

Expertos Invitados

● **CONTAMINACION DE MOLUSCOS POR VIRUS ENTERICOS: VALIDEZ DE LOS ESTANDARES LEGALES Y MICROORGANISMOS INDICADORES**



**Columnista Experto de SIIC
Dr. Jesús Romalde**

Profesor Titular de Microbiología. Campo de especialización. Patología de peces; virus entéricos en moluscos

Introducción

La importancia creciente de los moluscos como proteínas para consumo, junto con la estabilización de la producción pesquera mundial, ha llevado a un desarrollo importante de este campo de la acuicultura. En los últimos años, tanto el número de explotaciones de cultivo de moluscos como su volumen de producción se incrementaron notablemente en nuestro país y sobre todo en Galicia, debido al amplio mercado de este producto. Dicho incremento en el consumo conlleva un problema sanitario asociado, ya que en el medio acuático donde se desarrollan estos organismos se pueden encontrar más de 100 especies distintas de virus infecciosos para el ser humano, que normalmente se transmiten por vía fecal-oral y que se denominan genéricamente "virus entéricos".^{1,2}

La contaminación viral de los moluscos

La prevalencia de los virus entéricos en el ambiente depende de varias causas, pero fundamentalmente de la contaminación humana por aguas fecales, ya que las partículas virales son vertidas al medio con las heces de los individuos afectados, donde se encuentran en elevadas cantidades. A través de las aguas residuales, estos virus acceden a todo tipo de aguas superficiales, donde representan un serio riesgo sanitario.³⁻⁵

Los moluscos son organismos filtradores, se demostró que el flujo que atraviesa su tracto digestivo puede alcanzar los 20 litros en una hora. Como consecuencia de este flujo se retienen todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que pueden transportar partículas virales adheridas, o bien partículas virales libres.⁶ Así, moluscos como mejillones, lapas, berberechos, almejas y ostras actúan a modo de concentradores virales naturales. Aunque esta bioacumulación es pasiva (los virus entéricos no se multiplican en el interior del molusco), las partículas víricas se pueden acumular en diferentes órganos y tejidos del molusco, donde permanecen estables durante largos períodos de tiempo. El hecho de que muchos de estos moluscos se consuman crudos o sólo mínimamente cocinados es una de las causas de que estas partículas virales lleguen perfectamente viables a los consumidores y sean capaces de producir enfermedad.

Todo lo anteriormente descrito explica por qué estos organismos filtradores actúan a modo de vectores en la transmisión de enfermedades como hepatitis infecciosa, causada por el virus de la hepatitis A (HAV), gastroenteritis (principalmente causadas por Norovirus [NV]), etc. (tabla 1). Este hecho está, además, potenciado por el crecimiento de moluscos en áreas típicamente contaminadas por la influencia del hombre, lo cual implica un riesgo serio para la salud pública y la necesidad de una vía de prevención de esta transmisión.

[Tabla 1](#)

Generalmente, los moluscos responsables de los brotes y epidemias virales provienen de zonas de

aguas contaminadas, pero no es infrecuente que procedan de áreas de agua de "buena calidad"; según las exigencias sanitarias actuales, para aguas de cultivo de moluscos únicamente se incluyen normativas en cuanto al número de coliformes fecales y presencia de *Escherichia coli*.⁷ Por ello, una de las líneas de investigación que más se potenció se dirige al desarrollo de técnicas para una detección viral eficaz, tanto a partir del agua y sedimentos como de tejidos de organismos.

Control sanitario

Como ya se comentó, la normativa en vigor sobre control sanitario de moluscos destinados a consumo se basa en la determinación de los niveles de coliformes fecales y *E. coli* presentes, bien en carne y líquido intervalvar de los moluscos, bien en las aguas de cultivo.

Actualmente, según los criterios de la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas de 1991 (91/142/CEE),⁸ la calidad sanitaria de los moluscos se fija según una clasificación de las zonas de producción en función del número de coliformes fecales y *E. coli*, de la siguiente forma.

Zonas A: Para consumo humano directo. Moluscos con menos de 300 coliformes fecales o menos de 230 *E. coli* por 100 g de carne y líquido intervalvar.

Zonas B: Moderadamente contaminados. Moluscos con menos de 6 000 coliformes fecales o menos de 4 600 *E. coli* por 100 g de carne en el 90% de las muestras tomadas. Sólo se pueden destinar a consumo después de tratamiento en un centro de depuración o tras su reinstalación en una zona A.

Zonas C: Fuertemente contaminados, moluscos con menos de 60 000 coliformes fecales por 100 g de carne de molusco. Se podrían destinar a consumo tras un largo período de reinstalación en una zona limpia.

Sin embargo, diversos trabajos demostraron que no existe una buena correlación entre la presencia viral y bacteriana, la persistencia viral es mucho más elevada que la bacteriana, tanto en moluscos como en el medio ambiente. Por tanto, el uso de coliformes fecales como indicadores de presencia viral no es fiable.⁹⁻¹³

En este sentido, nuestro grupo de investigación realizó diferentes estudios sobre la prevalencia de diferentes virus entéricos en poblaciones naturales y cultivadas de moluscos en Galicia (noroeste de España).^{9,13} En el primero de ellos,⁹ se estudió la prevalencia de HAV y enterovirus mediante las técnicas de hibridación *dot-blot* y RT-PCR, comparando los valores de contaminación viral con los de contaminación bacteriana, evaluados mediante recuentos de *E. coli* en las mismas muestras. Entre las especies de moluscos estudiadas figuraban mejillón, natural y cultivado en batea, almeja y berberecho. Los recuentos bacterianos mostraron que la mayoría de las muestras (40.8%) se clasificaban como moderadamente contaminadas según los estándares de la UE (categoría B), y por lo tanto debían someterse a procesos de depuración (tabla 2). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los valores de contaminación bacteriana de mejillón cultivado y los de moluscos silvestres. Así, el porcentaje de muestras limpias (< 230 *E. coli*/100 g de molusco) fue claramente superior en mejillón cultivado (49.1%) que en mejillón silvestre (22.8%) o almejas y berberechos (10.7%). Por otro lado, se detectó HAV en 27.4% de las muestras y enterovirus en 43.9% (tabla 2). La detección simultánea de ambos tipos virales se obtuvo en 14.1% de las muestras. En este sentido, también se demostró que la técnica de RT-PCR es más sensible y eficaz para la detección de HAV. Los análisis estadísticos realizados mostraron que no existía correlación entre la contaminación bacteriana y viral, ni entre la presencia de HAV y enterovirus. Únicamente pudo encontrarse dicha relación en áreas muy contaminadas, normalmente asociadas a zonas con elevada concentración de población.

Tabla 2.- Resultados bacteriológicos y virológicos para las diferentes especies de moluscos incluidas en los estudios (porcentaje de muestras positivas)

Especie de molusco	<i>E. coli</i>			Presencia de			
	< 230	230-4600	> 4600	HAV	EV	NV	AV
Estudio 1							
Mejillón cultivado	49,1	38,6	12,3	26,3	33,3	NA	NA
Mejillón silvestre	22,8	34,2	43,0	29,1	51,9	NA	NA
Otros: almeja, berberecho	10,7	64,3	25,0	25,0	42,8	NA	NA
TOTAL	29,9	40,8	29,3	27,4	43,9	NA	NA
Estudio 2							
Mejillón cultivado	62,5	37,5	0	0	NA	0	50
Mejillón silvestre	0	60,0	40,0	0	NA	40	70
TOTAL	27,7	50,0	22,3	0	NA	22,3	61,1

En el segundo de los trabajos¹³ se amplió el número de grupos virales a estudiar incluyendo NV y adenovirus (AV) y se evaluó la validez de los bacteriófagos RNA F+ como indicadores de contaminación viral. En este estudio se utilizó la técnica de *nested-PCR* para aumentar la sensibilidad en la detección viral. Los resultados de los recuentos de *E. coli* mostraron de nuevo una menor contaminación en los moluscos cultivados (62.5% de las muestras en categoría A) que en los obtenidos de poblaciones naturales (0 en categoría A) (tabla 2). Por niveles de bacteriófagos, únicamente 37.5% de las muestras de moluscos cultivados se podrían considerar limpias, mientras que el 100% de las muestras de poblaciones naturales estarían consideradas como contaminadas (tabla 2). Con respecto a los niveles de los diferentes grupos de virus entéricos, 66.6% de las muestras fueron positivas para AV y 16.6% para NV (tabla 2). Es interesante señalar que se detectaron ambos genogrupos (I y II) de Norovirus, incluso en una misma muestra. No se encontraron muestras positivas para HAV, probablemente debido al rápido descenso de la incidencia de este virus en España.¹⁴

Los resultados obtenidos en estos dos estudios son similares a los descritos por otros autores,¹⁰⁻¹² e indican la necesidad de utilización de nuevos indicadores más fiables o bien de realizar análisis específicos de contaminación viral.^{7,15} En este sentido, es importante señalar que el Consejo de la Unión Europea adoptó en 1999 una Decisión (1999/313/CE)¹⁶ vinculante para todos los países miembro, en la que se establece la necesidad de estandarización e inclusión en la normativa de metodologías adecuadas para el control virológico de moluscos bivalvos.

Depuración

El método tradicional utilizado para prevenir la posible contaminación bacteriana o viral de moluscos es el de depuración, consistente en la colocación del molusco en agua no contaminada o limpia durante 48 horas como término medio, se basa en la capacidad autopurgante de los moluscos por sus características de organismos filtradores.¹⁷⁻¹⁹ Un gran número de trabajos publicados en los últimos años demostraron que las reducciones en el número de coliformes fecales y virus (particularmente HAV) tras el proceso de depuración no están muy relacionadas.^{12,20-23} Teniendo esto en cuenta, parece que la efectividad de la depuración necesita ser evaluada por separado para cada grupo de patógenos.

Recientemente nuestro grupo de investigación llevó a cabo estudios comparativos de las dinámicas de depuración de diferentes microorganismos en mejillón,²⁴ incluyendo *E. coli* y bacteriófagos RNA F+, como ejemplo de microorganismos indicadores, y los virus HAV y NV. Los resultados mostraron la falta de correlación entre los niveles de *E. coli* y bacteriófagos, así como entre los niveles de ambos indicadores y la presencia viral (tabla 3), lo que indica la existencia de dinámicas de eliminación diferentes y la necesidad de más estudios para determinar las condiciones idóneas del proceso de depuración para que pueda asegurar un producto de calidad virológica destinado a

consumo. Además, se observó que en algunas se incrementan los niveles de contaminación tras el proceso de depuración, lo que puede deberse a malas prácticas operacionales durante el proceso (tabla 3). Es necesario por tanto un mayor control del funcionamiento de las plantas depuradoras de moluscos.

Tabla 3.- Porcentaje de muestras concordantes con los criterios establecidos para *E. coli* y bacteriófagos pre- y post-depuración y determinación de presencia viral (HAV y NV) en las mismas.

Depuradora (sistema/tratamiento del agua)	E. coli		Bacteriófagos		Virus	
	pre	post	pre	post	pre	post
1 (piscinas/cloro)	66,6	95,4	25,0	58,3	16,6	8,3
2 (piscinas/ozono)	71,4	84,8	72,4	61,9	0	4,2
3 (bins/cloro)	90,4	96,9	71,4	71,4	9,5	14,2

Papel de las importaciones y otras operaciones comerciales en la transmisión de virus entéricos

En los últimos años se demostró la importancia de las operaciones comerciales internacionales en la transmisión de patógenos asociados al consumo de determinados alimentos. Un buen ejemplo de la implicación de estas operaciones en la aparición de brotes epidémicos es el brote de hepatitis A ocurrido en España, que pudo asociarse al consumo de almejas coquinas (*Donax* sp.) importadas de Perú, que es una zona endémica para esta enfermedad.²⁵ Los primeros casos del brote se registraron en septiembre de 1999 y se dio por concluido a finales del mismo año. El número de personas afectadas fue de 188, todas en la Comunidad Valenciana, en las que se observaron varios casos de gastroenteritis, vómitos, dolores abdominales y fiebre. Los análisis virológicos realizados mediante métodos moleculares a partir de tejidos de las almejas implicadas demostraron la presencia del HAV en 75% de las muestras. Sobre la base de estas evidencias, las autoridades sanitarias autonómicas y estatales procedieron a la inmovilización de 176 544 kg de coquinas en la Comunidad Valenciana y 12 544 kg en el resto de España.

A partir del brote de hepatitis A ocurrido en la Comunidad Valenciana, y pese a no existir legislación al respecto, las autoridades sanitarias españolas adoptaron como medida preventiva el análisis sistemático de las importaciones de moluscos, principalmente almejas (*Donax* sp. y *Tapes* sp.) y vieiras (*Argopecten* sp.), para la detección del HAV. Nuestro laboratorio en la Universidad de Santiago realizó, entre noviembre de 1999 y mayo de 2001, el análisis virológico específico para el virus de la hepatitis A de un total de 16 importaciones de moluscos bivalvos procedentes de Sudamérica llegadas a distintas comunidades autonómicas españolas.²⁶ Estas importaciones incluían 6 envíos de almeja fina (*Tapes* sp.), 6 de coquinas, así como 5 de vieiras, que tomadas en conjunto implicaban un volumen de importación de 300 toneladas de moluscos. Además, se analizaron las muestras inmovilizadas en la Comunidad Valenciana asociadas con el brote de hepatitis A ocurrido en septiembre de 1999.

De las 16 importaciones analizadas, en 3 de ellas se demostró la presencia de HAV mediante la técnica de RT-PCR (amplificación del ácido nucleico viral extraído de tejidos de molusco) combinada con hibridación de los productos de amplificación con sondas específicas para el virus. De estas importaciones, dos se correspondieron con lotes de almeja fina, mientras que la tercera consistía en un envío de vieiras (figura 1).

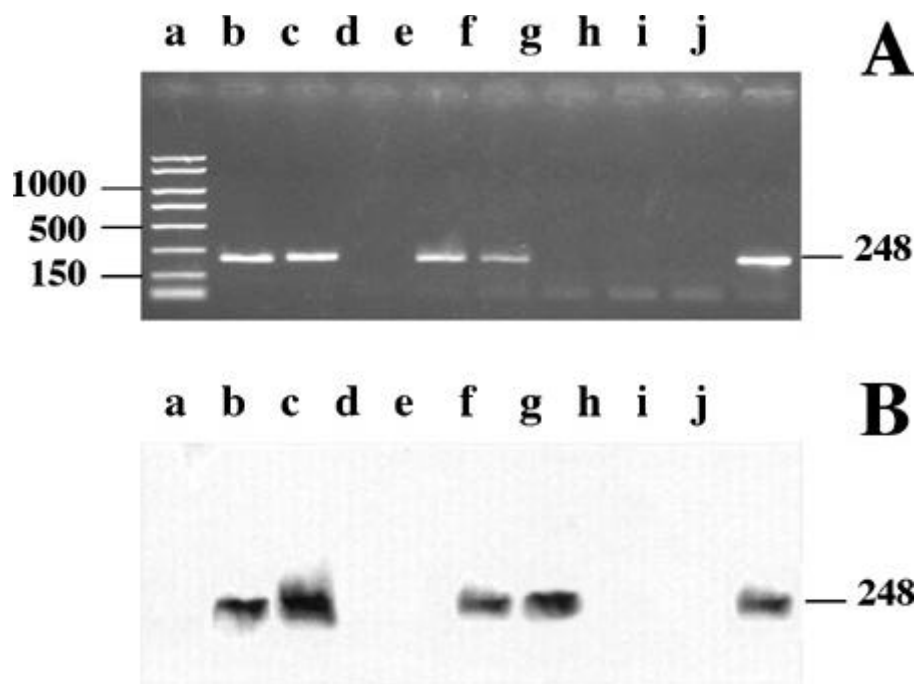


Figura 1. Detección del virus de la hepatitis A en moluscos procedentes de importaciones, por RT-PCR (A) y correspondiente *Southern blot* (B). Líneas: a, marcador de peso molecular (PCR marker 50-2 000 bp, Sigma); b-e, muestras de almeja; f-h, muestras de vieira; i, control negativo; j, control positivo. Los números indican la talla en pb de las bandas del marcador (izquierda) y el producto específico (derecha).

Por otro lado, el análisis de las muestras pertenecientes a las partidas de almejas inmovilizadas asociadas con el brote epidémico de Valencia reveló que el 50% de ellas estaban contaminadas con HAV, lo que constituye una nueva evidencia de que, efectivamente, el origen del brote fueron estas almejas importadas. En todos los casos se hicieron análisis confirmativos con distintas submuestras de las mismas importaciones y se obtuvieron los mismos resultados que en los análisis iniciales. Es importante mencionar que todas estas importaciones consistían en moluscos congelados, proceso de conservación que en principio podría eliminar algunos microorganismos. Sin embargo, en el caso de los virus entéricos de los que hablamos, y concretamente del HAV, este proceso prácticamente no presenta ningún efecto debido a la elevada resistencia a la congelación (las partículas virales permanecen estables dentro de los tejidos del molusco).

Metodos de detección

Los procedimientos clásicamente empleados para la detección de virus en muestras clínicas, como el uso de cultivos celulares o los métodos serológicos, presentan grandes limitaciones para su utilización en la detección de virus a partir de muestras de moluscos o de aguas de cultivo. Estos métodos no poseen suficiente sensibilidad para detectar bajas concentraciones virales (que pueden ser suficientes para ocasionar un brote epidémico) y, además, muchos de estos virus no son cultivables "in vitro".

Actualmente, los métodos clásicos se reemplazan por otras técnicas más sensibles, disponibles gracias al desarrollo biotecnológico, como el uso de sondas marcadas de ácidos nucleicos o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).^{27,28} El desarrollo y perfeccionamiento de estas técnicas tiene como objetivo un control rutinario de la calidad virológica, superando las dificultades de detección de estos virus, si bien tienen la desventaja de ser métodos puramente cualitativos, es decir, que sólo permiten determinar la presencia/ausencia de contaminación. En los últimos años existe una tendencia al desarrollo de métodos cuantitativos, como la PCR en tiempo real, que permitirán no sólo la detección de un determinado tipo viral en las muestras de moluscos, sino determinar el número de partículas virales presentes en una muestra^{29,30} La posibilidad de cuantificación abre las puertas a la posible inclusión de estos métodos en la legislación, tras determinar la dosis infectiva de cada uno de los patógenos virales y, por consiguiente, los límites admisibles para cada uno de ellos. Todo ello proporcionará un nivel de seguridad de cara a la salud pública, previniendo la transmisión de este tipo de virus.

Consideraciones finales

La transmisión de virus entéricos al hombre puede ser minimizada si se establece y estandariza un

control virológico de los moluscos destinados a consumo, tanto en lo que se refiere a las áreas de crecimiento como en la etapa de puesta en el mercado.

En este sentido, la nueva decisión de la Unión Europea constituye el primer paso para poder erradicar un importante problema de salud pública, que redundará, asimismo, en un beneficio para el sector de la acuicultura.

El autor no manifiesta conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch A. 1986. Virus entéricos humanos en aguas contaminadas. *Mundo Científico*, 88:156-161.
2. Wyn-Jones AP, Sellwood J. 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* 91, 945-962.
3. Nasser AM. 1994. Prevalence and fate of hepatitis A virus in water. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24, 281-323.
4. Callahan KM, Taylor DJ, Sobsey MD. 1995. Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water sci. Technol.* 31, 189-193.
5. Gantzer C, Dubois E, Crance JM y col. 1998. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. *Oceanol. Acta* 21, 983-992.
6. Metcalf TG. 1982. Viruses in self-growing waters. *Environ. Int.*, 7: 21-27.
7. Lees DN. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 81- 116.
8. Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (91/492/CEE) de 15 de julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos.
9. Romalde JL, Area E, Sánchez G y col. 2002. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain). Inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 119-130.
10. Le Guyader F, Apaire-Marchais V, Brillet J, Billaudel S. 1993. Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3963-3968.
11. Le Guyader F, Miossec L, Haugarreau L y col. 1998. RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period. *Water Sci. Technol.* 38, 45-50.
12. Power UF, Collins JK. 1989. The production of microbiologically safe shellfish – lessons from the classification of shellfish at source. *Environ. Health* 97, 124-130.
13. Torrado I, Henshilwood K, Lees DN, Romalde JL. 2003. Detection of enteric viruses in shellfish by the nested-PCR method and comparison with F-specific RNA bacteriophage and *Escherichia coli* counts. En: "Molluscan shellfish safety" (Villalba A, Reguera B, Romalde JL, Beiras R, eds.) Xunta de Galicia & UNESCO. Santiago de Compostela. pp:353-363.
14. Dal-Ré R, García-Corbeira P, García de Lomas J. 2000. A large percentage of the Spanish population under 30 years of age is not protected against hepatitis A. *J. Med. Virol.* 60, 363-366.
15. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. 1995. Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - A trip over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 461-487.
16. Decisión del Consejo de la Unión Europea (1999/313/CE) de 29 de abril de 1999 relativa a los laboratorios de referencia para el control de los contaminantes bacteriológicos y virales de los moluscos bivalvos.
17. Otwell WS, Rodrick GE, Martin RE (eds). 1991. *Molluscan Shellfish Depuration*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
18. Poggi R, Le Gall JY (eds). 1995. *Purification des Coquillages*. Proc. 2nd Int. Conf. Shellfish Depuration. Rennes, France, April 1992. IFREMER – Centre de Brest, Plouzane.
19. Roderick GE, Schneider KR. 1994. Depuration and relaying of molluscan shellfish. In: Hackney CR, Pierson MD (eds.), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman and Hall, Nueva York, pp. 331-363.
20. Doré WJ, Lees DN. 1995. Behaviour of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2830-2834.
21. Jaykus LA, Hemard MT, Sobsey MD. 1994. Human enteric pathogenic viruses. In: Hackney CR, Pierson MD (eds.), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman and Hall, Nueva York, pp. 92-153.
22. Sobsey MD, Jaykus LA. 1991. Human enteric viruses and depuration of bivalve mollusks. In: Otwell WS, Rodrick GE, Martin RE (eds.), *Molluscan Shellfish Depuration*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 71-114.
23. Richards GP. 1988. Microbial purification of shellfish. A review of depuration and relaying. *J. Food Prot.* 51, 218-251.
24. Vilariño ML, Ribao C, Henshilwood K, Romalde JL. 2004. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as indicator of viral contamination clearance during the depuration process. V International Symposium on Molluscan Shellfish Safety. Galway, Ireland.
25. Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F y col. 2001. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.* 43, 61-65.
26. Romalde JL, Torrado I, Ribao C, Barja JL. 2001. Global market: shellfish imports as source of re-emerging hepatitis A virus in Spain. *Int. Microbiol.* 4, 223- 226.
27. Romalde JL. 1996. New molecular methods for the detection of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish. *Microbiología SEM*, 12:547-556.
28. Ribao C, Torrado I, Vilariño ML, Romalde JL. 2004. Assessment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. *J. Virol. Methods* 115, 177-182.
29. Henshilwood K, Doré WJ, Anderson S, Lees DN. 2003. The development of a quantitative assay for the detection of Norwalk like virus and its application to depuration. En: "Molluscan shellfish safety" (Villalba, A., Reguera, B., Romalde J.L., Beiras, R., eds) Xunta de Galicia & UNESCO. Santiago de Compostela. pp: 451-465.
30. Richards GP, Watson MA, Kingsley DH. 2004. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J. Virol. Methods.* 116: 63- 70.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PATOGÊNESE DA HEPATITE AUTO-IMUNE



Columnista Experto de SIIC
Dra. Anna Carla Goldberg

Professora Titular Colaboradora do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Campo de especialização: Imunologia.

A hepatite auto-imune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado de etiologia desconhecida, que evolui, freqüentemente, para cirrose hepática, na ausência de tratamento imunossupressor. A doença acomete, usualmente, pacientes jovens do sexo feminino e caracteriza-se pela presença de hipergamaglobulinemia, autoanticorpos circulantes não-órgão específicos e alterações histológicas no parênquima hepático caracterizadas pela presença de hepatite de interface com infiltrado inflamatório composto preponderantemente por linfócitos T ativados e plasmócitos.¹⁻³

A característica de um processo auto-imune é a reatividade anômala dirigida contra alvos antigênicos nos próprios tecidos do indivíduo. Apesar de manifestações extra-hepáticas auto-imunes ocorrerem em cerca de 10%-30% dos pacientes com HAI, o órgão-alvo da lesão é o fígado e os hepatócitos periportais são as células preponderantemente envolvidas. Nas células apresentadoras profissionais como células dendríticas, macrófagos ou células de Kupffer, ocorre a apresentação dos antígenos através das moléculas HLA aos linfócitos T de fenótipo auxiliador. Na presença de sinais co-estimulatórios, o reconhecimento de peptídeos antigênicos pelos receptores de linfócitos T (RCT) levam a sua ativação, proliferação com formação de clones e produção de citocinas e fatores que auxiliarão no recrutamento de outras células.⁴ Os linfócitos T do tipo auxiliador (CD4+) são as células que orquestram a resposta imunológica que inclui linfócitos T CD8+ (citotóxicos); linfócitos B e plasmócitos (células secretoras de anticorpos) e macrófagos. Clones T CD4+, infiltrantes no fígado de pacientes com hepatite auto-imune já foram identificados sem, no entanto, compartilhar um padrão único de RCT nos diversos pacientes.⁵⁻⁷ Por outro lado, vários auto-anticorpos órgão específicos e não-órgão específicos já foram identificados em pacientes com HAI, mas sua relevância na patogênese da doença é controversa. Os anticorpos contra microssoma de fígado e rim do tipo 1, citosol hepático do tipo 1, antígeno hepático solúvel e receptor da asialoglicoproteína reconhecem, respectivamente, epitopos do CYP2D6, da formiminotransferase ciclodeaminase, do receptor da asialoglicoproteína (glicoproteína de membrana hepatocelular) e de uma ribonucleoproteína. A maioria dos outros auto-anticorpos associados à HAI reconhecem proteínas citoplasmáticas e antígenos nucleares ubiquitários. Os outros elementos que protagonizam a resposta auto-imune são as moléculas HLA que apresentam os peptídeos. Estas têm sido os alvos sistemáticos dos estudos que buscam identificar os responsáveis pelo desencadeamento da HAI.

A prevalência da HAI não foi adequadamente estudada. Estima-se que cerca de 10% dos pacientes com doença hepática crônica seja portador de HAI.⁸ Ocorre esporadicamente em habitantes de certas regiões do Mediterrâneo e em países asiáticos, sendo freqüente no Norte da Europa⁹ e Austrália.¹⁰ No Brasil, a HAI é considerada uma causa rara de doença hepática crônica, compreendendo cerca de 5%-10% das doenças hepáticas nos principais centros de gastroenterologia do país.^{11,12} A classificação dos sub-tipos, aceita pela maioria dos autores^{13,14} baseia-se na presença de auto-anticorpos sem especificidade para determinado órgão e que não aparentam ser patogênicos.^{1,15,16} O tipo 1 (HAI-1) ocorre quando há positividade para anticorpo anti-músculo (AAML), particularmente para anticorpo anti-actina (AAA), associado ou não a anticorpos antinucleares (AAN) e o tipo 2 (HAI-2) quando há positividade para anticorpo anti-microssomal fígado-rim-1 (AAMFR-1) e/ou para o anticorpo anticitosol hepático do tipo 1 (AACH1). Uma terceira variante de HAI caracterizada pela presença de auto-anticorpos dirigidos contra UDP-glucuronosyl-transferase foi recentemente proposta não sendo aceita pela maioria dos autores como um subtipo particular da doença.¹⁷

A classificação da HAI é sustentada pela heterogeneidade clínica da doença. Os pacientes com HAI-2, quando comparados aos portadores de HAI-1, apresentam características peculiares no início da enfermidade, tais como: menor idade, maior freqüência de hepatite fulminante, níveis mais

elevados de bilirrubinas e de aminotransferases e mais reduzidos de gamaglobulinas.^{8,12,18} O tipo 2 é também mais raro que o tipo 1, sendo descrito particularmente em crianças da Europa Ocidental e América do Sul. Ambos os tipos apresentam resposta semelhante ao tratamento imunossupressor.¹³

Os dois tipos principais de HAI são diferentes também no perfil imunogenético. A predisposição genética é primariamente associado ao gene HLA- DRB1.¹⁹ Na Europa e Estados Unidos estudos mostraram associação do haplótipo HLA A1-B8-DR3 (DRB1*0301) e secundariamente ao HLA-DR4(DRB1*0401) com HAI-1.²⁰ No Japão e na China foi observada associação com HLA-DR4 (DRB1*0405).^{21,22} Na Argentina, Fainboim et al.²³ observaram associação de HAI-1 com as especificidades HLA-DR13 (DRB1*1301) e DQ6. Na Argentina e no México também foi observada a associação, respectivamente, com alelos DRB1*0405 e DRB1*0404.^{24,25} Já no Brasil, numa série de trabalhos conduzidos pelo nosso grupo²⁶⁻²⁸ foi observada a associação primária da HAI-1 com HLA-DR13 (DRB1*1301) em adultos e crianças e associação secundária com HLA-DR3 (DRB1*0301). Por outro lado, nos pacientes com HAI-2, a associação com HLA-DR7 e secundariamente com DR3 estava presente, reforçando a noção da dicotomia dos tipos de HAI.²⁶

A diversidade na seqüência de aminoácidos presentes nos alelos do gene HLA-DRB1 associados à HAI-1 levou vários autores a proporem a existência de padrões ou motivos compartilhados na molécula HLA que permitiriam a apresentação de peptídeos antigênicos iguais ou muito semelhantes e como consequência, levariam ao desencadeamento da auto-imunidade e à instalação da doença.^{19,29-32} No entanto, os padrões propostos levam em conta parte dos alelos associados não sendo possível estabelecer-se um padrão único.³³

A associação de HAI observada com genes HLA de classe II é uma das mais relevantes conhecidas, com riscos relativos sempre acima de 5, mas apenas em algumas formas clínicas há identificação do antígeno-alvo. O antígeno alvo na HAI- 2 já pode ser caracterizado, devido a presença de anticorpos dirigidos contra a isoforma 2D6 do citocromo P450.³⁴⁻³⁶ Anti-CYP2D6 são encontrados em pelo menos 75% dos pacientes com HAI-2.^{34,35} A reatividade contra outros antígenos alvo, tais como a glutathione S-transferase, receptor de asialoglicoproteína, citoqueratina 19, citosol hepático tipo 1, DNA e cromatina, já foi rastreada, mas parece se correlacionar melhor com a progressão da doença.³⁷⁻⁴¹ Por outro lado, não há até o momento confirmação da F-actina como auto-antígeno da forma mais freqüente de HAI, a tipo 1.⁴² Por fim, muitos destes auto-anticorpos não são específicos das hepatites auto-imunes, e na verdade, assim como com os anticorpos dirigidos contra a actina, são encontrados nas mais diversas manifestações de auto- imunidade. Várias explicações são possíveis para as diferentes associações observadas. Por um lado, perfis clínicos e laboratoriais indicam uma heterogeneidade de formas de uma mesma doença, com indícios que os antígenos alvo possam de fato ser diferentes. Não pode ser descartada uma origem pelo mecanismo de mimetismo molecular com um patógeno ainda não identificado, que poderia também variar conforme a região ou país, levando ao reconhecimento cruzado e desencadeamento da auto- imunidade a partir de epitopos diferentes. O vírus do herpes simples, do sarampo e das hepatites A e B já foram sugeridas.^{16,43,44} Na Argentina, um curso clínico atípico de hepatite aguda por vírus A, de maior duração e com auto- anticorpos positivos, foi associado à presença de HLA-DRB1*1301,⁴⁵ inferindo-se que o vírus da hepatite A pudesse estar relacionado à presença de auto-anticorpos e mesmo ao desencadeamento de HAI. Contudo, a análise da prevalência de IgG para VHA nos pacientes brasileiros com HAI e em controles históricos, pareados por faixa etária, não demonstrou nenhum aumento significativo na prevalência de infecção por VHA em pacientes com HAI, nem revelou freqüência aumentada de sorologia positiva para VHA em portadores de HAI com HLA- DRB1*1301 quando comparados a pacientes com outros antígenos HLA-DR (Bittencourt PL et al., dados não publicados).

Mesmo na ausência de um patógeno identificável, é possível que uma suscetibilidade anômala à lesão hepatocelular leve ao aparecimento, no próprio tecido hepático, de neo-antígenos ou antígenos crípticos, previamente seqüestrados ou escondidos, que se tornam então reconhecíveis. Esta poderia ser uma explicação para a forte presença da resposta humoral anti-músculo liso, que aparentemente reconhece estruturas do citoesqueleto, particularmente filamentos de actina polimerizada.⁴⁶⁻⁴⁸ Componentes adicionais de suscetibilidade, como a presença de polimorfismos que alteram a transcrição de TNF alfa ou CTLA4 vem sendo também investigados, mas também mostram padrões regionais ora com associação positiva ora sem significância.⁴⁹⁻⁵³ Assim, apesar dos grandes avanços já registrados no conhecimento da etiopatogenia da hepatite auto- imune, questões cruciais ainda permanecem não resolvidas: a natureza do auto- antígeno na HAI-1, o perfil mais completo de uma suscetibilidade genética que leva a auto-imunidade num órgão tradicionalmente considerado imunoprivilegiado e o papel de fatores ambientais e de patógenos no

desencadeamento da doença.
Los autores no manifiestan conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cançado ELR, Farias AQ, Bittencourt PL. Hepatite auto-imune. Em Silva LC. Hepatites agudas e crônicas. Sarvier, São Paulo, 2003: 278-295.
2. Czaja AJ & Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. AASLD Practice Guidelines. *Hepatology* 2002; 36: 479-497.
3. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis: Classification, heterogeneity, and treatment. *Am. J. Med.*, 1994; 96:23S-6S.
4. Hashimoto E, Lindor K, Homburger HA, et al. Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:1049-55.
5. Arenz M, Meyer zum Büschenfelde KW, Löhner HF. Limited T cell receptor V α -chain repertoire of liver-infiltrating T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998; 28:70-7.
6. Lohr HF, Pingel S, Weyer S, Fritz T, Galle PR. Individual and common antigen- recognition sites of liver-derived T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Scand J Immunol.* 2003 57(4):384-90.
7. Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Ichijo T, Inada H, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K. T cell repertoire in the liver of patients with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol.* 1999;60(9):806-15.
8. Gregorio GV, Portman B, Reid E et al. Autoimmune hepatitis in childhood – A 20-year experience. *Hepatology* 1997; 25:541-547.
9. Paronetto F, Sagnelli E. Immunologic observations in chronic active hepatitis: a disease of different etiologies. *Pathol Annu* 1980; 10: 157-181.
10. Mackay IR. Immunological aspects of chronic active hepatitis. *Hepatology* 1983; 3: 724-728.
11. Silva LC, Carrilho FJ, Di Pietro A, et al. Chronic hepatitis in São Paulo, Brazil. General data and clinical forms. *Gastrointest Hepatol* 1986; 9: 340-343.
12. Cançado ELR & Porta G. Autoimmune hepatitis in South America. Manns MP, Paumgartner G, Leuschner U, editors. In *Immunology and the Liver. Falk symposium 114*, Kluwer Academic Publishers and Falk Foundation, 2000, p. 82-92.
13. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
14. Manns MP & Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: Clinical Challenges. *Gastroenterology* 2001; 120: 1502-1517.
15. Abuaf N, Johanes C, Homberg JC. Autoantibodies in autoimmune chronic active hepatitis. In: Krawitt E, Wiesner RH, ed. *Autoimmune liver diseases*. New York: Raven Press, 1991; 93-109.
16. Czaja AJ. Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies. *Dig Dis Sci*, 1995; 40:435-56.
17. Obermayer-Straub P, Manns MP. Cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl- transferases as hepatocellular autoantigens. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1996;10(3):501-32.
18. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, et al. Chronic Active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: A second type of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-9.
19. Donaldson PT, Czaja AJ. Genetic effects on susceptibility, clinical expression, and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6:419- 37.
20. Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM et al. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leucocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991;13:701-706.
21. Seki T, Kiyosawa K, Inoko H et al. Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology* 1990; 12:1300-1304.
22. Qiu DK, Ma X. Relationship between human leukocyte antigen-DRB1 and autoimmune hepatitis type I in Chinese patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(1):63-7.
23. Fainboim I, Marcos Y, Pando M et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1* 1301) haplotype. *Hum. Immunol.* 1994;41:146-150
24. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, et al. Pediatric and adult forms of type 1 autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999;30:1374-1380.
25. Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Perez-Luque E, Burguete A, et al. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1998;28:985-990.
26. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cançado ER, Porta G et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am. J. Gastroenterol.* 1999; 94: 1906-1913.
27. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cançado ELR, Porta G, Laudanna AA, Kalil, J. Different HLA profiles confer susceptibility to Autoimmune Hepatitis Type 1 and 2. Letter to the Editor. *Amer J Gastroent* 1998; 93 (8): 1394-1395.
28. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mouglin B, Cançado ELR, Porta G, Carrilho F, Kalil J. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus, *Human Immunol* 2001; 62(2): 165-9.
29. Czaja AJ, Strettell MDJ, Thomson LJ, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997;25:317-323.
30. Strettell MDJ, Donaldson PT, Thomson LJ, SB, et al. Allelic basis for HLA- encoded susceptibility to type 1 autoimmune

- hepatitis. *Gastroenterology* 1997;112:2028-2035.
31. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, Farrant JM, Duthie A, Mieli-Vergani G, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994;19:609-615.
 32. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 1992;103:1041-1047.
 33. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, et al. Clinical distinctions and pathogenetic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; 37: 302-308.
 34. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O et al. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (KLM-1). *Eur. J. Immunol* 1993; 23:1105-1111.
 35. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ et al. Major antigen of liver kidney microsomal antibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *J. Clin. Invest.* 1989; 83:1066-1072.
 36. Sugimura T, Obermayer-Straub P, Kayser A, Braun S, Loges S, Alex B, Luttig B, Johnson EF, Manns MP, Strassburg CP. A major CYP2D6 autoepitope in autoimmune hepatitis type 2 and chronic hepatitis C is a three-dimensional structure homologous to other cytochrome P450 autoantigens. *Autoimmunity* 2002;35(8):501-13.
 37. Czaja AJ, Shums Z, Norman GL. Frequency and significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas in variant autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002 ;35(8):475-83.
 38. Murota M, Watanabe S, Fujita J, Ohtsuki Y, Wu F, Yoshida S, Kita Y, Funakoshi F, Masaki T, Kurokohchi K, Uchida N, Ishida T, Kuriyama S. Aberrant cytokeratin expression and high susceptibility to apoptosis in autoimmune hepatitis. *Hepatol Res.* 2003;25(3):271-280.
 39. Miyakawa H, Kawashima Y, Kitazawa E, Kawaguchi N, Kato T, Kikuchi K, Imai E, Fujikawa H, Hashimoto E, Schlumberger W. Low frequency of anti-SLA/LP autoantibody in Japanese adult patients with autoimmune liver diseases: analysis with recombinant antigen assay. *J Autoimmun.* 2003;21(1):77-82.
 40. Lapiere P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol.* 2003;33(7):1869-78.
 41. Kato T, Miyakawa H, Ishibashi M. Frequency and significance of anti- glutathione S-transferase autoantibody (anti-GST A1-1) in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2004;22(3):211-6.
 42. Zamanou A, Samiotaki M, Panayotou G, Margaritis L, Lymberi P. Fine specificity and subclasses of IgG anti-actin autoantibodies differ in health and disease. *J Autoimmun.* 2003;20(4):333-44.
 43. Manns MP. Hepatotropic viruses and autoimmunity 1997. *J Viral Hepatitis* 1997;4:1-7
 44. Vento S, Garofano T, Di Perri G, Dolci L, Concia E, Bassetti D. Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals. *Lancet* 1991;337:1183-1187.
 45. Fainboim L, Velasco VCC, Marcos CY, Ciocca M, Roy A, Theiler G et al. Protracted, but not acute, hepatitis A virus infection is strongly associated with HLA-DRB1*1301, a marker for pediatric autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2001;33:1512-1517.
 46. Gabbiani G, Ryan GB, Lamelin JP, Vassali P, Majno G, Bouvier CA et al. Human smooth muscle auto-antibody. Its identification as antiactin antibody and a study of its binding to "non muscular" cells. *Am J Pathol* 1973; 72: 473-88.
 47. Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to cytoskeleton antigens in autoimmune liver diseases. In: Krawitt EL, Wiesner RH, Nishioka M ed. *Autoimmune liver diseases*. New York, Elsevier Science BV, 1998; p.217-256.
 48. Cançado ER, Vilas-Boas LS, Abrantes-Lemos CP et al. Heat serum inactivation as a mandatory procedure for anti-actin antibody detection in cell culture. *Hepatology* 1996, 23:1098-1104.
 49. Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ et al. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1999;30:851-856.
 50. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;117:645-652.
 51. Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado ELR, Porta G, Drigo S, Carrilho FJ et al. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor ? polymorphisms at position -308. *J Hepatol* 2001;35:24-28.
 52. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DEJ et al. CTLA-4 gene polymorphism and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31:49-53.
 53. Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Goldberg AC. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(7):1616-20.