

Distribuição dos genótipos do HCV em pacientes das regiões de Botucatu, Bauru e Assis, SP, Brasil

HCV genotypes distribution in patients from Botucatu, Bauru and Assis, São Paulo State, Brazil

RIALA6/1079

Sílvia M. CORVINO^{1*}, Rita M.S. HENRIQUES², Rejane M.T. GROTTTO², Maria Inês de M.C. PARDINI²

* Endereço para Correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Sorocaba, Rua Gino Cariola, 88. Jd. Paraíso, Botucatu, São Paulo, CEP18609-60, fone 0 XX (14) 38116234 R: 214, e-mail: silma_cor@yahoo.com.br

² UNESP- Faculdade de Medicina, Laboratório de Biologia Molecular / Hepatites Virais, Botucatu, São Paulo.

Recebido: 26/06/2006 – Aceito para publicação: 30/08/2006

RESUMO

Com objetivo de avaliar a distribuição dos genótipos do HCV em pacientes de Botucatu, Bauru, Assis e regiões, foram analisadas 1.018 amostras assim distribuídas: Botucatu (508), Bauru (415) e Assis (95) com sorologia anti-HCV reagente pela técnica ELISA (*Enzyme - linked immunosorbent assay*) e detectadas por Biologia Molecular RT-PCR (*reverse transcription Polymerase Chain Reaction - Roche®*). Genótipos foram determinados pela tecnologia LiPA (*Line probe assay - Bayer*) que permite detecção de 6 genótipos e subtipos mais comuns. Distribuição dos genótipos na região: genótipo 1 (62,9%), genótipo 3 (34,5%), genótipo 2 presente nas regiões de Botucatu e Bauru (2,1%), genótipo 5 em Botucatu (0,2%). Distribuição dos subtipos: Região de Botucatu - subtipos: 1a (25,0%), 1b (29,3%), 1a/1b (3,5%), 2b (0,6%), 3a (35,0%), 5a (0,2%). Região de Bauru - subtipos: 1a (31,1%), 1b (27,2%), 1a /1b (2,4%), 2 b (1,9%), 2 a/ 2c (0,2%), 3a (32,3%). Região de Assis - subtipos: 1a (26,3%), 1b (26,3%), 1a /1b (2,1%), 3a (41,1%). A técnica utilizada não permitiu a diferenciação dos subtipos em 5,1% das amostras. A distribuição dos genótipos nestas regiões foi similar às outras regiões do Brasil e do mundo ocidental (Europa Ocidental e Américas) apresentando algumas diferenças regionais relativas aos subtipos, como presença de genótipo africano (5) na região de Botucatu.

Palavras - Chave. HCV, Genótipos, Subtipos.

ABSTRACT

Hepatitis C is an infectious disease with variable clinical evolution, generally slow and progressive, caused by a RNA virus termed HCV (hepatitis C virus). This virus presents a structure composed by an external envelop, protein core, and a single strand RNA with approximately 9,5 Kb. RNA virus usually present a high mutation level resulting in diverse genomic sequences, and owing to these various genotypes and subtypes are evolved. HCV genotypes 1, 2 and 3 have been worldwide disseminated, being types 4 and 5 specially in Africa, and type 6 has been found in Asia. In Brazil the mostly frequent genotypes are 1, 2, and 3. The present study evaluated 1.018 plasma samples anti-HCV positive on ELISA assay, and HCV RNA positive by means of RT-PCR (Roche®). These plasma samples were sent from following cities of São Paulo state: Botucatu (N=508), Bauru (N= 415), and Assis (N= 95). Genotyping was performed by means of LiPA (Line probe assay - Bayer) which allows to analyze six HCV genotypes, and the most common subtypes. HCV genotypes regional distribution was 62.9% of genotype 1, and 34.5% of genotype 3. Genotype 2 was found in Botucatu and Bauru regions only in a frequency of 2.1%, and genotype 5 was shown in Botucatu (0.2%) only. HCV subtypes distribution was as follow: in Botucatu region – subtype 1a (25%), 1b (29.3%), 1a/1b (3.5%), 2b (0.6%), 3a (35.0%), 5a (0.2%); in Bauru region – subtypes 1a (31.1%), 1b (27.2%), 1a /1b (2.4%), 2 b (1.9%), 2 a/2c (0.2%), 3a (32.3%); in Assis region – subtypes 1a (26.3%), 1b (26.3%), 1a /1b (2.1%), 3a (41.1%). The used genotyping technique did not allow to perform the subtypes characterization in 4.1% of samples. The HCV genotypes distribution in these São Paulo state regions was similar to those observed in other Brazilian and world sites, although some regional differences on HCV subtypes were observed, such as the occurrence of African genotypes (5 and 5a) in Botucatu region.

Key Words. HCV, Genotype, subtype.

INTRODUÇÃO

A Hepatite C é uma doença infecciosa, com evolução variável, geralmente lenta e progressiva, que acomete o fígado, lesando-o de maneira irreversível evoluindo de hepatite crônica, para cirrose hepática e hepatocarcinoma. O intervalo médio entre a infecção e o desenvolvimento de hepatite C crônica é de aproximadamente 10 anos, com praticamente a mesma média para as evoluções seguintes¹.

Considerada uma das maiores epidemias do século XXI, sua prevalência mundial é estimada em 3% , sendo no Brasil 1,23% entre doadores de sangue^{2,3}.

O agente etiológico da Hepatite C (*HCV - Hepatitis C virus*) é um vírus RNA, do Gênero *Hepacivirus*, Família *Flaviviridae* (*National Center Biotechnology Information*)⁴ com diâmetro de 55 a 65 nm, identificado por Biologia Molecular em 1989^{5,6}.

A estrutura genômica do HCV está bem caracterizada e é composta de um envelope externo (membrana celular contendo proteínas virais E1 e E2), um core viral (p 21) e uma fita simples e linear da molécula de RNA, contendo aproximadamente 9.500 nucleotídeos. Esta fita contém uma única e longa fase aberta de leitura (*ORF – Open Reading Frame*) que codifica uma proteína com cerca de 3.000 aminoácidos. Essa proteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro em pelo menos 10 proteínas estruturais e não estruturais^{2,7,8,9}.

O reservatório natural e fonte de infecção é o homem doente (clínica ou subclínicamente) ou o portador assintomático¹⁰.

A principal via de transmissão é a parenteral (transfusão de sangue e hemoderivados), embora transmissão sexual, vertical, percutânea direta (usuários de drogas injetáveis, aplicação de tatuagens, acidentes perfuro-cortantes) em profissionais da saúde possam ocorrer¹⁰.

A hepatite C é a hepatite viral mais comumente transmitida por sangue. Os grupos de maiores riscos são pessoas que recebem sangue em transfusão, pacientes em diálise e toxicômanos. O advento de testes sorológicos de 2ª e 3ª geração na seleção de doadores de sangue reduziu de maneira significativa o risco de transmissão por unidade de sangue transfundido. No Brasil a obrigatoriedade de triagem de doadores de sangue para hepatite C data de 1993¹⁰, porém no Estado de São Paulo essa triagem é obrigatória desde 1992, Portaria CVS-10, 1992.

Como na maioria dos vírus, a ausência da atividade de reparo da enzima conduz a uma alta taxa de mutação espontânea, caracterizando diferentes seqüências genômicas levando à descrição de vários tipos (genótipos) e diferentes subtipos. Alguns genótipos têm distribuição geográfica característica, e podem ser associados a determinadas vias de transmissão¹¹.

Os testes de genotipagem mais utilizados detectam os seis (6) tipos mais freqüentes e os diversos subtipos. Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial, os tipos 4 e 5 são encontrados principalmente na África e o tipo 6 é normalmente detectado na Ásia^{12,13}. De acordo com Consenso proposto em 2005 sobre o

sistema de nomenclatura dos genótipos do HCV¹⁴, os genótipos considerados anteriormente como 7, 8, 9 e 11 foram classificados como subtipos do genótipo 6, enquanto o genótipo 10 foi classificado como subtipo do genótipo 3¹⁴, sendo mais comumente encontrados na Tailândia, Vietnã, e Indonésia¹³. No Brasil os genótipos mais freqüentes são 1, 2 e 3^{3,12,13}.

Inúmeros estudos em todo mundo têm como objetivo a cura da hepatite C. Atualmente dois tipos de tratamento vêm sendo utilizados, o interferon convencional ou peguillado associado ou não a ribavirina^{2,15}. A utilização de um ou outro tratamento foi normatizado no Brasil pelo programa de Hepatites Virais do Ministério da Saúde na Portaria nº 863/02², que estabeleceu o tratamento com interferon convencional e/ou ribavirina para portadores de genótipos 2, 3, enquanto portadores do genótipo 1 devem ser tratados com interferon peguillado e/ou ribavirina. Neste contexto, a determinação laboratorial do genótipo do HCV no paciente infectado é essencial para auxiliar o clínico na escolha da terapia a ser instituída¹³.

O objetivo deste trabalho foi determinar a freqüência e distribuição dos genótipos / subtipos do HCV em pacientes com hepatite C crônica nas regiões de Botucatu, Bauru e Assis, atendidos pelo Hemocentro de Botucatu.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foram incluídos neste estudo 1018 pacientes, com sorologia anti-HCV positiva, acompanhados nas diferentes Unidades de Saúde das regiões de Botucatu (508), Bauru (415) e Assis (95), integrantes do Programa Estadual de Hepatites Virais, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, no período de agosto de 2002 a maio de 2005. Todos os pacientes apresentaram solicitação médica para a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e genotipagem para o HCV.

Metodologia

A detecção do RNA viral foi realizada por RT - PCR utilizando Kit *Cobas Amplicor® HCV Monitor Test*, v.2.0 - *Roche Diagnóstica* enquanto a determinação do genótipo foi realizada analisando a região não traduzida ultra conservada 5' UTR com o Kit *Versant™ HCV Genotyping Assay (LiPA - Line Probe Assay)* - *Bayer Corporation*, que permite a determinação de 6 diferentes genótipos e subtipos mais comuns.

Em ambas as técnicas foram seguidas as orientações preconizadas pelos fabricantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a distribuição dos genótipos na população estudada observamos a predominância do genótipo 1 (62,9%), seguida pelo genótipo 3 (34,5%) e uma freqüência menor do

genótipo 2 (2,1%) presente apenas nas regiões de Botucatu e Bauru. Já o genótipo 5 (0,2%) esteve presente apenas na região de Botucatu, enquanto que genótipos mistos (1 e 3) foram encontrados em 0,4% da população estudada, correspondente a região de Bauru (Tabela 1).

O resultado observado para o genótipo 1 (62,9%) na região estudada, mostra-se concordante com a frequência deste genótipo no Estado de São Paulo. Jardim et al.¹⁶ encontraram uma frequência de 64,7% na região de São José do Rio Preto, enquanto Bassit et al.¹⁷ observaram uma frequência de 62,9% na cidade de São Paulo.

O genótipo 3 aparece com uma frequência mais elevada na região de Assis (41,1%) enquanto que nas regiões de Botucatu e Bauru é de 35,0% e 32,3%, respectivamente. Estes dados apontam uma variação regional deste genótipo pois Jardim et al.¹⁶ encontraram 26,5% em São José do Rio Preto enquanto Bassit et al.¹⁶ encontraram valores semelhantes (31,3%) aos das regiões de Botucatu e Bauru. Já para o genótipo 2 (2,1%) este estudo revelou uma frequência inferior à que tem sido encontrada no Estado de São Paulo: Jardim et al.¹⁶ encontraram 8,8% em São José do Rio Preto, enquanto Bassit et al.¹⁷ encontraram 4,3% na cidade de São Paulo.

Embora o genótipo 4 esteja presente no Estado de São Paulo¹⁷ este não foi encontrado na população estudada. O presente estudo revela a presença do genótipo 5 apenas na região de Botucatu, embora este já tenha sido encontrado em outras regiões do Estado de São Paulo¹⁸.

De modo geral, os genótipos nas regiões estudadas seguem o mesmo padrão do Estado de São Paulo¹⁸ e outros estados brasileiros^{17,19,20,21,22} ou seja, uma maior frequência do genótipo 1 seguido pelo 3 e 2, observando-se a presença dos genótipos 4 e 5 de prevalência africana, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo^{17,18,23}.

A frequência de genótipos nas regiões de Botucatu, Bauru e Assis assemelha-se as mais comumente encontradas no mundo ocidental¹³, levando a crer que o grande movimento migratório no século passado seja responsável pela diversidade de genótipos observados. Nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro observa-se a presença dos genótipos 4 e 5, oriundos provavelmente das regiões sul e central da África^{13,17}.

Neste estudo observamos que a distribuição geral dos subtipos do HCV das regiões estudadas apresenta predominância dos subtipos 1a (27,6%), 1b (28,2%) e 3a (34,5%) (Tabela 2).

Tabela 1. Distribuição dos genótipos do HCV em pacientes portadores crônicos pertencentes às regiões de Botucatu, Bauru e Assis, no período de 08/2002 a 05/2005.

Genótipos	Regiões						Total	
	Botucatu		Bauru		Assis		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	319	62,8	265	63,9	56	59,0	640	62,9
2	9	1,8	12	2,9	0	0,0	21	2,1
3	178	35,0	134	32,3	39	41,1	351	34,5
5	2	0,4	0	0,0	0	0,0	2	0,2
Misto (1 e 3)	0	0	4	1,0	0	0,0	4	0,4
Total	508	100,0	415	100,0	95	100,0	1018	100,0

Tabela 2. Distribuição dos subtipos do HCV em pacientes portadores crônicos pertencentes às regiões de Botucatu, Bauru e Assis, no período de 08/2002 a 05/2005.

Subtipos	Regiões						Total	
	Botucatu		Bauru		Assis		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	25	4,9	13	3,1	4	4,2	42	4,1
1a	127	25,0	129	31,1	25	26,3	281	27,6
1b	149	29,3	113	27,2	25	26,3	287	28,2
1 a / 1 b	18	3,5	10	2,4	2	2,1	30	3,0
2	6	1,2	3	0,7	0	0,0	9	0,9
2b	3	0,6	8	1,9	0	0,0	11	1,1
2a/2c	0	0,0	1	0,2	0	0,0	1	0,1
3a	178	35,0	134	32,3	39	41,0	351	34,5
5	1	0,2	0	0,0	0	0,0	1	0,1
5a	1	0,2	0	0,0	0	0,0	1	0,1
Misto (1e3)	0	0,0	4	1,0	0	0,0	4	0,4
Total	508	100,0	415	100,0	95	100,0	1.018	100,0

O subtipo 1a é mais freqüente na região de Bauru (31,1%), 1b na região de Botucatu (29,3%), enquanto o subtipo 3a apresenta uma freqüência maior na região de Assis (41,1%), sendo esta última superior às médias normalmente encontradas nos estados brasileiros^{17-21,23}

A classificação em subtipos pode ocasionalmente ser limitada pela falta de variações das seqüências específicas de subtipos na 5'UTR, podendo ocorrer padrões não identificáveis²⁴. Assim a metodologia utilizada não permitiu a diferenciação dos subtipos em 5,1% dos pacientes, sendo identificado apenas os genótipos 1 (4,1%), 2 (0,9%) e 5 (0,1%). Observamos também a presença de genótipos mistos (1 e 3) em 0,4% dos pacientes.

As variações genéticas, subtipos e quasispécies do HCV são responsáveis não apenas pelo escape do sistema imunológico²⁵⁻²⁸, mas também podem estar relacionadas à suscetibilidade ao tratamento^{29,30}. Assim, a determinação dos subtipos e quasispécies são extremamente úteis para orientação na escolha do tratamento adequado. Neste contexto, os dados obtidos com este trabalho poderão compor um banco de dados com informações sobre subtipos regionais do HCV.

REFERÊNCIAS

1. Nadler J. AIDS : etiologia. In: Veronesi R, Foccacia SR, editores. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996 p.83-6.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria n° 863, de 4 de novembro de 2002, Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: Hepatite Viral Crônica C [acesso 2003 apr 08] Disponível em: URL: <http://www.grupoesperanca.org.br>.
3. Grupo de Estudos da Sociedade de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Hepatite C no Brasil, 2005a [cited 2005 ago]. Available from: URL: www.sbhepatologia.org.br.
4. National Center for Biotechnology Information - Taxonomy browser; taxonomy ID:11103. Hepatitis C virus [cited 2003 april 08] Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.gov/Taxonomy/Browser>.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood born non-A, non-B hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62.
6. Conte VP. Hepatite crônica por Vírus C. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:187-94.
7. Silva MD. Hepatite C e testes diagnósticos. *Cad. de Farn* 2001; 17:111-5.
8. Barteuschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81:1631-48.
9. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlowsky JM. Structural Biology of Hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39(1):05-19.
10. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Guia de orientações técnicas Hepatites B e C. São Paulo; 2002.
11. Bravo R, Soriano V, Garcia Samaniego J, Gonzalez J, Castro A, Colmenero M, et al. Prevalence of the genotypes of the hepatitis C virus in Spanish drug addicts with chronic hepatitis C. Spanish Group for the Study of Viral Hepatitis in HIV Positive Patients. *Rev Clin Esp* 1996; 196:673-7.
12. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet Mol Res* 2003; 2:117-23.
13. Janis and friends hepatitis C support web site. Genotypes. Information on treatment according to genotype [serial on line] 2005b [cited 2005 sept 16]. Available from: URL: <http://janis7hepc.com/genotypes.htm>.
14. Peter S, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enotomo N, Feinstone S, et al. Consensus proposal for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42: 962-73.
15. Grupo vontade de viver de apoio aos portadores do vírus da hepatite C. Tratamento usual [serial on line] 2005b [cited 2005 sept 16]. Available from: URL: www.vontadedeviver.org.br.
16. Jardim ACG, Fachinni RM, Sanchez FE, Carvalho Salles AB, Souza FP, Zanetto DM, et al. Identification and genotyping of the Hepatitis C virus in individuals from a blood center. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:155 -6.
17. Bassit L, Ribeiro dos Santos G, Silva LC, Takei K, Villaca P, David Neto E, et al. Genotype distributions of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. *Hepatology* 1999; 29:994-95.
18. Spina AMM, Souza AT, Fernandes RB, Gushiken EKK, Ferraz M., Corvino SM, et al. Hepatitis C virus genotypes in the state of Sao Paulo, Brazil. In: Abstract of the 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses Montreal, 2005: P-08.
19. Oliveira MLA, Bastos FI, Sabino RR, Paetzold U, Schreier E, Pauli G et al. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; 2:79-282.
20. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcanti A. et al. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:213-6.
21. Wanderlei Silva DM, Gonzaga RS, Rodart IF, Lopes GB, Braga JHM, Ramalho Neto CE. and Reis MG. Distribution of Hepatitis C virus genotypes in Alagoas state, Brazil. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:154-5.
22. Oliveira RV, Fialho MV, Espírito-Santo MP, Silva LDA, Yoshida CFT, Lampe E. Comparison of hepatitis C virus genotypes tested by line probe assay (LiPA) and nucleotide sequencing analyses. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:156.
23. Lampe E, Espírito-Santo MP, Oliveira JM, Oliveira RV, Fialho MV, DeAlmeida AJ, et al. Genomic variability of hepatitis C virus strains from states of Bahia, Goiás and Rio de Janeiro, Brazil. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:156.
24. Guia de orientação técnica: HCV Genotype Assay (LiPA) Versant™ Bayer©, GO4622 Rev.0, 2002;13.
25. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa t, Hijikata M, Ohkoshi S, et al. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67:3923-30.
26. Taniguchi S, Okamoto M, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, et al. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195:297-301.
27. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15:41-63.
28. Sakai A, Shuichi K, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999; 30:556-61.
29. Simmonds P, Mellor J, Sanchez Tapias JM, Alberti A, Priet J, Colombo M, et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *J Hepatol* 1996; 24:517-24.
30. Brechot C. The direct interplay between HCV NS5A protein and interferon transduction signal: from clinical to basic science. *J Hepatol* 1999; 30:1152-54.