

# INFEÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C EM PORTADORES CRÓNICOS ASSINTOMÁTICOS DO ANTIGÉNIO HBs

HENRIQUE BARROS, H. PESSEGUEIRO MIRANDA, F. SILVESTRE

Serviço de Gastroenterologia, Serviço de Medicina 1, Serviço de Anatomia Patológica. Hospital Geral de Santo António: Serviço de Higiene e Epidemiologia. Faculdade de Medicina do Porto. Porto

## RESUMO

O objectivo do estudo foi avaliar a prevalência, a incidência e o significado clínico da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em portadores crónicos assintomáticos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), combinando a análise dos soros armazenados com o estudo prospectivo de uma coorte de indivíduos com infecção crónica pelo vírus da hepatite B. Os doentes foram avaliados no Hospital de Santo António (Porto), tendo-se estudado 183 portadores crónicos assintomáticos do HBsAg, detectados por rastreio e seguidos durante um período de 3,8 anos. Os soros obtidos à data da identificação dos casos e ao longo do *follow-up* foram analisados para o HCV por ELISA, sendo os positivos avaliados também por RIBA de segunda geração (Ortho). Os dados demográficos foram obtidos por inquérito. A prevalência de infecção pelo HCV em casos HBsAg positivo, avaliada através de uma prova ELISA para anticorpos anti-HCV, foi 2,7% (intervalo de confiança a 95% 1,2%-6,3%), sendo mais elevada no sexo masculino do que no feminino (3,1% vs 1,8%,  $p=0,52$ ) e superior à descrita para dadores voluntários de sangue da região do Porto. Dos 5 casos ELISA positivo só eram também positivos por RIBA. De todas as características avaliadas, apenas a toxicod dependência se associava significativamente com a infecção pelo HCV ( $p=0,027$ ). Ao longo do período de observação não se detectou nenhum caso novo de positividade. Conclusões: A prevalência da infecção pelo HCV, nestes indivíduos assintomáticos com infecção crónica pelo vírus da hepatite B, foi superior à observada em dadores de sangue mas muito inferior à referida noutros estudos em doentes com hepatite B crónica. A infecção pelo HCV não se revelou responsável pela frequência e pelo tipo de lesões histológicas detectadas nestes portadores crónicos do HBsAg.

## SUMMARY

Hepatitis C virus antibodies in asymptomatic chronic carriers of hepatitis B surface antigen

The objectives of the study were to evaluate the prevalence, the incidence and the clinical significance of antibodies to hepatitis C virus in HBsAg chronic carriers. The evaluation of Stored sera was combined with the follow-up of a cohort of cases observed in a referral-based university hospital. A total of 183 HBsAg asymptomatic chronic carriers were identified during routine screening and followed for a mean period of 3.8 years. Stored sera and sera obtained during follow-up were tested for anti-HCV using ELISA. Second generation RIBA (Ortho) was used as a possible confirmatory test. Demographic data and risk factors were assessed using a standard questionnaire. The prevalence of HCV infection in HBsAg chronic carriers was 2.7% (95% CI: 1.2%-6.3%), higher in male than female (3.1% vs 1.8%,  $p=0.52$ ) and also higher than the one found in voluntary blood donors from the same region. Only 3 out of 5 ELISA-positive cases were RIBA-positive. Patients positive for both types of virus more frequently admitted drug abuse. The presence of anti-HCV was not significantly related to the histologic severity. During follow-up no new cases of infection were found. Conclusions: The prevalence of HCV infection in asymptomatic chronic carriers is higher than in blood donors but lower than previously reported for other populations of chronic hepatitis B cases. HCV infection was not found responsible for the frequency or the type of lesions observed in these HBsAg chronic carriers.

## INTRODUÇÃO

Desde que se pôde evidenciar de maneira inequívoca a existência de hepatites agudas e crónicas ocorrendo na ausência de marcadores séricos de infecção pelos vírus da hepatite B (HBV), da hepatite A<sup>1,2</sup> ou de outros agentes víricos conhecidos, e após exclusão de causas tóxicas, metabólicas ou auto-imunitárias, diferentes estudos epidemiológicos realçaram semelhanças entre a hepatite B e algumas dessas formas de hepatite designadas por não-A, não-B (NANB). Nos países ocidentais, a importância das hepatites NANB foi especialmente reconhecida em relação com as transfusões de sangue ou dos seus derivados mas numa proporção elevada dos casos diagnosticados não havia história de transfusões nem risco aparente de transmissão parentérica<sup>3</sup>. Recentemente, foi possível caracterizar o genoma de um agente responsável pela maioria, senão pela totalidade, das infecções NANB transmitidas por via parentérica, designado por vírus de hepatite C (HCV), e desenvolver provas serológicas para a identificação de anticorpos anti-HCV<sup>4,5</sup>.

Com as sucessivas gerações de técnicas laboratoriais disponíveis<sup>6</sup>, foi possível confirmar que, tal como acontece com o

HBV, o HCV é transmitido por via parentérica mas também está frequentemente presente na ausência de história de transfusões, hemodiálise, uso intravenoso de drogas ilícitas ou exposição profissional<sup>7,8</sup>. É possível que a transmissão sexual ou familiar possa desempenhar um papel importante na manutenção da infecção mas não há ainda estudos que permitam quantificar de forma conclusiva o risco de infecção pelo HCV nestas circunstâncias<sup>10</sup>.

As semelhanças epidemiológicas fariam supor que a infecção pelo HCV fosse frequentemente detectada em indivíduos com infecção pelo HBV. De facto, os estudos iniciais<sup>11-16</sup> mostraram uma prevalência elevada de anti-HCV em doentes positivos para o antígeno de superfície do HBV, (HBsAg), sugerindo mesmo que o HCV suprimiria a replicação do HBV, associando-se a sua presença conjunta a lesões hepáticas mais graves<sup>14,15</sup>. Também em Portugal, num grupo de 121 doentes com hepatite crónica B foi descrita uma prevalência de anti-HCV, por ELISA de primeira geração, de 16,4%<sup>16</sup>.

No presente trabalho pretendemos avaliar a prevalência e o eventual significado clínico de anticorpos anti-HCV em portadores crónicos assintomáticos de HBsAg, bem como a incidência

da infecção pelo HCV após a identificação do estado de portador crónico de HBsAg.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Foram estudados 183 portadores crónicos assintomáticos do HBsAg, identificados por rastreio familiar, durante dádivas voluntárias de sangue, no período pré-natal ou em exames de rotina. Apenas foram incluídos casos detectados antes do início da pesquisa sistemática do anti-HCV, para evitar o *bias* de selecção que de outro modo resultaria. A todos foi realizado um inquérito pormenorizado para avaliação de os factores de risco para as infecções pelo HBV e pelo HCV. Nenhum doente admitiu comportamento homossexual ou bissexual. O tempo médio de *follow-up* foi de 3,8 anos (âmbito 16 meses e 64 meses), correspondendo a 695 pessoas-ano.

A pesquisa do anti-HCV foi efectuada retrospectivamente em soros conservados a -20 °C não previamente descongelados, obtidos à data da identificação dos casos. Igualmente foram analisados soros recolhidos ao longo do tempo de acompanhamento dos doentes.

Os parâmetros bioquímicos foram obtidos por técnicas automatizadas em uso de rotina. O hialuronato (HA) foi doseado por um método radiométrico sequencial (Pharmacia HA Test, Uppsala, Suécia), baseado num ensaio competitivo. Os marcadores séricos de infecção pelo HBV e pelos vírus da hepatite delta (HDV) e da imunodeficiência humana (HIV1 e HIV2) foram pesquisados por micro-ELISA (ORGANON TEKNIKA ou BEHRING). O anti-HCV foi pesquisado por ELISA (primeira e segunda geração) e os casos positivos, bem como uma amostra dos negativos, avaliados por *Recombinant immuniblot assay* (RIBA) de segunda geração (ORTHO DIAGNOSTIC).

Em 86 (47%) doentes foi realizada biópsia hepática. Os achados histológicos foram classificados de acordo com as recomendações de um grupo internacional e pontuados segundo o índice de actividade proposto por Knodell<sup>17,18</sup>. O antigénio do *core* do HBV (HBeAg) foi pesquisado, em cortes fixados, por imuno-histoquímica (complexo avidina-biotina).

A análise dos resultados foi efectuada usando o programa Epi Info<sup>19</sup>. As variáveis contínuas foram comparadas pelo método de Wilcoxon e as frequências pela prova exacta de Fisher. As associações foram avaliadas pelo cálculo dos *odds ratio* (OR) e respectivos intervalos de confiança a 95%.

**RESULTADOS**

Foram avaliados 183 portadores crónicos assintomáticos do HBsAg, 56 mulheres e 127 homens, com idades médias ± desvio padrão de respectivamente 30,1±10,9 e 32,6±11,5 anos (p=0,19). O anti-HDV e os anticorpos para o HIV1 e HIV2 estavam ausentes em todos os casos. No conjunto dos portadores crónicos do HBsAg, o HBeAg estava presente em 34 (18,6%) e a actividade das transaminases estava elevada em 59 (32,2%).

O anti-HCV, pesquisado por ELISA, estava presente em 5 casos (2,7%, intervalo de confiança a 95%: 1,2% — 6,3%). A comparação das prevalências do anti-HCV em homens (4/127, 3,1%, intervalo de confiança a 98%: 1,2 — 8,0%) e mulheres (1/56, 1,8%, intervalo de confiança a 95%: 0,3% — 9,7%) não revelou diferenças significativas entre os sexos (p=0,52). Os cinco casos positivos (4 homens e 1 mulher) apresentaram reactividade nas provas ELISA de primeira e segunda geração; 3 foram igualmente positivos por RIBA, um era indeterminado (o único caso do sexo feminino) e o outro negativo. O RIBA foi também negativo em 34 casos nos quais as provas ELISA não tinham sido positivas. Admitindo como positivos verdadeiros apenas aqueles em que a pesquisa de anti-HVC é confirmada por RIBA, a prevalência de infecção pelo HCV em portadores crónicos do HBsAg foi apenas de 1,5% (3/183%), intervalo de confiança a 95: 0,5%-4,8%).

Não se observou nenhum caso novo de positividade para o anti-HCV ao longo do tempo de *follow-up*. O intervalo de confiança a 95% para a incidência observada (0/695) varia entre 0 e 0,1 \*10<sup>-3</sup> ano<sup>-1</sup>.

Na quadro 1 apresentam-se as características demográficas, bioquímicas, serológicas e histológicas dos casos estudados, de acordo com o resultado da pesquisa de anti-HCV por ELISA. Dado o reduzido número de indivíduos positivos não se compararam separadamente os casos de acordo com a reactividade RIBA. Nesta coorte de portadores crónicos do HBsAg apenas o uso intravenoso de drogas ilícitas foi significativamente mais frequente nos anti-HVC positivo, não se tendo detectado diferenças significativas em relação aos restantes parâmetros avaliados.

**QUADRO 1 – Características demográficas, bioquímicas e serológicas de 183 portadores crónicos do HBsAg, em relação com o resultado da pesquisa de anticorpos para o HCV (ELISA)**

	HCV positivo n=5	HCV negativo n=178	p	OR (IC a 95%)
Idade	30,2±3,7	31,8±11,5	0,98	1,8 (0,2-90)
M/F	4/1	123/55	0,52	2,0 (0,2-99)
Casados	4/5	119/178	0,47	0,0 (0,0-10)
Tatuagens	0/5	18/178	0,59	0,0 (0,0-21)
Transfusões	0/5	2/178	0,94	
Drogas iv	1/5	0/178	0,027	
ALT <sup>†</sup>	49,2±20,1	45,1±48,3	0,14	
AST <sup>†</sup>	33,0±7,0	32,7±21,7	0,20	
γGT <sup>†</sup>	26,4±12,0	31,4±39,9	0,60	
Bilirrubina <sup>‡</sup>	0,6±0,0	0,7±0,3	0,82	
Albumina <sup>‡</sup>	52,6±6,0	47,0±3,0	0,22	
Glob. Gama <sup>‡</sup>	10,0±2,4	10,5±2,7	0,78	
Hialuronato <sup>‡</sup>	13,7±3,9	29,8±43,2	0,23	
HBeAg positivo	1/5	33/178	0,65	1,1 (0,0-12)

<sup>†</sup>UI/L <sup>‡</sup>mg/L <sup>§</sup>g/L <sup>¶</sup>µg/L

Do mesmo modo que para as variáveis descritas na quadro 1, não se observaram diferenças significativas na proporção de casos com actividades de aminotransferases da alanina (3/5 vs 50/178, p=0,15) e do aspartato (1/5 vs 36/178, p=0,73) ou da gama glutamiltransferase (0/5 vs 23/178, p=0,51) superiores aos limites normais. Não se detectaram diferenças significativas na distribuição dos casos por resultados histológicos (quadro 2) nem na proporção daqueles com histologia anormal, isto é, cirrose, hepatite crónica activa ou persistente, e histologia normal ou apresentando alterações inespecíficas, em relação com a reactividade anti-HCV (4:1 nos positivo vs 37:44 nos negativo). Contudo o OR calculado é de 4,8 (intervalo de confiança a 95%: 0,4-239), claramente desviado para a direita, podendo sugerir uma limitação do tamanho amostral na detecção de uma diferença real.

**DISCUSSÃO**

Nesta coorte de portadores crónicos assintomáticos do HBsAg, detectados acidentalmente, a prevalência de anticorpos para o HCV, avaliada por ELISA, foi de 2,7%. Este valor é inferior aos descritos noutras populações de doentes com hepatite B crónica, para as quais foram referidas prevalências de 11%<sup>13</sup>, 16%<sup>11</sup>, 17%<sup>12</sup>, 25%<sup>13</sup>, 26%<sup>16</sup> e 36%<sup>14</sup>. Contudo, nesses estudos, as amostras avaliadas eram sobretudo compostas por doentes clinicamente reconhecidos, alguns casos com hepatite grave, infecção pelo HIV ou hepatoma, não sendo avaliado o risco decorrente de eventuais internamentos e transfusões que a gravidade da doença possa ter determinado. Nos casos em que eram

QUADRO 2 – Relação entre as características histológicas e a reatividade anti-HCV (ELISA segunda geração) em portadores crónicos assintomáticos do HBsAg

	HCV positivo n=5	HCV negativo n=81	p	OR (IC a 95%)
Cirrose	0	8		
HC Activa	0	2		
H C Persistente	4	27		
Lesões Mínimas	0	33		
Normal	1	11	0,23	
HBcAg positivo	0/3	16/68	0,46	0,0 (0,0-11)
Índice Knodell	1,3±1,5	2,1±1,9	0,46	

considerados separadamente nos chamados portadores saudáveis, estes apresentavam prevalências claramente inferiores<sup>14</sup>. No estudo português<sup>16</sup>, em que a prevalência de anti-HVC era cerca de 10 vezes superior à que encontramos, não foram incluídos doentes com histologia normal e a proporção de toxicodependentes era superior à da nossa amostra.

A frequência de infecção pelo HCV por nós detectada poder-se-ia dever ao facto da população avaliada ser constituída por portadores assintomáticos do HBsAg e por isso sujeita naturalmente a um vício de selecção favorecendo os casos menos graves, os quais se esperaria que correspondessem àquele em quem está presente apenas um dos agentes de infecção. No entanto, é de salientar que nesta amostra, 10% dos doentes submetidos a biópsia hepática apresentavam cirrose, não se tendo contudo detectado formas histológicas significativamente mais graves nos casos em que o anti-HCV estava presente (quadro 1). Também o valor médio do hialuronato, um marcador útil na avaliação da fibrose hepática<sup>20</sup>, era semelhante em ambos os grupos. O presente estudo não permite excluir a hipótese de existir uma real desvantagem dos casos com infecção por ambos os vírus, que apresentaram um OR de 4,8 para lesões histológicas graves. Em doentes insuficientes renais crónicos, por exemplo, pudemos constatar que a associação de HBsAg e de anti-HCV se acompanhava de doença hepática mais grave, medida de acordo com índices bioquímicos e histológicos<sup>21</sup>.

Não foi possível realizar a determinação sérica do DNA do HBV, pelo que não há uma medida directa do eventual efeito da presença de infecção pelo HVC na replicação do HBV. Pudemos contudo pesquisar a presença de HBcAg no fígado, tendo-se detectado percentagens de positividade mais altas nos casos anti-HCV negativo (24% vs 0%). Esta diferença não era contudo significativa, sendo semelhante em ambos os grupos a prevalência sérica do HBeAg (18% vs 20%). Estudos anteriores realizados em chimpanzés infectados experimentalmente<sup>22</sup> e observações em humanos infectados por ambos os vírus, sugeriram que a hepatite C poderia suprimir a replicação do HBV<sup>14,16</sup>. Os nossos resultados não permitiram confirmar essa influência da infecção pelo HCV na expressão de marcadores HBV, devendo ser no entanto valorizados com precaução quer devido à baixa proporção de casos anti-HCV positivo por nós detectada quer pela bem conhecida disparidade existente entre a replicação e a expressão dos antígenos do HBV<sup>23</sup>.

A prevalência de anti-HCV nesta população de portadores crónicos do HBsAg foi mais elevada do que a observada num grupo de 4924 dadores voluntários de sangue, avaliados no Serviço de Imuno-Hemoterapia do Hospital de S. João (H. Alves, H. Barros, C. Koch, et al. Anti-HCV ELISA and RIBA reactivity in Portuguese blood donors and dialysis patients, submetido). Apesar de eventuais diferenças nas características gerais das populações consideradas, parece poder afirmar-se que a presença de HBsAg se associa a um risco aumentado de infecção pelo HCV (5/183 vs 50/4924, OR=2,8 (intervalo de confiança a 95%: 1,0-7,3, p=0,045).

Contudo, não se detectou nenhum caso novo de infecção pelo HCV, sugerindo que o risco de exposição seja relativamente baixo, ainda que superior ao de grupos como os dadores voluntários de sangue.

BIBLIOGRAFIA

- MOSLEY J. W., REDECKER A. G. FEINSTONE S M, PURCELL R. H.: Multiple attacks of acute viral hepatitis. *N. Engl J. Med.* 1977; 296: 75-80.
- DIENSTAG J. L. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-462.
- ALTER M. J., COLEMAN P. J., ALEXANDER J., et al. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262: 1201-1205.
- CHOO Q. L., KUO G, WEINER A., J., et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, nonB viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- KUO G, CHOO Q. L. ALTER H. J. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 362-364.
- ALTER H. J.: New kit on the Block: Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 15:350-352.
- STEVENS C. E., TAYLOR P. E., PINDYCK J., et al.: Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors *JAMA* 1990; 263:49-53.
- THALER M., PARK C-K, LANDERS D. V., et al.: Vertical transmission of hepatitis C. *Lancet* 1991; 338: 17-18.
- AACH R. D., STEVENS C. E. HOLLINGER F. B. et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325-1329.
- ALTER H. J. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: The hepatitis C virus in current perspective. *Ann Intern Med* 1991; 115: 644-649.
- FATTOVICH G., TAGGER A., BROLLO L., et al.: Liver disease in anti-HBe positive chronic HBsAg carriers and hepatitis C virus. *Lancet* 1989; 2: 797-798.
- BARTOLOTTI F., TAGGER A., CADROBBI P., et al.: Antibodies to hepatitis C virus in children with acute or chronic viral hepatitis. *Lancet* 1989; 2:1162.
- BRUIX J., CALVET X., COSTA J., et al.: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2: 1004-1006.
- GARGOT D., DUCREUX M., DUSSAIX, et al.: Antibodies to hepatitis C virus in patients with positive HBsAg. *Dig. Dis Sci* 1990; 35:1437-1438.
- FONG T-L., DI BISCEGLIE A., M., WAGGONER J. G., BANKS S., M., HOOFNAGLE J., H., The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1991; 14: 64-67.
- VELOSA J., CARNEIRO DE MOURA M., MARINHO R., SARAIVA A., RAMALHO F.: Prevalência de anticorpos anti-HVC na hepatite crónica e no carcinoma hepatocelular. *Revista de Gastroenterologia* 1990; 29: 179-186.
- BIANCHI L., DeGROOTE J., DESMET V., J., et al.: Review by an international group. Hepatitis revisited. *Lancet* 1977 2: 914-919.
- KNODELL R., G., ISHAK K., G., BLACK W., C., et al.: Application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- DEAN A., G., DEAN J., A., BURTON A. H. DICKER R. C. *Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers.* USD., Incorporated, Stone Mountain, Georgia, 1990.
- COOPER E., H., RATHBONE B., J., Clinical significance of the immunometric measurements of hyaluronic acid. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 444-451.
- MORGADO T., BARROS H., DIAS L., et al. Lesões hepáticas em hemodializados com infecções crónicas pelos vírus das hepatites B., e C., *Rev Port Nefro e Hiper* 1992; em publicação.
- DIENES H., P., PURCELL R. H, POPPER H., PONZETTO A.: The significance of infections with two types of viral hepatitis demonstrated by histologic features in chimpanzees. *J. Hepatol* 1990; 10:77-84.
- DUSHEIKO G., PATERSON A. Hepatitis b core and surface antigen expression in HBeAg and HBV DNA positive chronic hepatitis b: correlation with clinical and histological parameters. *Liver* 1987; 7: 228-232.