

Zdravstvena zaštita Health care

HEPATITIS E U HRVATSKOJ – SMJERNICE ZA DIJAGNOSTIKU I LIJEČENJE

HEPATITIS E IN CROATIA – GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT

OKTAVIJA ĐAKOVIĆ RODE, LORENA JEMERŠIĆ, ADRIANA VINCE*

Deskriptori: Hepatitis E – epidemiologija, virologija, dijagnoza, liječenje; Virus hepatitisa E – genetika, patogenost, imunologija, izolacija; Virusna antitijela – imunologija, u krvi; Imunoglobulin G – u krvi; Imunoglobulin M – u krvi; Virusna RNK – u krvi; Zoonoze – virologija, prijenos; Hrvatska – epidemiologija; Smjernice

Sažetak. Hepatitisu E pridaje se velika pozornost kao emergentnoj zoonozi koja se pojavljuje diljem svijeta. Kliničke slike variraju od teških fulminantnih oblika u nerazvijenim zemljama do blažih, dijagnostički neprepoznatih hepatitisa u razvijenima. Sve se češće opisuje kronični hepatitis E u osoba s transplantiranim solidnim organima i HIV-bolesti. Dijagnoza hepatitisa E postavlja se određivanjem protutijela anti-HEV-IgM i IgG uz potvrdni Western blot te dokazivanjem HEV RNK. U Hrvatskoj je prvi slučaj autohtone bolesti dokazan 2012. godine uzrokovan HEV-om genotipa 3 (HEV-3). Prikazujemo suvremene spoznaje o hepatitisu E, nadopunjene vlastitim rezultatima testiranja u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu te smjernice za dijagnostiku i liječenje imunokompetentnih i imunokompromitiranih osoba. Od 2011. do 2014. godine HEV je testiran u 1107 bolesnika, a anti-HEV-protutijela imalo je njih 117 (10,6%). Akutna HEV-infekcija dijagnosticirana je u 25 (2,3%) bolesnika. S obzirom na utvrđenu prevalenciju protutijela, zaključujemo da HEV-dijagnostika treba biti dio dijagnostičkog panela za bolesnike s povišenim aminotransferazama.

Descriptors: Hepatitis E – epidemiology, virology, diagnosis, therapy; Hepatitis E virus – genetics, pathogenicity, immunology, isolation and purification; Antibodies, viral – immunology, blood; Immunoglobulin G – blood; Immunoglobulin M – blood; RNA, viral – blood; Zoonoses – virology, transmission; Croatia – epidemiology; Practice guidelines as topic

Summary. Hepatitis E is attributed great attention as an emerging worldwide-distributed zoonosis. The clinical presentation varies from severe fulminant in underdeveloped to milder forms of diagnostically unrecognized hepatitis cases in developed countries. Chronic hepatitis E is more often described in subjects with transplanted solid organs and HIV disease. The diagnosis of hepatitis E is established by determination of anti-HEV IgM and IgG with Western blot confirmation and detection of HEV RNA. In Croatia, the first case of indigenous disease caused by HEV genotype 3 (HEV-3) was detected in 2012. In this paper we present current knowledge on hepatitis E supplemented by own results obtained at the University Hospital for Infectious Diseases in Zagreb and guidelines for diagnosis and treatment of immunocompetent and immunocompromised individuals. In the period from 2011-2014, HEV was tested in 1107 patients, of whom 117 (10.6%) had anti-HEV antibodies. Acute HEV infection was diagnosed in 25 (2.3%) patients. Considering the prevalence of antibodies we can conclude that HEV diagnostics should be included in the diagnostic panel for patients with elevated aminotransferases.

Liječ Vjesn 2016;138:289–296

Hepatitis E se u Europi, pa tako i u Hrvatskoj, donedavno smatrao samo uvezenom bolesti od koje su oboljevali putnici zaraženi tijekom boravka u područjima poznatim kao hiperendemska za hepatitis E (HE). Suvremene spoznaje pokazuju da se HE kao autohtona bolest pojavljuje diljem svijeta, i u zemljama u razvoju i u razvijenim zemljama Europe, Sjeverne Amerike te u Japanu.²⁻⁸ Domicilna pojava hepatitisa E potvrđena je u Hrvatskoj uz seroprevalenciju od 10,7% među bolesnicima s jetrenom lezijom.⁹⁻¹¹ U radu se prikazuju suvremene spoznaje o hepatitisu E uz osvrt na dijagnostiku i pojavnost u Hrvatskoj. Temeljem rezultata rutinske dijagnostike hepatitisa E iz Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu predložene su smjernice za dijagnostiku i liječenje.

Virus hepatitisa E (HEV)

Hepatitis E (HE) uzrokuje *Orthohepevirus A*.¹² Ideja o postojanju novog „non-A, non-B“ virusa kao uzročnika epidemijskih hepatitisa pojavila se 1980-ih godina.^{13,14} Otkriće

HEV-a primjer je spremnosti znanstvenika da se žrtvuje kako bi ostvario cilj. Ruski virolog Mikhail Balayan bio je uključen u istraživanje epidemije hepatitisa na području Afganistana 1983. godine. Morao se hitno vratiti u Moskvu, ali nije mogao osigurati potrebne uvjete za transport uzoraka za daljnja istraživanja. Jedini način kako da prenese virus bio je da se zarazi sam i tako ga sačuva. Popio je mješavinu jogurta i uzoraka stolica bolesnika i čekao što će se dogoditi. Kada su se pojavili prvi simptomi bolesti, pretraživao je

* Odjel za virusologiju, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb (prim. dr. sc. Oktavija Đaković Rode, dr. med.), Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (doc. dr. sc. Lorena Jemeršić, dr. vet. med.), Referentni centar za virusne hepatitise Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske; Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (prof. dr. sc. Adriana Vince, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prim. dr. sc. O. Đaković Rode, Odjel za virusologiju, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Mirogojska 8, 10000 Zagreb; e-mail: orode@bfm.hr

Primljeno 21. travnja 2016., prihvaćeno 13. rujna 2016.

uzorke stolice elektronskim mikroskopom i vidio čestice koje su nalikovale na virus hepatitisa A (HAV). Budući da je odranije imao protutijela nakon preboljelog hepatitisa A, znao je da se radi o novom virusu.¹⁵ Prva epidemija HEV-a u Delhiju iz 1955./56. godine dokazana je kasnije retrospektivnom analizom.^{16,17}

HEV je neovijeni virus promjera 27 – 34 nm s pozitivnom jednolančanom RNK veličine 7,2 kb. Prema posljednjoj klasifikaciji, svrstava se u porodicu Hepeviridae i rod *Orthohepevirus* unutar kojega se razlikuju 4 vrste: A, B, C i D.¹² Četiri genotipa *Orthohepevirusa* A uzrokuju bolesti ljudi i pokazuju različit patogeni potencijal. Genotip 1 (HEV-1) i 2 (HEV-2) jesu humane vrste. Prisutnost HEV-1 u svinje istodobno zaražene s HEV-3 opisana je u Kambodži i izuzetno je rijetka, ali upućuje na moguć rizik od međuvrskog prijelaza.¹⁸ HEV-1 je glavni uzročnik velikih epidemija u hiperendemskim područjima zemalja u razvoju. Genotipovi 3 (HEV-3) i 4 (HEV-4) imaju zoonotski potencijal širenja. HEV-3 je rasprostranjen autohtono diljem Europe i Sjeverne Amerike, dok se HEV-4 nalazi rjeđe.^{3,19–21}

Genom HEV-a određen je 1991. godine i sastoji se od dva kratka nekodirajuća područja koja okružuju tri otvorena okvira čitanja (ORF-1–3; engl. *open reading frame*). ORF-1 kodira nestrukturane proteine potrebne za replikaciju i obradu proteina (metiltransferaza, RNK-helikaza, RNK-polimeraza ovisna o RNK i cistein proteaza) i sadržava hipervarijabilnu regiju bez znatnije uloge u infektivnosti virusa.²² ORF-2 kodira kapsidne proteine i važno je područje u izradi cjepiva. ORF-3 kodira protein od 114 aminokiselina koji ima funkcije u reguliranju staničnog okoliša. Virus se teško izdvaja u staničnim kulturama, što otežava istraživanja. Vežanje kapside na staničnu površinu i ulazak HEV-a u stanicu zbivaju se s pomoću heparan-sulfat proteoglikana, HSC70 (engl. *heat shock cognate* 70 kDa) te još nedovoljno poznatih specifičnih receptora. U citoplazmi započinje proces oslobađanja, prepisivanja i prevođenja RNK te stvaranja novih viriona: pozitivni genom virusne RNK predložak je za translaciju nestrukturiranih proteina ORF-1; sintetizira se intermedijarni replikativni negativni lanac progenskoga virusnoga genoma kao predložak za stvaranje pozitivnog lanca RNK; kapsidni protein ORF-2 pakira gensku virusnu RNK i sastavlja nove virione; ORF-3 osigurava transport viriona i oslobađanje iz inficirane stanice.^{23,24}

Virus je relativno stabilan pa u vlažnoj i hipertoničnoj sredini može ostati infektivan danima. HEV se inaktivira na temperaturi iznad 70 °C, a na 56 °C stabilan je 30 minuta.²⁵ Kuhanje mesa 1 minutu na 70 °C reducira koncentraciju infektivnih viriona za 0,48 log, a zagrijavanje na 95 °C smanjuje ih za daljnjih 3,67 log.²⁶

HEV je danas globalno najčešći uzročnik akutnih virusnih hepatitisa, posebno u zemljama u razvoju. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije, oko 20 milijuna osoba na godinu zarazi se HEV-om, u više od 3 milijuna oboljelih razvije se akutna simptomatska bolest; od njih oko 57.000 umre nakon infekcije HEV-1. Epidemiološke i kliničke prezentacije HE znatno se razlikuju prema geografskoj rasprostranjenosti pojedinih virusnih genotipova.^{2–6,27}

Hepatitis E u zemljama u razvoju

U zemljama u razvoju hepatitis E se pojavljuje endemski, a uzrokuju ga HEV-1 i HEV-2. Prenosi se fekalno-oralnim putem onečišćenom vodom i kontaminiranom hranom. HEV-1 dominira u južnoj i središnjoj Aziji, na Dalekom istoku, u sjevernoj Africi i na Karibima, a HEV-2 se nalazi

u Meksiku i zapadnoj Africi.^{15–17,23} Prevalencija je najveća u mlađih odraslih osoba, posebno muškaraca u dobi od 15 do 30 godina. Infekcije nisu uobičajene u djece mlađe od 10 godina, što je različito od raširenosti hepatitisa A koji u zemljama u razvoju do desete godine života preboli većina djece. Iznimka je Egipat gdje je seroprevalencija HEV-a oko 80% pa oboljevaju i mlađa djeca.^{28,29} Asimptomatske infekcije do deset su puta češće od simptomatskih. Rizik od simptomatske bolesti raste s dobi iznad petnaeste godine života. Osim sezonskih hidričnih epidemija, osobito u vrijeme monsunskih kiša, i u zemljama u razvoju tijekom cijele godine bilježe se sporadične infekcije HEV-om izvor kojih ostane nepoznat.

HEV-1 i HEV-2 šire se samo između ljudi. Dokazan je vertikalni prijenos s majke na dijete, kao i prijenos transfuzijom krvi.³⁰ Nema dokaza da se HEV-1 i HEV-2 prenose spolnim putem. Izravni prijenos s jedne osobe na drugu smatra se mogućim, ali izuzetno rijetkim i dubioznim.^{31–33}

Infekcija s HEV-1 u trudnoći velik je rizik za majku i plod. Teški oblik bolesti može se razviti u 30% slučajeva uz loš neonatalni ishod (pobačaj, prijevremeni porođaj, mrtvorođenče) te mortalitet od 10 do 25%. Mehanizmi koji dovode do smrtnog ishoda kojemu prethode fulminantni hepatitis i opstetričke komplikacije, osobito jako krvarenje, nisu poznati. Pretpostavlja se da bi razlozi mogli biti redukcija ekspresije progesteronskih receptora, jačina viremije te smanjenje HEV-specifičnog odgovora limfocita T.^{25,34–36} Komplikacije u trudnoći koje bi se povezale s infekcijama s HEV-3 ili HEV-4 nisu opisane.

Hepatitis E u razvijenim zemljama

Virusi HEV-3 i HEV-4 uzrokuju zoonoze i nalaze se u brojnih životinjskih vrsta u kojih ne uzrokuju klinički manifestne bolesti. Glavni nosioci HEV-3 su domaće i divlje svinje te jeleni i školjkaši.^{2,32,37–41} HEV-3 nalazi se diljem Europe, Amerike, Kine i Japana. HEV-4 dominira u Kini, Indiji i Indoneziji, a sporadično je dokazan u Europi, češće u Francuskoj te Njemačkoj i Italiji.²¹ U imunokompetentnih osoba akutna se bolest rijetko dijagnosticira i obično je blaga. Bolest se najčešće registrira u muških osoba u dobi iznad 50 godina premda nema značajne razlike u oboljevanju između muškaraca i žena.^{19,42}

HEV se prenosi putem probavnog sustava, a izvor infekcije i putovi prijenosa najčešće ostanu nepoznati. Virus je stabilan na temperaturi od 60 °C pa se pretpostavlja da se najvjerojatnije prenosi putem nedovoljno termički obrađenog mesa i mesnih preradevina. Dokazan je prijenos HEV-3 kontaminiranim povrćem i voćem (jagode).^{23,26,43–46} Izravni kontakt sa životinjama donosi znatan rizik od HE, što potvrđuje veća učestalost infekcija s HEV-3 u farmera i veterinarara.^{47,48} Nakon prolaza kroz probavni sustav razvija se viremija. Tijekom nje moguć je prijenos HEV-a putem krvi i krvnih proizvoda, kao i transplantatima. Zbog niske prevalencije akutnih HE i blage kliničke slike u većine bolesnika zasada se ne preporučuje obavezno testiranje krvi i krvnih pripravaka na HEV.³⁰ Sve češće se opisuju slučajevi HEV-infekcije u imunosuprimiranih bolesnika, posebno nakon transplantacije solidnih organa te progresija u kroničnu bolest.^{19,49–51}

Klinička slika hepatitisa E

HEV-infekcije treba razlikovati prema endemskim područjima i učestalosti pojavljivanja. U visokoendemskim područjima gdje je najčešći uzročnik virusnih hepatitisa HEV-1 kliničke manifestacije variraju od supkliničkih do

fulminantnih hepatitisisa. Većina akutnih HE blaga je kliničkog tijeka i prolazi spontano. Simptomatska se bolest zabilježi u oko 20% bolesnika. Simptomi su srednje teški i općenito samoograničavajući, no HEV-1 se povezuje s letalitetom od 0,5 do 4%. U simptomatskih bolesnika inkubacija je prosječno 40 dana (2 do 8 tjedana). Početni simptomi obično su nespecifični – malaksalost, gubitak apetita, mialgije, bol u abdomenu, vrućica, mučnina i povraćanje. Tjedan-dva nakon pojave općih simptoma može se razviti žutica uz taman urin i blijedu stolicu.^{2-5,23} Viremija HEV-a je prolazna – primarno se događa u preikteričnoj fazi i nestaje brzo nakon prvih simptoma, osim ako bolest ne progredira u kronični oblik. Izlučivanje virusa stolicom započinje nekoliko dana (prosječno 5 dana) prije pojave žutice i traje oko 2 – 3 tjedna. Bolest obično prolazi za jedan do četiri tjedna.

U postavljanju dijagnoze indikativan je nalaz visokih vrijednosti serumskih aminotransferaza. U prodromalnoj fazi aminotransferaze mogu biti i dvadeset puta više od normale, a najviše vrijednosti dosežu za vrijeme žutice. Alkalna fosfataza i laktat dehidrogenaza obično su u granicama normalnih vrijednosti. U imunokompetentnih osoba aminotransferaze se brzo normaliziraju. Teške kliničke manifestacije s visokim letalitetom i komplikacijama u trudnoći uzrokuje HEV-1 u hiperendemijskim područjima. U osoba s prethodnom jetrenom bolesti može se razviti fulminantni hepatitis.²⁻⁶ Nije jasno može li HEV uzrokovati rekurrirajuće infekcije. Reaktivacija HEV-a opisana je u hematoloških bolesnika nakon transplantacije koštane srži. Koinfekcije s drugim virusnim hepatitisima mogu pridonijeti razvoju težih kliničkih oblika bolesti. Istodobna infekcija s dva subgenotipa HEV-3 opisana je u transplantiranog bolesnika u Francuskoj.⁷⁰⁻⁷²

HEV može uzrokovati ekstrahepatalne manifestacije kao što su akutni pankreatitis (HEV-1) i neurološke smetnje (encefalitis, poliradikulopatija, Guillain-Barréov sindrom, bilateralni brahijalni neuritis i proksimalna mijelopatija).^{6,73,74} Ove su manifestacije rijetke i nalažu daljnja istraživanja.

Dijagnoza hepatitisisa E

Dijagnoza hepatitisisa E u bolesnika s jetrenom lezijom može se postaviti određivanjem protutijela anti-HEV-IgM i IgG u serumu i određivanjem HEV RNK u serumu, stolici i bioptičkim uzorcima jetre.^{11,76-79} Nakon infekcije HEV-om tijekom inkubacije prije pojave simptoma razvijaju se protutijela anti-HEV-IgM, a ubrzo i IgG. Komercijalno dostupni testovi za određivanje anti-HEV-IgM i IgG temelje se na proteinima ORF-2/ORF-3 ili na rekombinantnim antigenima.⁸⁰ Genotipski specifična protutijela u testovima su križno reaktivna, ali tipiziranje genotipova HEV-a serološkim metodama nije moguće. Serološki testovi koji se temelje samo na tipno specifičnim antigenima ne pokrivaju dijagnostiku svih genotipova pa rezultat može biti lažno negativan. Testovi imaju različitu osjetljivost i specifičnost te nema optimalnog testa koji bi bio zlatni standard. Rezultati epidemioloških istraživanja seroprevalencije i iz istih područja mogu biti različiti ovisno o vrsti upotrijebljenog testa.^{11,76-83}

U serološkoj dijagnostici važna je pravilna interpretacija rezultata. Za postavljanje dijagnoze potrebno je pratiti dinamiku protutijela. U vrijeme pojave kliničkih simptoma protutijela anti-HEV-IgM dosežu najvišu koncentraciju. Detektabilna su oko 8 tjedana i nakon 32 tjedna u većine se bolesnika više ne mogu utvrditi. Dva tjedna nakon početka bolesti oko 90% bolesnika s akutnim HE ima pozitivna

protutijela anti-HEV-IgM, a ubrzo se pojavljuju i anti-HEV-IgG. U manifestnoj bolesti obje klase protutijela pojavljuju se gotovo istodobno.

Nakon pojave simptoma anti-HEV-IgG postupno rastu i dosežu najviši titar oko 4 tjedna kasnije. Protutijela anti-HEV-IgG mogu perzistirati dugo (od 1 do 14 godina) i pokazatelj su prošle infekcije. Mogućnost reinfekcije HEV-a ne može se isključiti budući da nije poznato je li imunost nakon preboljele bolesti doživotna i jesu li protutijela protektivna. Protutijela se s vremenom gube.⁵⁶

Određivanje viremije važno je u ranoj fazi akutne bolesti i u kroničnoj infekciji. U imunokompetentnih bolesnika s razvijenim simptomima hepatitisisa protutijela su već prisutna i virus se često ne može dokazati. Negativni nalaz HEV RNK ne isključuje dijagnozu. Viremija može biti slaba i nedetektabilna. Obično se bilježi do deset dana nakon infekcije kada se virus počinje izlučivati stolicom. Molekularna dijagnostika nije standardizirana ni jednostavna i nalaže visokospecijalizirane metode i iskusan osoblje. Važan iskorak u racionalizaciji i dostupnosti bilo je prihvaćanje molekularne dijagnostike kao univerzalne za humane i animalne uzorke te uzorke iz okoliša uz mogućnost zajedničke uporabe laboratorijskih metoda, posebno u zemljama s malim brojem bolesnika.⁷⁷

Molekularna je dijagnostika ključna za postavljanje dijagnoze kroničnog HE. Određivanje HEV RNK posebno je važno za imunosuprimirane bolesnike, u kojih odgovor protutijela može biti oslabljen i neadekvatan za postavljanje dijagnoze.^{56,79} Uz molekularnu dijagnostiku uvijek istodobno treba provesti i serološku. Serološka i molekularna dijagnostika jesu komplementarne i jedna metoda ne isključuje drugu. U akutnom hepatitisu dijagnostiku HEV-a treba raditi nakon što su isključeni uobičajeni uzročnici virusnih hepatitisisa (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV).

Materijali i metode

U razdoblju od 2011. do 2014. godine dijagnostika za hepatitis E rađena je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu iz 1254 seruma za 1107 bolesnika s jetrenom lezijom u diferencijalnodijagnostičkoj obradi virusnih hepatitisisa. Najveći broj uzoraka (85,7%) bio je za ambulantne bolesnike koji nisu bili hospitalizirani. Svim ispitanicima određena su protutijela anti-HEV-IgM i IgG imunoenzimskim testom (EIA, recomWell anti-HEV IgM/IgG, Mikrogen, Njemačka). Svaki inicijalno pozitivni serum u EIA-testu dodatno je testiran metodom Western blota (WB, recomBlot anti-HEV IgM/IgG, Mikrogen, Njemačka). Test WB potvrdni je test za anti-HEV-IgM i IgG. Protutijela su definirana kao pozitivna ako su dokazana metodom WB-a. Serumi s potvrđenim anti-HEV-IgM testirani su na HEV RNK u Hrvatskome veterinarskom institutu (HVI) u Zagrebu. Molekularna dijagnostika HEV-a u HVI radi se dvjema metodama, kvantitativnim PCR-postupkom u stvarnom vremenu (QRT-PCR) uz prethodnu reverznu transkripciju⁵² kojom se dokazuje vrlo postojani odsječak u ORF-3-regiji genoma i umreženom lančanom reakcijom polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju kojom se dokazuje prisutnost vrlo varijabilnog odsječka genoma u ORF-1, a koji je pogodan za daljnje sekvenciranje i utvrđivanje genotipa HEV-a.⁵³

Rezultati

U četverogodišnjem razdoblju pozitivna protutijela anti-HEV dokazana metodom WB-a imalo je 117 (10,6%) bolesnika. U testu EIA inicijalno pozitivna odnosno reaktiv-

Tablica 1. Dijagnostika hepatitisa E od 2011. do 2014. godine za 1107 bolesnika

Anti-HEV N = 1107 bolesnika / patients	Bolesnici / Patients n	% n/N
EIA* IgM / IgG** -pozitivno / positive	175	15,8%
WB# IgM / IgG-pozitivno / positive	117	10,6%
WB IgM-pozitivno; IgG-negativno / WB IgM positive; IgG negative	14	1,3%
WB IgM-pozitivno; IgG-pozitivno / WB IgM positive; IgG positive	11	1,0%
WB IgM-negativno; IgG-pozitivno / WB IgM negative; IgG positive	92	8,3%
EIA IgM / IgG-negativno / negative	932	84,2%
HEV RNK / RNA ^{###}	10	0,9%

* EIA, probirni imunoenzimski test / screening enzyme immunoassay; **IgM / IgG; IgM ili IgG / IgM or IgG; # WB, potvrdni test Western blota / confirmatory Western blot assay; ### HEV RNK, viremija HEV / HEV RNA, HEV viremia

Tablica 2. Rasprostranjenost bolesnika s pozitivnim protutijelima anti-HEV po županijama u Hrvatskoj od 2011. do 2014. godine

Table 2. Distribution of patients with positive anti-HEV antibodies in counties in Croatia from 2011-2014

Županija / County	Anti-HEV-IgG #WB-pozitivno / positive	HEV-3 ###RNK-pozitivno / positive
Zagrebačka / Zagreb County	21	3
Grad Zagreb / City of Zagreb	53	3
Bjelovarsko-bilogorska / Bjelovar Bilogora	12	
Brodsko-posavska / Brod Posavina	8	3
Sisačko-moslavačka / Sisak Moslavina	4	
Požeško-slavonska / Požega Slavonia	3	
Krapinsko-zagorska / Krapina Zagorje	3	1
Karlovačka / Karlovac	3	
Virovitičko-podravaska / Virovitica Podravina	1	
Osječko-baranjska / Osijek Baranja	1	
Vukovarsko-srijemska / Vukovar Srijem	1	
Dubrovačko-neretvanska / Dubrovnik Neretva	2	
Istarska / Istria	3	
Splitsko-dalmatinska / Split Dalmatia	1	
Šibensko-kninska / Šibenik Knin	1	

* retrospektivno je u arhiviranom uzorku iz 2010. g. dokazana infekcija s HEV-3 u bolesnika iz Dubrovnika / retrospectively confirmed HEV-3 infection from archived sample from the year 2010 in the patient from Dubrovnik; # WB, Western blot = potvrdni test za dokaz protutijela / confirmatory antibody assay; ### RNK, dokaz HEV-3 / HEV-3 confirmation

na anti-HEV-protutijela nađena su u 175 (15,8%) od 1107 testiranih bolesnika (tablica 1.). Reaktivni anti-HEV u EIA-testu imalo je 98 žena i 77 muškaraca u dobi od 16 do 90 godina (medijan 50 godina). Nalaz anti-HEV nije potvrđen u 58 od 175 (33,1%) bolesnika, što je definirano kao negativan, odnosno lažno pozitivan rezultat. Pozitivna protutijela anti-HEV-IgM, kao pokazatelj moguće akutne infekcije, imalo je 25 (2,3%) bolesnika – 14 je imalo pozitivan samo IgM, a 11 istodobno IgM i IgG. Serumi s pozitiv-

nim anti-HEV-IgM testirani su na HEV RNK. Pozitivan nalaz HEV RNK imalo je 10 bolesnika (tablica 1.). Svi bolesnici s dokazanom viremijom imali su jasan serološki odgovor na akutnu infekciju. Bolesnici s dokazanom akutnom HEV-infekcijom u obrađenom razdoblju nisu bili hospitalizirani, što upućuje na blagu kliničku prezentaciju bolesti. U 2012. godini autohtoni HEV-3 dokazan je u pet bolesnika, 2013. u tri te 2014. godine u dva bolesnika. Raspodjela bolesnika s pozitivnim protutijelima anti-HEV prema prebivalištu prikazana je u tablici 2.

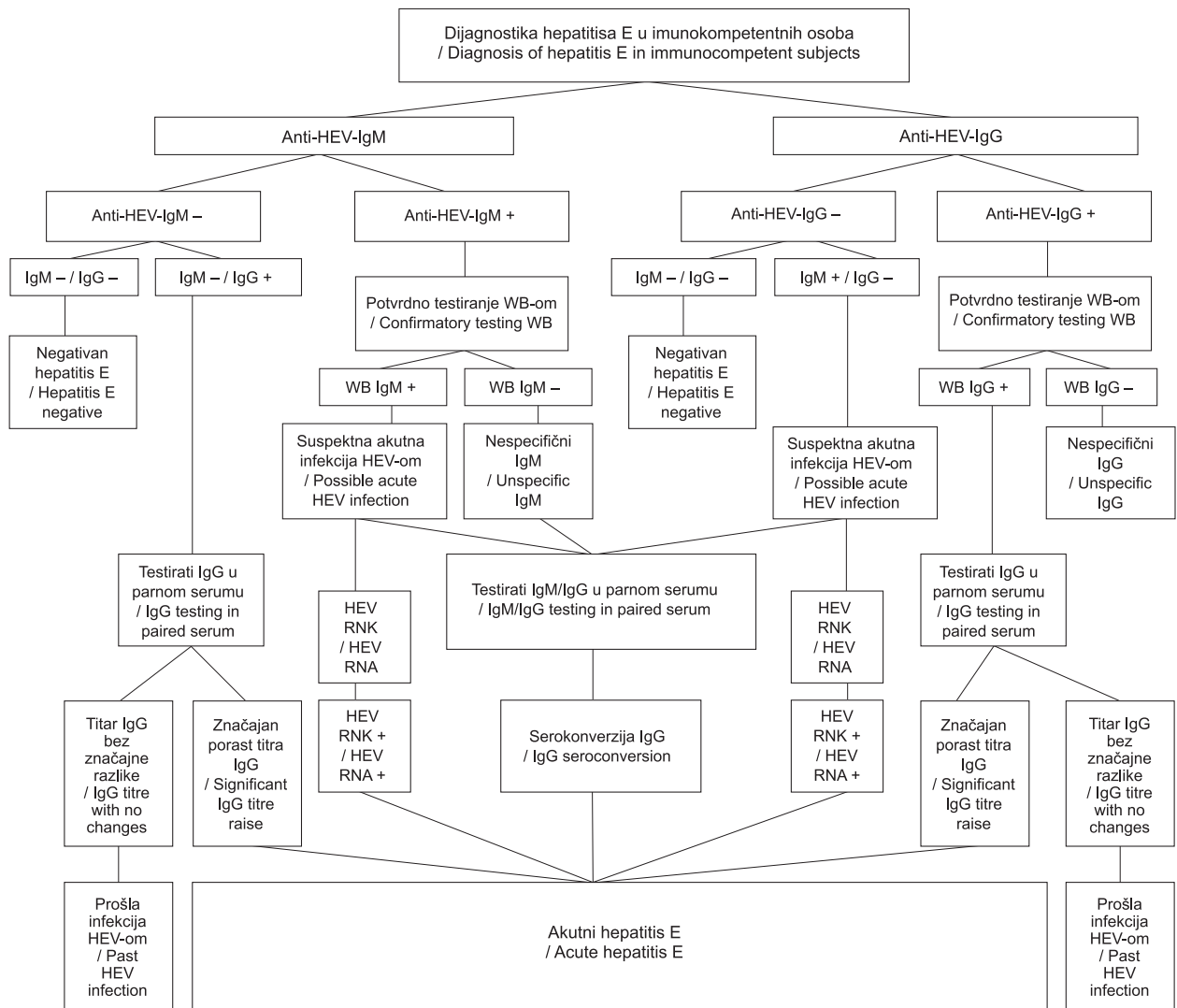
Rasprava

U Hrvatskoj je hepatitis E bolest koja je u sustavu obveznog prijavljivanja zaraznih bolesti od 1994. godine.⁹ Prvi slučajevi hepatitisa E opisani su 2002. godine u dva bolesnika nakon povratka iz Indije.⁵⁴ Do 2011. g. prijavljivao se jedan do dva importirana slučaja na godinu.⁹ Početkom 2012. godine na Odjelu za virusologiju Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu, gdje se rutinski radi serološka dijagnostika HE, u kratkom razmaku uočeno je nekoliko bolesnika koji su prema nalazima protutijela anti-HEV-IgM i IgG imali kriterije za akutni hepatitis E, a nisu imali epidemiološki podatak o putovanju u hiperendemska područja.¹¹ Tijekom 2009. i 2010. g. u Hrvatskome veterinarskom institutu (HVI) provedeno je istraživanje HEV-a na velikom broju životinja – domaćoj svinji (*Sus scrofa domestica*), divljoj svinji (*Sus scrofa L.*), govedu (*Bos taurus*), srni (*Capreolus capreolus*), jelenu (*Cervus elaphus*), muflonu (*Ovis musimon*), kuni (*Martes martes*), tvorcu (*Mustela putorius Linnaeus*), lisici (*Vulpes vulpes*), kokoši (*Gallus gallus domesticus*), dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*), kamenicama (*Ostrea edulis*). Seroprevalencija HEV-a na svinjogojkim farmama jako je visoka (do 91,7%). Prisutnost autohtonog HEV-genotipa 3 (HEV-3) bila je dokazana u domaćih (do 75% ispitanih tovljenika) i divljih svinja (28,6 – 31,3%).³⁸⁻⁴⁰ Uspostavljena je suradnja s HVI za molekularnu dijagnostiku HEV-a u ljudi i dokazan autohtoni HEV-3, *Orthohepevirus A* genotipa 3, u bolesnika s akutnim hepatitisom E. Filogenetskom analizom sojeva HEV-a izdvojenih iz ljudi te domaćih i divljih svinja nađena je visoka genska podudarnost koja u nekih izolata iznosi i 100%, što upućuje na međuvrtni prijenos virusa ili zajednički izvor infekcije.

Podaci o kliničkim manifestacijama HE većinom su rezultat istraživanja hidričnih epidemija iz hiperendemskih područja gdje prevladava HEV-1 te posljednjih desetljeća iz opisa autohtonih slučajeva iz Europe, Sjeverne Amerike, Novog Zelanda i Japana gdje prevladava HEV-3. Nove spoznaje o sposobnosti HEV-3 da prijeđe u kronični oblik bolesti u imunosuprimiranih, posebno transplantiranih, bolesnika postavljaju HE kao javnozdravstveni problem.^{2-5,55-58}

U neendemskim područjima HE koji uzrokuju HEV-3 i HEV-4 ne razlikuje se bitno od glavnih kliničkih manifestacija u infekciji HEV-1. Infekcije HEV-3 pojavljuju se sporadično uz blagi klinički tijek, često bez simptoma. U trudnica nisu poznate komplikacije kao ni fulminantni tijek bolesti.^{23,26,42}

Dok je u većine bolesnika bolest blaga i samoograničavajuća, u imunosuprimiranih bolesnika infekcija s HEV-3 može perzistirati. Ako je viremija prisutna dulje od 6 mjeseci, bolest se definira kao kronični hepatitis E.⁵⁹ Posebno rizične skupine za progresiju u kronični HE jesu bolesnici nakon transplantacije solidnih organa pod imunosupresivnom terapijom, hematološki bolesnici te osobe zaražene HIV-om s niskom razinom CD4+ limfocita T. Za razliku od



Slika 1. Smjernice za dijagnostiku hepatitisa E u imunokompetentnih bolesnika
Figure 1 Hepatitis E diagnostic guidelines for immunocompetent patients

HEV-3 virusi HEV-1 i HEV-2 nisu potvrđeni kao uzročnici kroničnog hepatitisa.^{49,50,56-62}

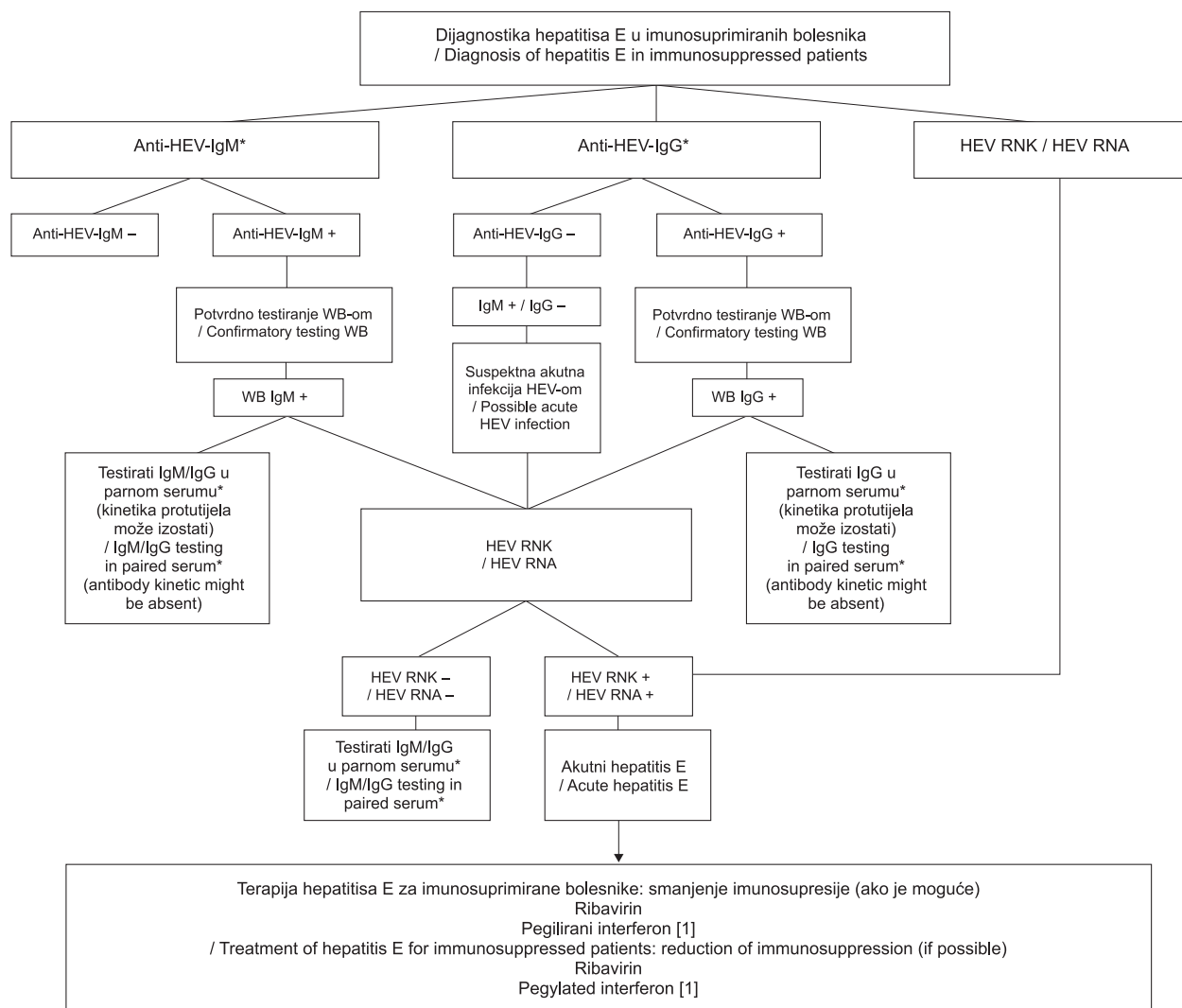
Rizični čimbenici za nastanak kroničnog HE jesu oštećenje imunskog sustava u uznapredovaloj fazi imunodeficijencije i sniženi broj CD2+, CD3+ i CD4+ limfocita T. Kronični HE najčešće je asimptomatski uz blago povišene jetrene enzime. Međutim, dugotrajna je prognoza loša. Progresa kroničnog HE u jetrenu fibrozu i cirozu te dekompenzaciju može završiti letalno. Veći rizik od lošeg ishoda bolesti uz mortalitet do 70% imaju osobe s prethodnim kroničnim hepatitisom, a progresiji HEV-a pridonosi i konzumacija alkohola.^{1,50,56-58,60,63}

Učestalost HE u osoba zaraženih HIV-om s očuvanim brojem CD4+ limfocita T ne razlikuje se znatno od učestalosti u općoj populaciji.^{62,64-67} Zabilježena je veća prevalencija HE u muškaraca koji imaju spolne odnose s drugim muškarcima, premda spolni put prijenosa nije dokazan.^{68,69} Serološkim testiranjem 88 osoba zaraženih HIV-om u Hrvatskoj dokazana protutijela anti-HEV-IgG imao je samo jedan (1,1%) ispitanik. U HIV-bolesnika s infekcijama EBV-om, CMV-om i sifilisom uočen je problem lažno pozitivnih odgovora anti-HEV u testu EIA koji nisu potvrđeni

testom WB-a.¹¹ Stoga je nužno testiranje u dva koraka, porbnim i potvrdnim testovima.

Svi bolesnici s dokazanim hepatitisom E u Hrvatskoj imali su blag klinički tijek bolesti¹⁰ (usmeno priopćenje dr. Nenada Pandaka). Retrospektivnom analizom arhiviranog uzorka iz 2010. godine bolesnika iz Dubrovnika (usmeno priopćenje dr. Ljiljane Betica Radić) koji nije putovao u hiperendemska područja, dokazan je akutni hepatitis E – pozitivna protutijela anti-HEV-IgM i IgG te HEV RNK. Izvor infekcije je nepoznat, ali upućuje na prisutnost HEV-a u Hrvatskoj i prije 2012. godine. Autohtoni hepatitis E zabilježeni su u svim županijama osim u Zadarsko-kninskoj (tablica 1.). U pilot-studiji odabranih ispitanika iz Kliničke psihijatrijske bolnice Vrapče utvrđena je prevalencija anti-HEV-IgG u 1/37 (2,7%) zdravstvenih radnika; 3/49 (6,1%) intravenskih korisnika droga; 5/56 (8,9%) alkoholičara; 0/37 osoba s visokorizičnim spolnim ponašanjem; 3/35 (8,6%) osoba s posttraumatskim stresnim sindromom nakon rata.⁷⁵

U Hrvatskoj je u svih bolesnika dokazan HEV-3. O izvorima i putovima prijenosa može se samo nagađati kao i u ostalim europskim zemljama. Visoka učestalost HEV-a



(*Anti-HEV-IgM i IgG mogu se određivati kao za imunokompetentne bolesnike (slika 1.) uz ispravnu interpretaciju nalaza s obzirom na imunosupresiju i utjecaj terapije transfuzijskim preparatima. / *Anti-HEV IgM and IgG might be detected as in immunocompetent patients (fig. 1) with properly results interpretation according to immunosuppression and the impact of blood transfusion therapy.*)

Slika 2. Smjernice za dijagnostiku i liječenje hepatitisa E u imunosuprimiranih bolesnika
Figure 2. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatitis E in immunosuppressed patients

među divljim i domaćim svinjama te jelenima mogući je rizik od infekcije, a ne može se zanemariti ni značenje uvezenih svinja, posebno ako se konzumira sirovo i nedovoljno termički obrađeno meso.³⁸⁻⁴¹ Dosadašnja istraživanja potvrđuju prisutnost HEV-3 u Hrvatskoj i upućuju na potrebu uključivanja hepatitisa E u dijagnostički algoritam virusnih hepatitisa. Stoga predlažemo smjernice za dijagnostiku i liječenje hepatitisa E u imunokompetentnih i imunosuprimiranih bolesnika (slike 1. i 2.).

Nalaz anti-HEV-IgM kao jedini pozitivni parametar nije siguran dokaz akutnog HE zbog mogućih nespecifičnih reakcija u testovima.^{11,82,84,85} Dijagnostički izazov je križni odgovor protutijela na druge hepatotropne viruse kao što su Epstein-Barrin virus (EBV), citomegalovirus (CMV) ili HAV, što smo objavili i u svojim rezultatima.^{11,86-89} U akutnom HE bilježi se niska korelacija nalaza HEV RNK i anti-HEV-IgM, što može biti problem. HEV RNK je pozitivna u svega 13% uzoraka s pozitivnim nalazom IgM i potvrđenom akutnom infekcijom. Da bi se potvrdila akutna

HEV-infekcija, obavezno valja testirati parne serume koji su uzeti u razmaku od 1 do 2 tjedna i pratiti dinamiku stvaranja anti-HEV-IgG. Svaki pozitivni nalaz primarnog testiranja potrebno je potvrditi metodom Western blota (WB).⁸³ Testovi WB-a temelje se na prikazu protutijela usmjerenih prema specifičnim antigenima čime se uklanjaju nespecifične reakcije i osigurava veća specifičnost. U serumima s pozitivnim anti-HEV-IgM trebalo bi pokušati dokazati HEV RNK. Među našim ispitanicima 10 od 25 bolesnika s akutnim HE imalo je dokazanu HEV RNK. Za definiranje značenja IgM i dijagnozu akutne infekcije potrebno je u novom serumu dokazati serokonverziju ili značajan porast titra IgG, posebno ako je nalaz HEV RNK negativan. Značenje HEV RNK, kao i anti-HEV-IgM i IgG treba evaluirati prema trajanju bolesti i imunskom statusu bolesnika. Za optimalno utvrđivanje etiologije hepatitisa E nužno je kombiniranje različitih mikrobioloških metoda.

Liječenje akutnog hepatitisa E u imunokompetentnih osoba je simptomatsko budući da spontano dolazi do izlje-

čenja. Ako se razviju teški oblici bolesti, liječenje se provodi ribavirinom. U liječenju se može rabiti i pegilirani interferon alfa.^{1,2,5,23,57,70,90} Kronične infekcije u imunosuprimiranih bolesnika obavezno treba liječiti. Liječenje primarno započinje sniženjem razine imunosupresije ako je moguće, što je u većine bolesnika dovoljno za supresiju viremije. Antivirusna terapija kroničnog HE provodi se ribavirinom (600 – 1000 mg na dan) tijekom 3 mjeseca.

Cjepivo protiv HEV-1 (Hecolin®) pripremljeno je 2012. godine u Kini. Čini se da ono nije genotipski specifično budući da se pokazala učinkovitost protiv HEV-4, što upućuje na moguću križnu zaštitu protiv različitih genotipova. Cjepivo nije licencirano u Europi i Americi.^{91–94}

Prevenција HE na putovanjima u hiperendemska područja uključuje stroge higijenske mjere, posebno pri konzumaciji hrane i pića. Preporučuju se prokuhavanje vode za piće i mjere osobne higijene. Treba izbjegavati konzumaciju sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa, posebno svinjskog i školjaka. Važna je higijena ruku zbog izlučivanja virusa stolicom. Većina bolesti prolazi brzo i često se otkrije samo slučajno.

Zaključak

Hepatitis E je dokazana autohtona zoonoza u Hrvatskoj koju uzrokuje *Orthohepevirus A* genotipa 3 (HEV-3). Izdvojeni sojevi u životinja i ljudi genski su bliski. Seroprevalencija HEV-a u bolesnika s oštećenjem jetre je 11%, a pokazatelje akutne bolesti imalo je 2,3% ispitanika. Zbog blage kliničke slike i samoograničavajućeg tijeka akutne infekcije većina bolesnika ostane nedijagnosticirana ili pogrešno dijagnosticirana kao toksično oštećenje jetre. Zbog mogućnosti kroničnog tijeka i komplikacija važno je prepoznati HEV-infekciju u bolesnika s transplantiranim organima, čiji broj u Hrvatskoj zbog uspješnoga transplantacijskog programa kontinuirano raste. Primljena predložena smjernica riješit će brojne diferencijalnodijagnostičke dvojbe te pokazati je li hepatitis E doista emergentna bolest u Hrvatskoj.

LITERATURA

- Kamar N, Izopet J, Dalton HR. Chronic hepatitis E virus infection and treatment. *J Clin Exp Hepatol* 2013;3:134–40.
- Dalton HR, Pas SD, Madden RG, van der Eijk AA. Hepatitis e virus: current concepts and future perspectives. *Curr Infect Dis Rep* 2014;16:399.
- Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:116–38.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F i sur. Hepatitis E. *Lancet* 2012;379:2477–88.
- Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol* 2015;2015:872431.
- Aggarwal R. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:72–82.
- Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis* 2013;17:e228–33.
- Blasco-Perrin H, Abravanel F, Blasco-Baque V, Peron JM. Hepatitis E, the neglected one. *Liver Int* 2016;36(Suppl 1):130–4.
- Communicable Disease Surveillance in Croatia. Croatian Institute of Public Health. *Epidemiol News* 2012;4:2–4.
- Čivljak R, Rode Đaković O, Jemersić L, Topić A, Turalija I, Čačić I, Kuzman I. Autochthonous hepatitis E in patient from Zagreb: a case report. *Croat J Infection* 2013;33:35–39.
- Daković Rode O, Jemersić L, Brnić D i sur. Hepatitis E in patients with hepatic disorders and HIV-infected patients in Croatia: is one diagnostic method enough for hepatitis E diagnosis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:2231–6.
- Smith DB, Simmonds P, Jameel S i sur. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 2014;95:2223–32.
- Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818–24.
- Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980;2:876–9.
- Balayan MS, Andjaparadze AG, Savinskaya SS i sur. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23–31.
- Viswanathan R, Sidhu AS. Infectious hepatitis; clinical findings. *Indian J Med Res* 1957;45:49–58.
- Arankalle VA, Ticehurst J, Sreenivasan MA i sur. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988;1:550–4.
- Caron M, Nouf V, Than SC, Dellamonica L, Buisson Y, Nicand E. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 2006;44:3440–2.
- Dalton HR, Bendall RP, Rashid M i sur. Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:1200–5.
- Lapa D, Capobianchi MR, Garbuglia AR. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries. *Int J Mol Sci* 2015;16:25711–43.
- Tesse S, Lioure B, Fornecker L i sur. Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in Europe: first autochthonous hepatitis E infection in France. *J Clin Virol* 2012;54:197–200.
- Sehgal D, Thomas S, Chakraborty M, Jameel S. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virology* 2006;338.
- Pérez-Gracia MT, García M, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol* 2015;3:117–26.
- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 2008;33:451–64.
- Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 2012;142:1388–1397.e1.
- Pischke S, Behrendt P, Bock CT, Jilg W, Manns MP, Wedemeyer H. Hepatitis E in Germany—an under-reported infectious disease. *Dtsch Arztebl Int* 2014;111:577–83.
- Price J. An update on hepatitis B, D, and E viruses. *Top Antivir Med* 2014;21:157–63.
- Shata MT, Daef EA, Zaki ME i sur. Protective role of humoral immune responses during an outbreak of hepatitis E in Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106:613–8.
- FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 2010;28:583–8.
- Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 2007;13:648–9.
- Teshale EH, Hu DJ. Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol* 2011;3:285–91.
- 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.
- Aggarwal R. Hepatitis E virus and person-to-person transmission. *Clin Infect Dis* 2010;51:477–8; author reply 478–9.
- Aggarwal R. Hepatitis E and pregnancy. *Indian J Gastroenterol* 2007;26:3–5.
- Srivastava R, Aggarwal R, Sachdeva S, Alam MI, Jameel S, Naik S. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:306–11.
- Bose PD, Das BC, Kumar A, Gondal R, Kumar D, Kar P. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* 2011;54:1107–13.
- Miyamura T. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res* 2011;161:40–6.
- Prpic J, Cerni S, Skoric D i sur. Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol* 2015;7:195–205.
- Jemersić L, Roić B, Balatincec J, Keros T. Hepatitis E – are we at risk? (Croatian). *Veterinarska stanica (Veterinary outpost)* 2010;41:383–397.
- Lipej Z, Novosel D, Vojta L, Roić B, Simpraga M, Vojta A. Detection and characterisation of hepatitis E virus in naturally infected swine in Croatia. *Acta Vet Hung* 2012;61:517–28.
- Cerni S, Prpic J, Jemersić L, Skoric D. The application of single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in determining Hepatitis E virus intra-host diversity. *J Virol Methods* 2015;221:46–50.
- Nelson KE, Kmush B, Labrique AB. The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:1133–48.
- Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1358–60.
- Brassard J, Gagne MJ, Genereux M, Cote C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:3763–6.
- Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern

- Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol* 2011;52:50–4.
46. Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R i sur. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 2013;19:264–6.
 47. Krumbholz A, Mohn U, Lange J i sur. Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med Microbiol Immunol* 2012;201:239–44.
 48. Christensen PB, Engle RE, Hjort C i sur. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis* 2008;47:1026–31.
 49. Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, Hayasaka K, Kawabata M, Shimizu T. Chronic hepatitis E: a review of the literature. *J Viral Hepat* 2014;21:78–89.
 50. Pas SD, de Man RA, Mulders C i sur. Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2012;18:869–72.
 51. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C i sur. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2010;16:74–82.
 52. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Meth* 2006;131:65–71.
 53. van der Poel CL. Nucleic acid testing: the international status of NAT. *Transfus Clin Biol* 2001;8:240–1.
 54. Palmovic D, Lukas D, Vince A, Kurelac I. Hepatitis E kod putnika u Indiju. *Liječ Vjesn* 2002;124:313–4.
 55. Kamar N, Selves J, Mansuy JM i sur. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008;358:811–7.
 56. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S i sur. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis* 2014;209:1900–6.
 57. Wang Y, Metselaar HJ, Peppelenbosch MP, Pan Q. Chronic hepatitis E in solid-organ transplantation: the key implications of immunosuppressants. *Curr Opin Infect Dis* 2014;27:303–8.
 58. Parvez MK. Chronic hepatitis E infection: risks and controls. *Intervirology* 2013;56:213–6.
 59. Bihl F, Negro F. Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble? *J Hepatol* 2009;50:435–7.
 60. Maylin S, Stephan R, Molina JM i sur. Prevalence of antibodies and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. *J Clin Virol* 2012;53:346–9.
 61. Mikolasevic I, Sladoje-Martinovic B, Orlic L i sur. Evaluacija virusnih hepatitisu a transplantaciji solidnih organa [Evaluation of viral hepatitis in solid organ transplantation]. *Acta Med Croat* 2014;68:151–9.
 62. Sellier P, Mazon MC, Tesse S i sur. Hepatitis E virus infection in HIV-infected patients with elevated serum transaminases levels. *Virol J* 2011;8:171.
 63. Pischke S, Greer M, Hardtke S i sur. Course and treatment of chronic hepatitis E virus infection in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2014;16:333–9.
 64. Pischke S, Ho H, Urbanek F i sur. Hepatitis E in HIV-positive patients in a low-endemic country. *J Viral Hepat* 2010;17:598–9.
 65. Hassing RJ, van der Eijk AA, Lopes VB i sur. Hepatitis E prevalence among HIV infected patients with elevated liver enzymes in the Netherlands. *J Clin Virol* 2014;60:408–10.
 66. Mateos-Lindemann ML, Diez-Aguilar M, Galdamez AL, Galán JC, Moreno A, Pérez-Gracia MT. Patients infected with HIV are at high-risk for hepatitis E virus infection in Spain. *J Med Virol* 2014;86:71–4.
 67. Keane F, Gompels M, Bendall R i sur. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med* 2012;13:83–8.
 68. Payne BA, Medhi M, Ijaz S i sur. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2013;19:333–5.
 69. Renou C, Lafeuillade A, Cadranel JF i sur. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS* 2010;24:1493–9.
 70. Kamar N, Izopet J, Tripon S i sur. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 2014;370:1111–20.
 71. Pischke S, Behrendt P, Manns MP, Wedemeyer H. HEV-associated cryoglobulinaemia and extrahepatic manifestations of hepatitis E. *Lancet Infect Dis* 2014;14:678–9.
 72. Moal V, Gerolami R, Colson P. First human case of co-infection with two different subtypes of hepatitis E virus. *Intervirology* 2012;55:484–7.
 73. Bazerbachi F, Haffar S, Garg SK, Lake JR. Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2015.
 74. Kamar N, Bendall RP, Peron JM i sur. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis* 2011;17:173–9.
 75. Vilibic-Cavlek T, Vilibic M, Kolaric B, Jemersic L, Kucinar J, Barbic L, Bagaric A, Stevanovic V, Tabain I, Sviben M, Jukic V, Mlinaric-Galinovic G. Seroepidemiology of Hepatitis E in Selected Population Groups in Croatia: A Prospective Pilot Study. *Zoonoses Public Health* 2016; doi: 10.1111/zph.12254.
 76. Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 2011;161:84–92.
 77. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:24–33.
 78. Wu WC, Su CW, Yang JY, Lin SF, Chen JY, Wu JC. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J Med Virol* 2014;86:720–8.
 79. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S i sur. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol* 2013;58:624–8.
 80. Schnegg A, Burgisser P, Andre C i sur. An analysis of the benefit of using HEV genotype 3 antigens in detecting anti-HEV IgG in a European population. *PLoS One* 2013;8:e62980.
 81. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Jilg W. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates. *J Infect Dis* 2013;207:497–500.
 82. Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM i sur. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:772–4.
 83. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:562–8.
 84. Drobeniuc J, Meng J, Reuter G i sur. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangentotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis* 2010;51:e24–7.
 85. Dalton HR, Stableforth W, Hazeldine S i sur. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: a comparison with hepatitis A. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:579–85.
 86. Tappe D, Muller A, Ziegler U i sur. Positive hepatitis E and Epstein-Barr virus serology in a patient with jaundice after travel. *J Clin Virol* 2010;48:78–81.
 87. Fogeda M, de Ory F, Avellon A, Echevarria JM. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol* 2009;45:259–61.
 88. Ghinoui M, Naveau S, Barri-Ova N, Thauray J, Grangeot-Keros L, Perlemuter G. Acute hepatitis E infection associated with a false-positive serology against Epstein-Barr virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1433–5.
 89. Jang JH, Jung YM, Kim JS i sur. Coexistence of IgM antihepatitis A virus and IgM antihepatitis E virus in acute viral hepatitis: a prospective, multicentre study in Korea. *J Viral Hepat* 2011;18:e408–14.
 90. Thomas DL. A case for ribavirin to treat chronic hepatitis E. *N Engl J Med* 2014;370:1162–3.
 91. Zhang J, Li SW, Wu T, Zhao Q, Ng MH, Xia NS. Hepatitis E virus: neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity. *Rev Med Virol* 2012;22:339–49.
 92. Zhao Q, Zhang J, Wu T i sur. Antigenic determinants of hepatitis E virus and vaccine-induced immunogenicity and efficacy. *J Gastroenterol* 2013;48:159–68.
 93. Labrique AB, Sikder SS, Krain LJ i sur. Hepatitis E, a vaccine-preventable cause of maternal deaths. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1401–4.
 94. Wedemeyer H, Pischke S. Hepatitis: Hepatitis E vaccination—is HEV 239 the breakthrough? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:8–10.