

Het hepatitis E-virus bij het varken: een zoönose ?

A.B. Cay

Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie (CODA),
Groeselenberg 99, 1180 Brussel, België

Ancai@var.fgov.be

SAMENVATTING

Het hepatitis E-virus (HEV) is een opduikend pathogeen dat behoort tot een nieuwe familie van RNA-virussen, de *Hepeviridae*. Deze familie bestaat momenteel uit 4 erkende genotypes waarvan sommige niet alleen mensen maar ook dieren kunnen infecteren. Genotype 1 en 2 worden tot op heden enkel bij mensen aangetroffen en dit hoofdzakelijk in ontwikkelingslanden. Ze liggen aan de oorsprong van een aantal grote uitbraken en epidemieën in het verleden en worden voornamelijk overgedragen door fecaal besmet drinkwater. Genotype 3 en 4 daarentegen kunnen naast mensen ook varkens en andere diersoorten infecteren en zijn verantwoordelijk voor geïsoleerde uitbraken van hepatitis E in zowel ontwikkelingslanden als geïndustrialiseerde landen. Hepatitis E-infecties kunnen subklinisch voorkomen maar kunnen zich ook in de vorm van zeldzame acute uitbraken voordoen. Daarbij kan het sterftcijfer bij zwangere vrouwen oplopen tot meer dan 20% voor zowel moeder als kind. Over het aantal menselijke HEV-infecties in België zijn er tot op heden geen gegevens beschikbaar. In Nederland worden er de laatste jaren ongeveer 10 autochtone HEV-infecties per jaar gediagnosticeerd terwijl er in Frankrijk een opvallende stijging van het aantal HEV-infecties waargenomen wordt. De recente identificatie en karakterisering van HEV-stammen uit varkens, vogels en andere diersoorten en het aantonen van serologische kruisreacties van deze antigenisch verwante HEV-stammen met het HEV van de mens deden vermoeden dat hepatitis E een zoönose is. Door de hoge prevalentie van HEV bij varkens werd het varken verdacht een mogelijk reservoir te zijn voor HEV-infecties bij de mens. Stalen van dierlijke oorsprong werden tot op heden nog niet in een Belgisch labo onderzocht met als gevolg dat epidemiologische gegevens over de prevalentie van HEV in de Belgische varkensbedrijven op dit moment onbestaande zijn. In Nederland toonde een epidemiologische studie aan dat bij 55% van de onderzochte bedrijven HEV-RNA aanwezig was in meststalen, resultaten die ook in andere Europese landen bevestigd werden.

Maar het varken blijkt niet de enige reservoir te zijn en bijkomend onderzoek is nodig om andere potentiële reservoirs voor HEV te identificeren. Met de huidige kennis over hepatitis E-infecties volstaat een aantal preventieve maatregelen om het risico op een zoönotische overdracht door besmet voedsel maximaal te beperken. Gezien echter tot op heden niet alle mogelijke bronnen van HEV-infectie met genotype 3 en 4 bekend zijn, is waakzaamheid geboden, vooral in het geval van zwangerschap.

INLEIDING

Hepatitis E is een belangrijk wereldgezondheidsprobleem, niet alleen in talrijke ontwikkelingslanden in Azië en Afrika maar ook in vele geïndustrialiseerde gebieden van de Verenigde Staten (VS) en in talrijke Europese landen blijkt de ziekte endemisch te zijn (Meng, 2008). Hoewel de sterftegraad bij hepatitis E gemiddeld kleiner is dan 1%, kan hij tot 20% bedragen bij zwangere vrouwen (Emerson and Purcell, 2007). De ziekte wordt veroorzaakt door het hepatitis E-virus en wordt vooral verspreid via fecale en orale weg door besmet drinkwater en voedsel. In ontwikkelingslanden was HEV in het verleden verantwoordelijk voor een aantal epidemieën die veroorzaakt werden door fecaal besmet drinkwater (Panda *et al.*, 2007). In de geïndustrialiseerde landen veroorzaakt HEV geïsoleerde gevallen van acute hepatitis die meestal in verband gebracht worden met een reis naar een endemisch ontwikkelingsland. Maar de laatste jaren worden er steeds

meer gevallen van acute hepatitis E gesignaleerd bij patiënten zonder gekende epidemiologische risicofactor (Clemente-Cesares *et al.*, 2003).

Door het ontdekken van HEV-stammen bij varkens (Meng *et al.*, 1997), vogels (Haqshenas *et al.*, 2001) en herten (Tei *et al.*, 2003) en door het aantonen van anti-HEV-antistoffen bij verschillende diersoorten rezen er steeds meer vragen over de impact van HEV als mogelijk zoönotisch agens. Van al deze diersoorten wordt HEV het meest bij het varken aangetroffen, met prevalenties hoger dan 50% (Meng *et al.*, 1999; Rutjes *et al.*, 2007). Omdat HEV-stammen bij varkens en mensen genetisch zeer verwant zijn, werd er meermaals gesuggereerd dat het varken een potentieel reservoir is voor een mogelijke zoönotische overdracht en dat hepatitis E zoönotisch is in landen waar het niet endemisch is (Mizuo *et al.*, 2002).

Het doel van dit artikel is om via een literatuurstudie na te gaan of het varken een potentieel risico vormt voor een mogelijke zoönose van hepatitis E en of er

mogelijk ook andere diersoorten belangrijk zijn als bron van infectie bij de mens. De kennis die tot op heden daaromtrent is verworven, betreft voornamelijk het HEV bij de mens. Daarom werden bepaalde aspecten van het HEV bij de mens in deze literatuurstudie opgenomen.

HET VIRUS

Classificatie

Toen het virus voor het eerst werd geïdentificeerd als etiologisch agens van niet-A, niet-B hepatitis werd gesuggereerd het virus te benoemen als "heparnavirus" en het te groeperen in de familie van de *Picornaviridae* (Balayan *et al.*, 1983). Jaren later analyseerden Tam *et al.* (1991) het genoom van HEV en kwam tot de conclusie dat het bestond uit 3 "open reading frames" (ORF) waarbij de niet-structurele proteïnen gelokaliseerd waren op het 5' einde terwijl de structurele proteïnen bij het 3' einde gelegen waren. Door deze en de morfologische gelijkenissen met het Norwalkvirus (een calicivirus) werd het HEV bij de calicivirussen geklasseerd. Maar die classificatie bleek al snel controversieel. Een vergelijking van de aminozuursequentie van het RNA-dependente RNA-polymerase van HEV met die van andere positiefstrengige RNA-virussen toonde aan dat HEV zich groepeerde met het rubellavirus en een plant furovirus en zo samen een groep vormde, de zogenaamde "alpha-like virussen" (Koonin *et al.*, 1992). Uitgebreidere sequentieanalyses van de RNA-polymerasen en helicasen van HEV en andere positiefstrengige RNA-virussen bevestigden dat HEV fylogenetisch geen deel uitmaakte van de *Caliciviridae* (Berke *et al.*, 2000). Deze en nog andere resultaten lagen aan de grondslag voor de herclassificatie binnen de *Caliciviridae* en verantwoordde de vraag om HEV uit deze familie te verwijderen (Berke T., 2000). Tenslotte werd het HEV-geherklasseerd als het enige lid van het genus *Hepevirus* in de nieuwe *Hepeviridae*-familie (Emerson *et al.*, 2004).

Viruseigenschappen

HEV is een icosahedraal, sferisch partikel zonder enveloppe met een diameter van ongeveer 27-34 nm met een onduidelijke oppervlaktestructuur. Het HEV-virion is gevoelig voor jodiumhoudende desinfectantia (Purcell and Emerson, 2001). Emerson *et al.* (2005) toonden aan dat HEV voor 50% geïnactiveerd wordt na 1 uur bij 56°C en bij 60°C bijna volledig (96%). Tijdens het experiment bleek er wel een klein verschil merkbaar in temperatuurrestantie tussen de verschillende geteste stammen. Feagans *et al.* (2008) toonden aan dat het HEV aanwezig in commerciële varkenslevers volledig geïnactiveerd wordt wanneer de levers op voldoende hoge temperatuur bereid worden (5 minuten koken of frituren). De incubatie van homogenaten van deze levers gedurende 1 uur op 56°C bleek echter onvoldoende om de infectiviteit te vernietigen. Er wordt aangenomen dat HEV resistent is tegen inactivatie in

de zure of zwak alkalische omgeving van het darmstelsel waardoor fecaal-orale overdracht mogelijk is (Purcell and Emerson, 2001).

Genoomorganisatie

Het genoom van HEV bestaat uit 3 ORF's die elkaar overlappen. ORF1 codeert voor meerdere proteïnen maar slechts voor een aantal van hen zijn hun functies aangetoond: een methyltransferase, een guanylyltransferase en een RNA-afhankelijk RNA-polymerase (Koonin *et al.*, 1992, Huang *et al.*, 2007). Gebaseerd op computervoorspellingen en overeenkomsten met andere virussen zou ORF1 ook coderen voor een protease en een helicase (Huang *et al.*, 2007) maar deze activiteit werd tot op heden niet aangetoond. ORF2 en ORF3 coderen voor de kapside proteïne en een proteïne waarvan de functie nog niet geheel duidelijk is (Tam *et al.*, 1991; Surjit *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006). De ORF3-proteïne is niet noodzakelijk voor virusvermeerdering noch voor virusassemblage of infectie van hepatocellen *in vitro* (Emerson *et al.*, 2006).

Genoomheterogeniteit

Op basis van de genomanalyse van HEV werden 4 genotypes geïdentificeerd (Schlauder *et al.*, 2001). Genotype 1 wordt aangetroffen in Azië en Noord-Afrika, genotype 2 wordt hoofdzakelijk aangetroffen in Mexico en Zuid-Afrika, genotype 3 wordt aangetroffen bij geïsoleerde gevallen zowel in geïndustrialiseerde landen (Noord-Amerika, Europa) als in ontwikkelingslanden, bij mensen maar ook bij varkens (de Deus *et al.*, 2008) en reeën (Reuter *et al.*, 2009). Tenslotte is er genotype 4 dat werd gevonden bij geïsoleerde uitbraken in Azië, zowel bij mensen als bij varkens (Meng *et al.*, 1998, Schauder *et al.*, 2001, Lu *et al.*, 2006, Lorenzo *et al.*, 2007, Okamoto 2007).

Recentelijk werden er ook HEV-stammen uit vogels geïsoleerd (Haqshenas *et al.*, 2001, Billam *et al.* 2007) maar het is nog niet duidelijk of het om een nieuw subtype gaat of een nieuw genus. Het aviaire HEV heeft een genoom van 6,6 kb en is maar voor 50% homoloog aan het zoogdier HEV op het gebied van nucleotide sequenties.

Bijkomende fylogenetische analyses met nieuwe aviaire HEV-stammen zijn nodig om te bepalen of het aviaire HEV als een apart genus kan geklasseerd worden (Peralta *et al.*, 2009).

HEV-genotype 1 is tamelijk geconserveerd en kan onderverdeeld worden in 5 subtypes (1a tot 1e). Bij genotype 2 vindt men 2 subtypes, 2a en 2b. Genotype 3 en 4 zijn zeer verschillend en worden onderverdeeld in respectievelijk 10 en 7 subtypes (Lu *et al.*, 2006).

Ondanks de grote verscheidenheid van genotypes is er maar 1 serotype van HEV (Purcell, 1994, Lu *et al.*, 2006).

Om het genotype van een HEV-stam te bepalen, kunnen fylogenetische analyses uitgevoerd worden van het volledige genoom maar ook van een 371 bp-regio binnen ORF1 (Schlauder *et al.* 1998, Zanetti *et al.*,

Tabel 1. Overzicht van de verschillende HEV-genotypes, hun natuurlijke gastheer en het geografisch verspreidingsgebied.

Genotype	Gastheer	Geografisch verspreidingsgebied	Niveau endemiciteit (bij de mens)
1	Mens	Azië, Noord-Afrika	Edemisch
2	Mens	Mexico, zuidelijk Afrika	Edemisch
3	Mens, varken, ree	Azië, Zuid-Amerika, Noord-Amerika, Europa	Sporadisch
4	Mens en varken	Azië	Sporadisch

1999, Erker *et al.*, 1999, Worm *et al.*, 2000, Schlauder and Mushahwer, 2001). Zai *et al.* (2006) vonden de RNA-afhankelijke RNA-polymerase binnen ORF1 de meeste geschikte regio voor fylogeneses terwijl Lu *et al.* (2006) dan weer aantoonde dat de ORF2 de meest geschikte regio was voor een zo accuraat mogelijke genotypering en subtypering. Recentelijk bevestigden Legrand-Abravanel *et al.* (2009) dat beide regio's gebruikt kunnen worden voor genotypering en subtypering.

Begin mei 2009 waren er al 5872 gedeeltelijke of volledige sequenties van HEV beschikbaar op GenBank, waarvan 3740 humane HEV-stammen en 710 HEV-stammen afkomstig van varkens.

In Tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de verschillende HEV genotypes, hun natuurlijke gastheer en het geografisch verspreidingsgebied.

EPIDEMIOLOGIE

Epidemiologie van HEV bij de mens

Hepatitis E werd tot de jaren '90 van de vorige eeuw beschouwd als een endemische ziekte in tropische en subtropische gebieden. In deze endemische gebieden was HEV verantwoordelijk voor grote epidemieën maar ook voor geïsoleerde acute uitbraken. Een groot aantal epidemieën veroorzaakt door besmet water werd gerapporteerd in Zuidoost- en Centraal Azië (India, Nepal), in Afrika en Noord-Amerika (Mexico) (Mushahwar *et al.*, (1993), Bile *et al.*, (1994), Panda *et al.*, (2007)). Tijdens deze epidemieën bedroeg het aantal infecties met dodelijke afloop tussen de 0,2% en 4% en werden significante hoge aantallen van 10% tot 20% van fulminante leverinsufficiëntie vastgesteld bij zwangere vrouwen.

Tot in het begin van de jaren '90 van de vorige eeuw werden de geïsoleerde HEV-infecties in de meeste geïndustrialiseerde landen toegeschreven aan geïmporteerd virus van inwoners die naar een HEV-endemisch gebied gereisd hadden (De Cock *et al.*, 1987; Jardi *et al.* 1993; Zaaier *et al.*, 1993). Hoe dan ook, een autochtoon geval van hepatitis E werd gerapporteerd in de VS en de virusstam uit dit hepatitis E-geval bleek genetisch verschillend te zijn van de andere, tot dan toe gekarakteriseerde humane isolaten. (Kwo *et al.*, 1997; Schlauder *et al.*, 1998). Een tweede isolaat uit de VS werd kort nadien gekarakteriseerd (Schlauder *et al.*, 1998) en al snel werden er ook in tal van andere geïndustrialiseerde landen HEV-isolaten geïdentificeerd die inheems bleken te zijn, waaronder Frankrijk (Mansuy *et al.*, 2004, Legrand-Albravanel *et al.*, 2009), Spanje (Buti *et al.*, 2004), Duitsland (Preiss *et al.*, 2006) en het Verenigd Koninkrijk (Wang *et al.*, 2001; Sadler *et al.*, 2006; Dalton *et al.*, 2007a). In Nederland werd het eerste autochtone geval beschreven in 2003 en worden er ongeveer 10 nieuwe gevallen per jaar gediagnosticeerd (Rutjes *et al.*, 2009). Tenslotte is er de laatste jaren in Frankrijk een opvallende stijging van het aantal HEV-infecties: van 46 gevallen in de periode 2002-2004 naar 369 tussen 2006-2008. Van de 369 HEV-uitbraken waren er minstens 264 autochtoon.

Vroegere analyses van serumstalen afkomstig van bloedgevers uit verschillende landen, zoals de VS, het Verenigd Koninkrijk, Frankrijk, Duitsland, Spanje en Japan bevestigden de aanwezigheid van anti-HEV IgG in 1,1% tot 2,2% van de onderzochte stalen (Dawson *et al.*, 1992). Recente data verkregen met gevoeligere serologische testen vertoonden een hogere prevalentie: 4% in Nieuw-Zeeland (Dalton *et al.*, 2007b), 2,8% in Spanje (Matos *et al.*, 1998), 3,2% in Frankrijk (Boutrouille *et al.*, 2007), 2,0% in Nederland (Bouwknegt *et al.*, 2007) en 2,6%-3,9% in Japan (Fukuda *et al.*, 2004; Got *et al.*, 2006). De prevalentie van IgG anti-HEV is in sommige endemische landen zeer hoog, zoals in Egypte waar meer dan 70% van de bevolking positief is (Stoszek *et al.*, 2006) en in China waar de prevalentie 43% bedraagt (Li *et al.*, 2006). Een relatief hoge prevalentie werd ook waargenomen in enkele geïndustrialiseerde landen: in 8 staten van de VS werd gemiddeld 18% van de bloedgevers positief bevonden voor IgG anti-HEV met een uitschieter van 36% in Indiana (Drobeniuc *et al.*, 2001, Meng *et al.*, 2002). De oorzaak van deze onverwacht hoge seroprevalentie in geïndustrialiseerde landen, waarvan men dacht dat de infectie niet-endemisch was, is in grote mate onbekend maar zoönotische transmissie door diercontact of het eten van besmet voedsel wordt niet uitgesloten.

Overdracht van HEV

Veel epidemieën werden veroorzaakt door fecaal gecontamineerd drinkwater en bijgevolg is de fecale-orale overdracht de belangrijkste. Een aantal geïsoleerde gevallen van acute hepatitis E in endemische gebieden kon in verband worden gebracht met de consumptie van besmette schaaldieren (Careda *et al.*,

1985) of vlees (zie verder). De overdracht van een besmet persoon naar een contactpersoon werd beschreven maar zou uitzonderlijk zijn (Cao *et al.*, 1991, El-Zimaity *et al.*, 1993). De overdracht van HEV via besmet bloed werd meerdere malen gerapporteerd (Arankalle and Chobe, 2000, Matsubayashi *et al.*, 2004, Mitsui *et al.*, 2004, Abe *et al.*, 2006, Boxall *et al.* 2006., Irshad *et al.*, 2006) en ook de transmissie van moeder naar kind via intra-uteriene en perinatale weg werd beschreven (Khuroo *et al.*, 1995, Irshad, 1995., Kumar *et al.*, 2001, 2004., Singh *et al.*, 2003). Maar bij de meeste van de geïsoleerde uitbraken van hepatitis E in geïndustrialiseerde landen kon de oorzaak niet geïdentificeerd worden.

Epidemiologie van HEV bij dieren

Varkens waren de eerste diersoort waaruit HEV-stammen werden geïsoleerd. Balayan *et al.* (1990) maakten als eersten melding van een experimentele infectie bij varkens met een menselijke HEV-stam. Antistoffen tegen HEV en het HEV RNA bij varkens werden gerapporteerd in Nepal (Clayson *et al.*, 1995) maar het virus werd niet gekarakteriseerd. In 1997 isoleerden en karakteriseerden Meng *et al.* de eerste HEV-stam bij varkens. Sindsdien verschenen er meerdere studies waarin de aanwezigheid van het virus bij varkens werd aangetoond. In Spanje konden Pina *et al.* (2000) HEV RNA aantonen in het afvalwater van varkensslachthuizen, wat er volgens de auteurs zou opwijzen dat het HEV RNA waarschijnlijk van varkens afkomstig was. De auteurs hebben echter niet het water van het slachthuis getest op een mogelijke contaminatie met HEV RNA, waardoor deze mogelijkheid niet mag uitgesloten worden. In Nederland was 22% van de geteste meststalen positief voor HEV RNA (van der Poel *et al.*, 2001). In Mexico werd 80% van de varkens tussen 2 en 4 maanden serologisch positief bevonden (Cooper *et al.*, 2005). Bijkomende onderzoeken binnen deze groep toonden aan dat bij 6% van deze serologisch positieve dieren HEV RNA aanwezig was, terwijl 31% van de onderzochte meststalen positief bleek te zijn.

Niet alleen bij varkens maar ook bij everzwijnen werden er HEV-infecties aangetoond. De Deus *et al.* (2008) testten 150 wilde varkens en kregen een seroprevalentie van 42,7% terwijl 19,6% van de geteste dieren positief was voor HEV RNA. Kaci *et al.* (2008) testten 189 serumstalen afkomstig van everzwijnen die in 1995/1996 verzameld werden voor een serologische bewaking in Noord-Duitsland en vonden bij 5,3% van de stalen hepatitis E virus RNA. In Italië werd 25% van de onderzochte everzwijnen positief bevonden voor HEV RNA. Een fylogenetische analyse van 10 van deze positieve stalen duidde aan dat er maar 1 HEV-stam circuleerde onder de geteste everzwijnen en dat deze stam dichter aanleunde bij de Europese HEV-stammen geïsoleerd uit mensen en varkens dan bij de Japanse everzwijnenstam (Martelli *et al.*, 2008).

Niet alleen bij varkens en everzwijnen maar ook bij andere diersoorten werden er antistoffen tegen HEV

aangetroffen. Ze werden gevonden bij ratten en muizen (Favorov *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002, Vitral *et al.*, 2005)), runderen (Goens *et al.*, 2003), katten (Okamoto *et al.*, 2004), honden (Vital *et al.*, 2005), mangoesten (Tian-Cheng *et al.*, 2006) en paarden (Meng, 2006, 2008; Arankalle *et al.*, 2001). Spijtig genoeg kon de bron van seropositiviteit bij deze dieren niet worden geïdentificeerd. Een relatief hoge prevalentie van HEV-antistoffen werd gedetecteerd bij ratten, wat erop duidt dat een HEV-verwant agens wijd verspreid is onder de ratten (Meng, 2009).

Een recente studie uit het noordoosten van China rapporteert een seroprevalentie van 81,3% bij varkens van meer dan 3 maanden oud, 18,7% bij runderen en 12,4% bij schapen (Yu *et al.*, 2009). Bij een aantal van deze positieve dieren kon het genotype bepaald worden. Ze behoorden allemaal tot genotype 4, een genotype dat ook sporadisch acute uitbraken bij mensen veroorzaakt.

Hepatitis E als zoönose

Balayan *et al.* (1990) toonden aan dat een humane HEV kon overgedragen worden naar gedomesticeerde varkens. Enkele jaren later werd een varkensvirus geïsoleerd dat nauw verwant bleek te zijn met humaan HEV. De hypothese van een zoönose werd naar voren gebracht (Meng *et al.*, 1997). De verdere karakterisering van deze nieuwe HEV-stam die geïsoleerd werd uit varkens, toonde aan dat het een hoge graad van genetische verwantschap bezat met de menselijke US-1 en US-2 HEV-stammen (Meng *et al.*, 1998). Deze 2 Amerikaanse stammen afkomstig van mensen vertoonden 90-92 % homologie in de aminozuursequentie met HEV bij varkens en dit zowel in ORF2 als ORF3. Zowel de Amerikaanse stammen als HEV bij varkens behoorden tot genotype 3.

Experimentele infecties waarbij resusapen en een chimpansee geïnoculeerd werden met varkensHEV resulteerden in de besmetting van deze primaten (Erker *et al.*, 1999). Omgekeerd werd reeds aangetoond dat een humane HEV-stam pathogeen vrije varkens kan infecteren (Halbur *et al.*, Meng *et al.*, 1998). De resultaten uit beide experimenten leverden het experimentele bewijs van cross-speciesinfectie door HEV en brachten de hypothese naar voren dat varkens een natuurlijk reservoir zouden kunnen zijn voor HEV en dat een zoönose aan de basis zou liggen voor sommige humane HEV-infecties.

Na de ontdekking van HEV bij varkens werden er talrijke HEV-stammen uit varkens geïsoleerd en moleculair gekarakteriseerd. Dit gebeurde onder andere in Taiwan, Japan, Nieuw-Zeeland, Canada en Nederland (Garkavenko *et al.*, 2001; Hsich *et al.*, 1999, Okamoto *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2000, van der Poel *et al.*, 2001). Maar met het isoleren en karakteriseren van HEV-stammen uit varkens die genetisch nauw verwant zijn met humane HEV-stammen, wordt daarom nog niet het bewijs geleverd voor de overdracht van varken naar mens.

Verskillende serologische studies hebben aange-

toond dat varkenshouders, varkensdierenartsen en andere personen die regelmatig met varkens in contact komen, een verhoogd risico op HEV-infectie hebben. Drobeniuc *et al.* (2001) bepaalden de IgG anti-HEV-prevalentie bij 264 varkenshouders en 255 controle-individueen in Moldavië en vonden dat ongeveer 51% van de varkenshouders positief was in tegenstelling tot de ongeveer 25% in de controlegroep. Withers *et al.* (2002) vonden een 4,5 maal hogere IgG anti-HEV bij varkenshouders dan bij de controlegroep. Meng *et al.* (2002) testten 465 varkensdierenartsen uit de VS op de aanwezigheid van anti-HEV IgG. Als controlegroep in deze studie gebruikten de onderzoekers stalen afkomstig van normale bloedgevers. Van de varkensdierenartsen werd er ongeveer 27 % positief bevonden, in de controlegroep 18%. Met andere woorden, in de VS hadden varkensdierenartsen 1,5 keer meer kans om anti-HEV IgG positief te zijn dan normale bloedgevers. Gelijkaardige resultaten werden bekomen in Zweden waar de seroprevalentie bij varkenshouders 13,0% bedroeg tegenover 9,3% bij de controlegroep, maar deze resultaten waren niet significant verschillend (Olsen *et al.*, 2006).

Naast de serologische studies zijn er enkele gevallen beschreven die een zoönotische transmissie met bewijsmateriaal staven. Yazaki *et al.* (2003) beschreven de detectie en karakterisering van HEV in rauwe varkenslevers die commercieel verkocht werden in Hokkaido (Japan). Via RT-PCR konden de onderzoekers in 7 van de 363 geteste levers HEV RNA aantonen die tot het genotype 3 of 4 behoorden. Opmerkelijk was wel dat 1 van de isolaten 100% homologie vertoonde met HEV afkomstig van een 86-jarige besmette patiënt uit Hokkaido, terwijl 2 andere isolaten 98,5%-100% homologie vertoonden met de HEV-stam geïsoleerd uit een 44-jarige patiënt. Het is interessant te noteren dat van 10 patiënten die leden aan acute of fulminante hepatitis E in Hokkaido tussen 2001 en 2002, er 9 waren die gegrilde of halfrauwe varkenslever hadden gegeten en dit 2 tot 8 weken vóór het optreden van de eerste symptomen van de ziekte. Banks *et al.* (2004) beschreven het geval van een patiënt uit het Verenigd Koninkrijk met hepatitis E bij wie het virus in aminozuursequentie 100 % homologie vertoonde met de HEV-stam geïsoleerd bij een varken. Andere studies uit Hokkaido bevestigden de betrokkenheid van varkens bij de HEV-transmissie naar mensen. Kato *et al.* (2004) rapporteerden het geval van een 69-jarige patiënt die stierf aan een zeer hevige aanval van hepatitis E na het consumeren van varkenslever gegrild op een barbecue. Mizuo *et al.* (2005) rapporteerden 32 gevallen van hepatitis E waarbij de patiënten halfrauwe varkenslever of ingewanden hadden gegeten 1 tot 2 maanden voordat de eerste symptomen zichtbaar werden.

Het meest directe bewijs van een zoönose door voedseltransmissie, is een geval uit Japan. Leden van dezelfde familie werden allen geïnfecteerd na het eten van ongekookt Sikaheartenvlees. De stam die geïsoleerd werd bij deze patiënten was identiek aan de stam geïsoleerd uit het restafval van hetzelfde hert (Tei *et al.*, 2003).

Maar niet alleen via besmette varkens en herten kan HEV overgedragen worden naar de mens, ook everzwijnen zouden een bron van infectie zijn. Geïsoleerde gevallen van hepatitis E werden gerapporteerd bij patiënten nadat ze vlees van wilde varkens hadden gegeten (Li *et al.*, 2005; Masuda *et al.* 2003; Matsuda *et al.*, 2005). In Duitsland beschreven Wichmann *et al.* (2008) een “case-control studie” met patiënten die autochtoon besmet waren met hepatitis E en met een willekeurig gekozen controlegroep. De resultaten van deze analyse toonden aan dat de consumptie van slachtafval en vlees van everzwijnen aan de oorsprong lag van de autochtone infecties.

In een Hongaarse studie werd er bij 34,4% van de geteste levers van reeën HEV RNA gedetecteerd, waarvan bij 1 staal een genotypering kon uitgevoerd worden. Het genotype van het HEV van de ree behoorde tot genotype 3 en was genetisch identiek aan humane HEV (Reuter *et al.*, 2009).

Tenslotte werd ook de vermoedelijke overdracht van hepatitis E van een kat en een hond naar hun respectievelijke eigenaars gerapporteerd door Kuno *et al.* (2003) en Renou *et al.* (2007), maar hier zou het niet gaan over een overdracht via voedsel.

Andere mogelijke bronnen van overdracht van HEV

De laatste jaren werden er steeds meer onderzoeken uitgevoerd naar mogelijke reservoirs van HEV in geïndustrialiseerde landen. Een Spaanse groep onder leiding van Clemente-Casares (2003) onderzocht de prevalentie van HEV in afvalwater in Spanje en de VS. Eén vijfde van de stalen verzameld in Washington DC was positief voor HEV. Daarbij werd de reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) test gebruikt. Verder fylogenetisch onderzoek toonde aan dat de HEV-sequenties 91 à 92 % homoloog waren met 2 humane HEV-isolaten uit de VS en voor 98% homoloog waren met het HEV-isolaat van een varken. Of de aangetroffen virussen nog infectieus waren, werd in deze studie niet onderzocht. In een andere studie van de mogelijke oorzaken van hepatitis E genotype 3 in Nederland werd bij waterstalen uit de Maas en meststalen van diverse oorsprong naar de aanwezigheid van HEV RNA gezocht (Rutjes *et al.*, 2009). Bij de waterstalen bleek 17% van de onderzochte stalen positief voor HEV RNA, terwijl de prevalentie bij de meststalen varieerde van 53% bij de gepoolde fecale stalen van varkens tussen 5-27 weken tot 14% bij slachtklare varkens van 6 maanden. HEV RNA werd ook gedetecteerd bij 4% van de fecale stalen van everzwijnen. Ook in deze studie werd niet onderzocht of er in de geanalyseerde stalen nog infectieus virus aanwezig was. Behalve de overdracht via onvoldoende gekookt besmet vlees, zijn er tot op heden geen aantoonbare bewijzen van mogelijke oorzaken van autochtone hepatitis E-uitbraken in geïndustrialiseerde landen.

PATHOGENESE EN KLINIEK

HEV-infecties bij de mens

Vele aspecten van de pathogenese van hepatitis E moeten nog onderzocht worden. Er wordt verondersteld dat het virus zijn gastheer binnenkomt via de orale weg. De primaire site voor vermenigvuldiging werd nog niet geïdentificeerd maar er wordt verondersteld dat het het darmstelsel is. De manier waarop het virus de lever bereikt, werd nog niet beschreven maar het vermeerderd zich in het cytoplasma van de hepatocyten (Krawczynski and Bradley, 1989). Hoe het vanuit de hepatocyten de gal en het bloed bereikt, moet ook nog opgehelderd worden. Gemiddeld bedraagt de incubatieperiode 3 tot 8 weken, met een gemiddelde van 40 dagen (Previsani and Lavanchy, 2001). Dit gemiddelde is gebaseerd op een beperkt aantal studies met 2 vrijwilligers en met makaken. In een beperkte studie waarin een vrijwilliger fecaal besmet materiaal opnam, werd de viremie door middel van RT-PCR gedetecteerd tot 22 dagen na de opname van het virus. Een week later startten de symptomen (Chauhan *et al.*, 1993). Virusachtige partikels werden gevonden door elektronenmicroscopie in de feces van de vrijwilliger op dag 34 na de blootstelling. Antistoffen tegen HEV werden gedetecteerd vanaf dag 41 en konden 2 jaar later nog steeds aangetoond worden. De waarden van de leverenzymen piekten op dag 46. Deze resultaten bevestigden een vroegere studie met een vrijwilliger waarbij het virus kon gevonden worden in de feces op dag 28 en waarbij de piek van de leverenzyme werd waargenomen op dag 42 (Balayan *et al.*, 1983). De vrijwilligers uit deze studies herstelden volledig. Het virus gevonden in de feces van geïnfecteerde mensen en dieren wordt verondersteld de voornaamste bron van infectieus virus in het milieu te zijn.

Typische hepatitis E-symptomen zijn geelzucht, donkere urine, anorexia en hepatomegalie. Bij ongeveer de helft van de patiënten treedt er ook abdominale pijn met misselijkheid, braken en koorts op (Smith, 2001; Purcell and Emerson, 2001). De ernst van een HEV-infectie kan variëren van subklinisch tot fulminant. Niet alle HEV-besmette individuen ontwikkelen de ziekte met een duidelijk klinisch verloop. Veel van de HEV-seropositieve individuen hebben immers geen voorgeschiedenis van leverziekten (Drobeniuc *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2002). Gemiddeld heeft hepatitis E een sterftecijfer van 0,2 tot 1 % en de meest getroffen doelgroep bevindt zich bij de jongeren en mensen van middelbare leeftijd (15-40 jaar). Een verhoogde sterfte en ernst van de ziekte worden waargenomen bij chronische leverpatiënten (Hamid *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Monga *et al.*, 2004). Bij zwangere vrouwen daarentegen kan het sterftecijfer oplopen tot 20% (Khuroo *et al.*, 1981). Algemeen voorkomende verwickelingen gedurende de zwangerschap zijn de sterfte van de moeder en de foetus, abortus, vroegtijdige geboorte en de sterfte van een levend geboren baby na de geboorte (Smith, 2001).

HEV-infecties bij het varken

Vóór HEV bij het varken werd ontdekt, was er geen enkele klinische aanwijzing voor een virale varkenshepatitis. Bij de eerste experimentele infecties van varkens waarbij HEV intraveneus werd geïnoculeerd, trad er viremie op maar werden geen klinische symptomen of een verhoging van de leverenzymen waargenomen (Meng *et al.*, 1998a;1998b; Halbur *et al.*, 2001). Het varkenHEV-genoom werd gedetecteerd door middel van RT-PCR in het bloed, de feces, de lever, de lymfeklieren, de kleine en dikke darm, en bij een aantal dieren eveneens in de maag, milt, nieren, amandelen, speekselklieren en longen (Williams *et al.*, 2001).

Zoals bij de mens wordt ook bij varkens HEV overgedragen via de orale-fecale weg of door direct contact met geïnfecteerde dieren (Kasorndorkbua *et al.*, 2004; Bouwknegt *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2009)). Van zodra een varken besmet is, kan het virus in de feces gedetecteerd worden vanaf 2-3 weken na inoculatie en de virusuitscheiding kan tot 7 weken duren (Meng *et al.*, 1998b). In een studie van het verloop van een HEV-infectie bij natuurlijk geïnfecteerde varkens werd virus gedetecteerd in de feces bij 9 weken oude biggen, het tijdstip waarop de maternale immuniteit verdwenen was. Op de leeftijd van 12 tot 15 weken scheidde al de dieren HEV uit via de feces en kon het virus gevonden worden in de lever en de mesenteriale lymfeklieren. Het virus kon nog worden aangetoond bij 18 weken oude dieren in de lever en feces en bij enkele 22-weken oude dieren in het serum (de Deus *et al.*, 2008).

DIAGNOSE

Klinisch zijn de symptomen van humane hepatitis E niet te onderscheiden van de symptomen van hepatitis A en een accurate diagnose is gebaseerd op laboratoriumtesten.

De meest betrouwbare indicator voor de diagnose van acute hepatitis E is de aanwezigheid van HEV RNA in bloed, gal of feces. Het viraal RNA kan aangetoond worden tussen dag 6 en dag 40 na de blootstelling aan het virus (Tokita *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). Bij sommige patiënten met een subklinische infectie is het aantonen van HEV RNA de enige aanwijzing voor een HEV-infectie (Claudill *et al.*, 1994; Clayson *et al.*, 1995; Mitsui *et al.*, 2005). Verschillende in-house RT-PCR werden ontwikkeld waarvan sommige gebaseerd zijn op een conventionele RT-PCR (Erker *et al.*, (1999); Mizuo *et al.*, (2002)) terwijl er bij de recent ontwikkelde testen gebruik gemaakt wordt van realtime RT-PCR. (Orru *et al.*, 2004); Ahn *et al.*, 2006); Jothikumar *et al.*, 2006); Gyarmati *et al.*, 2007); Zao *et al.* 2007)).

Verschillende serologische testen werden voor de detectie van IgA-, IgG- of IgM-antistoffen tegen HEV (Mushahwar, 2008). Algemeen wordt aangenomen dat de IgM/IgG anti-HEV ELISA gebaseerd op ORF2 van HEV een breed spectrum aan antistoffen detecteert en

resultaten geeft die goed reproduceerbaar zijn in verschillende laboratoria. De diagnose van HEV-infecties bij varkens is, zoals bij de mens, gebaseerd op serologie en RT-PCR vermits bij varkens HEV-infecties subklinisch verlopen. Omdat de antistoffen van varkens gericht tegen HEV kruisreageren met humane HEV, wordt ELISA met het recombinante humane kapside antigen ook gebruikt voor de opsporing van anti-HEV-antilichamen bij varkens (Meng *et al.*, 1997, 1998, 2002). Naast ELISA gebaseerd op het humane kapside antigen van genotype 1 bestaat er ook een ELISA met het kapside proteïne van een genotype 4 varkensHEV (Arankalle *et al.*, 2007). Spijtig genoeg bestaat er geen specifieke test die een onderscheid kan maken tussen infecties met HEV bij het varken en HEV bij de mens, vermits genotype 3 en 4 van varkens en mensen genetisch van elkaar niet te onderscheiden zijn. Voor de detectie van HEV bij geïnfecteerde varkens werden er verschillende specifieke RT-PCR-testen ontwikkeld (Schlauder *et al.*, (1999); Huang *et al.* (2002); Herremans *et al.*, (2007); Jothikumar *et al.*, (2006)). Momenteel worden geen van de beschreven testen uitgevoerd in een Belgisch labo en kunnen stalen van varkens bijgevolg nog niet onderzocht worden op de aanwezigheid van antistoffen tegen HEV of van viraal HEV RNA.

PREVENTIE EN CONTROLE BIJ DE MENS

Hoewel de vermeerdering van HEV in een beperkt aantal celculturen van hepatische oorsprong werd beschreven, is het systeem niet efficiënt (Emerson and Purcell, 2007) en niet bruikbaar voor de ontwikkeling van vaccins. Momenteel zijn er geen vaccins tegen HEV beschikbaar maar verscheidene onderzoekers ontwikkelden experimentele vaccins op basis van DNA (Kamili *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005; Deshmukh *et al.*, 2007), recombinante partikels (Niikura *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004) of recombinante proteïnen (Purdy *et al.*, 1993; Tsarev *et al.*, 1994). Onderzoekers onder leiding van Dr Purcell slaagden in de productie van een mogelijke kandidaat als HEV-vaccin. Deze bestaat uit een recombinant 56-kDa kapside proteïne dat tot expressie gebracht wordt in insectencellen (Emerson and Purcell, 2007; Zang *et al.*, 2001; Purcell *et al.*, 2003). De resultaten van een onderzoek naar de veiligheid en doeltreffendheid van dit recombinante vaccin in fase 2 toonden aan dat het vaccin een doeltreffendheid had van 95,5% in het voorkomen van de klinische symptomen geassocieerd met hepatitis E (Shrestha *et al.*, 2007). Bijkomende studies zijn nodig om de graad van bescherming op lange termijn te bepalen alsook de veiligheid van het vaccin bij zwangere vrouwen en kinderen te onderzoeken (Krawczynski *et al.*, 2007).

In afwachting van beschikbare vaccins kunnen echter een aantal preventieve maatregelen genomen worden om het risico op een HEV-infectie te minimaliseren, zoals goede hygiëne, geen water drinken waarvan de zuiverheid niet bekend is en geen rauwe of onvoldoende gekookte levers of andere organen van varkens,

everzwijnen of herten eten. Vermits het nog niet uitgesloten is dat HEV van varkens kan overgedragen worden naar de mens, wordt een eenvoudige maatregel als het grondig wassen van de handen met zeep na contact met varkens ten stelligste aangeraden.

CONCLUSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

De interesse in hepatitis E is in de westerse landen de laatste jaren enorm toegenomen ondanks het feit dat HEV al veel langer een belangrijk wereldwijd verspreid humaan pathogeen is. Het aantonen van HEV bij varkens, het bewijs dat HEV tussen species kan worden overgedragen en het isoleren van humane HEV's die genetisch nauw verwant blijken te zijn met porcine HEV's hebben de belangstelling voor hepatitis E plots doen toenemen. Meerdere aanwijzingen en bewijzen zijn gevonden dat HEV kan overgedragen worden door rauw of onvoldoende gekookt varkens- (gedomesticeerde en wilde varkens) en hertenvlees naar de mens. Daardoor werd het vermoeden van een zoönose door voedsel bevestigd. Desondanks is gebleken dat met de huidige kennis van hepatitis E het risico op een HEV-infectie van hepatitis E door consumptie van besmet vlees (lever) zeer klein is indien het vlees voldoende gekookt wordt. Nochtans wordt er de laatste jaren een stijgend aantal gevallen van autochtone hepatitis E-uitbraken in geïndustrialiseerde landen waargenomen die niet allemaal in verband kunnen gebracht worden met het eten van rauw besmet vlees. Verder onderzoek is nodig om mogelijke andere bronnen van HEV-infecties te onderzoeken.

De relatief hoge prevalentie van HEV-antistoffen bij mensen uit geïndustrialiseerde landen zou erop kunnen wijzen dat het voorkomen van hepatitis E in deze landen onderschat wordt en dat mogelijk een aantal acute hepatitis E-uitbraken niet gediagnosticeerd worden. Ook hier zijn bijkomende studies nodig om de werkelijke omvang en impact van HEV-infecties in geïndustrialiseerde landen beter te kunnen beoordelen.

De eerste resultaten van een experimenteel HEV-vaccin zien er veelbelovend uit. Nochtans zijn bijkomende proeven nodig om de doeltreffendheid van deze vaccins bij andere genotypen te bepalen, vooral bij de HEV-stammen die een zoönose kunnen veroorzaken.

Tenslotte zou de ontwikkeling van diergeneeskundige vaccins tegen HEV er eventueel kunnen toe bijdragen dat het risico op zoönose geminimaliseerd wordt en dat de voedselveiligheid verhoogd wordt.

DANKWOORD

De auteur wenst professor Hans Nauwynck van het Laboratorium voor Virologie, Faculteit Diergeneeskunde, UGent te danken voor het kritisch lezen van het manuscript.

LITERATUUR

Een uitgebreide referentielijst kan aangevraagd worden bij de auteur.