifliği bildirilmiştir (18). Ülkemizde Gaziantep'te saptanan iki olgu dışında (19) henüz serolojik olarak kanıtlanmış HEV enfeksiyonlarına ait herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Konu ile ilgili tek çalışma, 1986 yılında Doğanç ve arkadaşları (20)'nin Ankara'da bir askeri okulda, ortak kullanılan sudan kaynaklı 29 olguya ait epidemik NANBH salgını ile ilgili bulgulardır. Çalışmamızda ise sivil kesimden ve farklı bölgelerden toplanan 1580 örnekte % 5.3, 1255 askerde ise % 0.08 oranında antikor varlığı saptanmıştır. Fransa'da yaşayan göçmen işçiler arasında yapılan bir taramada hamile Türk kadınlarında % 7.7 oranında bir pozitiflik bildirilmiştir (21).

Goldsmith ve arkadaşları (13) çalışmasında takibe alınan hastaların bir bölümünde, başlangıçta saptanan IgG antikorlarının ortalama altı ay sonunda kaybolduğu gözlenerek, uzun süre kalıcı olmadıkları sonucuna varılmıştır. Buna karşılık Dawson ve arkadaşları (22,23) Pakistan'da yaptıkları incelemede, en azından bazı olgularda spesifik IgG kalıcılığının uzun sürdüğünü; Zaaier ve arkadaşları (16) ise takip ettikleri bazı hastalarda antikor titresinin altı ay yüksek kalmasına rağmen, bazılarında ikinci ay sonunda seronegatifliğin ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Spesifik antikorların kalıcılığına ait bir çalışmada HAV antikorlarına oranla HEV antikorlarının, enfeksiyonu takiben çok daha erken kayboldukları bildirilmiştir (15).

Bulaşma yolları, ülkemizde yaygın olarak bulunan HAV'na benzemesi nedeniyle (24), sıklıkla rastlanacağını düşündüğümüz HEV enfeksiyonlarının dağılımını incelemek amacı ile bu çalışma yapılmıştır. Elde edilen bulgular, HAV enfeksiyonlarına oranla, E tipi hepatitin, beklediğimizin aksine, ülkemizde çok yaygın olduğunu göstermektedir. Nitekim Thomas ve arkadaşları (25) ülkemizde anti-HEV taraması yaptıkları 1350 örnekte % 5.9 oranında pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Ancak, kullanılan ELISA kitinin birinci jenerasyon testlerden olması ve duyarlılığın henüz tam olarak belirlenmemiş olması, bu konudaki çalışmalar tamamlanana dek, ülkemiz için kesin insidans oranlarının verilmesini engellemektedir. Ayrıca, yukarıda belirtilen ve anti-HEV antikorlarının WB ve ELISA yöntemleri ile incelendiği çalışmalarda bildirildiği kadarıyla, kullanılan rekombinan antijenler ile saptanan antikorların uzun süre kalıcı olmaması, çalışmamızda normal po-

pülasyon için elde ettiğimiz düşük pozitiflik oranının bir diğer nedeni olabilir.

NANBNCH olgularında anti-HEV pozitifliği, bu çalışmada % 11.6 oranında saptanmıştır. Wang ve arkadaşları (26) ise Almanya'da inceledikleri olgularda bu oranı % 12 olarak bildirmektedir. Aynı çalışmada A, B, C tipi viral hepatit geçirenlerin % 7'sinde; kan transfüzyonu almış olanların % 37'sinde anti-HEV pozitifliğine rastlandığı ve HEV'nun parenteral yoldan bulaşabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca HEV-RNA'sının PCR ile kanda gösterilmesi, virusun kan yolu ile de bulaşabileceğini düşündürmektedir (27). Ancak bizim çalışmamızda, hemodiyaliz hastaları ve damar içi uyuşturucu kullananlarda, ayrıca A, B ve C tipi viral hepatit geçirenlerde seropozitifliğe rastlanmamıştır.

Hong Kong'da yapılan bir çalışmada akut A tipi viral hepatit geçirenlerin % 6'sında anti-HEV pozitifliği saptanmıştır (15). Bizim incelediğimiz anti-HAV-IgM-pozitif 41 erişkin hastanın birinde (% 2.4) HEV antikoru saptanmıştır.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular, HEV seropozitifliğine her ne kadar beklediğimiz altında rastlanmış olsak da, NANBH etkenlerinden HCV'na oranla HEV infeksiyonlarının, ülkemizde daha yaygın olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

1. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-9
2. Ramalingaswami V, Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; 1: 571-3
3. Zuckerman AJ. Hepatitis E virus. The main cause of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med J* 1990; 300: 1475-6
4. 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
5. Bradley DW, Beach MJ, Purdy MA. Recent developments in the molecular cloning and characterization of hepatitis C and E viruses. *Microb Pathogenesis* 1992; 12: 391-8
6. Bradley DW, Krawczynski K, Cook EH, et al. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease associated 27 to 34 nm. virus like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6277-81
7. Dienstag JL, Katkov WN, Cody H. Evidence for non-A, non-B hepatitis agents besides hepatitis C virus. In: Hollinger FB, Lemon SH, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 349-56
8. Panda SK, Datta R, Kaur J, Zckerman AJ, Nayak NC. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Recovery of virus-like particles from an epidemic in South Delhi and transmission studies in Rhesus monkeys. *Hepatology* 1989; 10: 466-72
9. Sharma MD, Maillard P, Vratsi S, et al. Serial passage of West European sporadic non-A, non-B hepatitis in Rhesus monkeys by inoculation with fecal extracts. *J Med Virol* 1990; 30: 36
10. Krawczynski K. Antigens and antibodies of hepatitis E virus infection in experimental primate models and man. In: Hollinger FB, Lemon SH, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 517-21
11. Krawczynski K, Bradley DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Identification of virus associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis* 1989; 159: 1042-7
12. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 1992; 36: 246-50
13. Goldsmith R, Yarbough PO, Fry KE, et al. Acute sporadic hepatitis E infections in Egyptian children diagnosed by IgM and IgG serologic tests. *Lancet* 1992; 339: 328-31
14. Hyams KC, Purdy MA, Kaur M, et al. Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children. Analyses based on a new western blot assay. *J Infect Dis* 1992; 165: 1001-5
15. Lok ASF, Kwan W-K, Moeckli R, et al. Reepidemiological survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. *Lancet* 1992; 340: 1205-8
16. Zaaijer HL, Yin MF, Lellie PN. Seroprevalence of hepatitis E in the Netherlands. *Lancet* 1992; 340: 681
17. Zaaijer HL, Kok M, Lellie PN, Timmerman RJ, Chau K, van Der Pal HJH. Hepatitis E in the Netherlands. Imported and endemic. *Lancet* 1993; 341: 826
18. Yarbough PO, Tam AW, Gabor K, et al. Assay development of diagnostic tests for hepatitis E. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer, 1994: 367-70
19. Sürmatel F, Badur S, Baydar İ, Yenen OŞ, Yüksel D. İki sporadik E hepatiti vakası. *Türk Klin Gastroenterol* 1994; 5: 273-5
20. Doğanç I, Hacıbektaşoğlu A, Yenen OŞ, et al. Güvercinlik Bölgesi'nde saptanan su kaynaklı bir non-A, non-B hepatitis epidemisi. *GA-TA Bil* 1989; 31: 141-9
21. Ranger-Rogez S, Denis F, Udinh L. Seroprevalence of hepatitis E among pregnant foreign residents in France. *Lancet* 1993; 342: 998-9
22. Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM, et al. 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: 175-186
23. Dawson G, Mushahwar IK, Chan KH, Gitnick GL. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet* 1992; 340: 426-7
24. Babacan F, Över U. A hepatiti. In: Kılıçturgay K, ed. *Viral Hepatit '94*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 1994: 39-63
25. Thomas DL, Mahley RW, Badur S, et al. Epidemiology of hepatitis E virus infection in Turkey. *Lancet* 1993; 341: 1516-2
26. Wang CH, Flehming B, Moeckli R. Transmission of hepatitis E virus by transfusion. *Lancet* 1993; 341: 825
27. Chauhan A, Jameel S, Dilavari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 341: 149-50