

Subtipagem do vírus da Hepatite C por sequenciação: um contributo para o conhecimento da diversidade genética

Elizabeth Pádua, Ana Patrícia Avó, Ivone Água Doce, Catarina Almeida, Helena Cortes Martins

elizabeth.padua@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Sexualmente Transmissíveis.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

A hepatite C é reconhecida como uma doença de importância global em Saúde Pública atingindo tanto países desenvolvidos como países em vias de desenvolvimento. O seu agente etiológico – o vírus da hepatite C (VHC) – é endémico em todo o mundo e a taxa de prevalência da infeção pode variar significativamente, sendo influenciada, quer pelas principais vias de transmissão, quer pelas políticas de saúde implementadas nos diferentes países (1, 2). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 150 a 170 milhões de indivíduos estejam infetados pelo VHC (3). Embora a incidência da infeção tenha diminuído nos últimos anos, a sua prevalência permanece elevada devido à cronicidade da doença em cerca de 80% dos indivíduos infetados (2, 4).

Em Portugal, existem poucos estudos sobre a infeção pelo VHC, estimando-se uma prevalência entre 1% e 1,5% estando esta infeção associada a 45% dos casos de hepatite notificados no nosso país (5, 6). No entanto, é reconhecido que nem todos os casos são notificados e muitos dos casos não são diagnosticados. Entre os países europeus, Portugal apresenta a taxa de prevalência mais elevada por VHC em grupos populacionais Utilizadores de Drogas Injetáveis (UDI), podendo esta variar entre 60% e 80% (6, 7).

O VHC é caracterizado por uma elevada variabilidade genética, traduzida na sua classificação em 6 diferentes genótipos e em mais de 100 subtipos virais com distintos padrões de distribuição epidemiológica em todo o mundo. A taxa de evolução é rápida e o grau de diversificação dos vírus aumenta significativamente ao longo do tempo, resultando no desenvolvimento de *quasispecies* que são im-

portantes na história natural da infeção e permitem a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (8).

Apesar de não se ter conseguido ainda desenvolver uma vacina contra o VHC, têm sido alcançados avanços significativos na produção de fármacos de ação direta contra o vírus (9). Contudo, devido ao elevado custo destes antivirais, a terapia combinada de INF- α -PEG e RBV mantém-se como tratamento padrão da maioria dos doentes crónicos (10). Este regime terapêutico induz uma Resposta Viroológica Sustentada (RVS) que varia entre 42% e 82% e é dependente do genótipo do vírus em causa (10). Nas infeções pelo genótipo 1 são observadas as taxas de RVS mais baixas (40-50%). Em contraste, para os genótipos 2 ou 3 são obtidas as taxas de RVS mais elevadas, podendo atingir 80%. Taxas de RVS de valores intermédios (43-70%) foram associadas a infeções pelo genótipo 4 (10-12).

Uma vez que os vários genótipos de VHC estão associados a uma diferente evolução da infeção e doença, a genotipagem do vírus tornou-se na principal ferramenta que o clínico dispõe para a determinação da dosagem e duração do tratamento, bem como para o conhecimento do prognóstico da infeção. Porém, a resposta clínica diferenciada de doentes infetados com diferentes subtipos do mesmo genótipo de VHC, já descrita na literatura para os subtipos 1a e 1b, continua a colocar hipóteses de investigação sobre a importância do subtipo do vírus na resposta ao tratamento e na progressão da doença crónica pelo VHC (13).

O método de sondas em linha, baseado na hibridação reversa (designado por LiPA), é o ensaio comercial mais utilizado nos países europeus para a genotipagem do VHC. No entanto, apresenta um fraco desempenho para a subtipagem dos vírus (14). Em 2009, o Laboratório Nacional de Referência de Infeções Sexualmente Transmissíveis-VIH e vírus da Hepatite B e C do INSA desenvolveu um ensaio molecular *in house* para melhorar a classificação do VHC (14). Nos últimos 3 anos, este ensaio tem sido correntemente utilizado no laboratório e aplicado em amostras clínicas em que não foi possível determinar o subtipo de VHC quando previamente submetidas ao ensaio comercial LiPA.

_Objetivos

O presente estudo pretende dar a conhecer os resultados da caracterização molecular do VHC, realizada no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2008 e 2013, e revelar o contributo de um ensaio *in house* para a determinação dos subtipos por análise de sequências virais do VHC.

_Material e métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados da genotipagem do VHC obtidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C entre 2008 a 2013. A caracterização molecular para a classificação do vírus foi realizada pelo ensaio comercial (VERSANT™ HCV Genotype 2.0 Assay-LiPA (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA). As amostras em que o subtipo não foi determinado foram submetidas a um ensaio molecular *in house*, baseado na amplificação, sequenciação e análise de duas regiões genómicas do VHC - as regiões C/E1 e NS5B (14).

_Resultados e discussão

Caracterização da população estudada

Durante o período em análise foi realizada a genotipagem do VHC pelo ensaio comercial LiPA em 1004 amostras clínicas de indivíduos infetados por VHC, das quais 71,1% foram obtidas de reclusos, 13,4% de indivíduos da população em geral sem risco conhecido e 4,4% de UDI. Em relação ao género, 90,5% eram provenientes de homens e 9,5% de mulheres, sendo que a idade média da população analisada variou anualmente entre 35,3 e 42,4 anos (Tabela 1).

Genotipagem do VHC

Os resultados de genotipagem ao longo do período em análise revelaram uma maior frequência de infeções pelo genótipo 1 (55%, variando entre 50,7% e 57,9%), seguida do genótipo 3 (28,2%, variando entre 21,0% e 35,5%) e do genótipo 4 (13,9%, variando entre 11,0% e 15,9%). O genótipo 2 foi o menos frequente (1,5%, variando entre 0% e 2,3%) e não foram detetados casos de infeção pelos genótipos 5 e 6. Verificou-se, ainda, que 1,4% (n=14) das amostras analisadas apresentaram um resultado inconclusivo pelo método LiPA, incluindo três casos que revelaram um perfil compatível com infeção mista por diferentes genótipos de VHC (Tabela 2).

O genótipo 1, seguido do genótipo 2 e do genótipo 3 têm sido descritos como os mais prevalentes a nível mundial, nomeadamente nos continentes Europeu e Americano. Neste estudo, os genótipos 1 e 3 foram os mais frequentes ao longo dos 6 anos em análise (Tabela 2). Por outro lado, foi observado que 13,9% das infeções correspondiam ao genótipo 4, que tem sido descrito na literatura como mais prevalente em países do Médio Oriente e no do norte de África, em particular no Egito (15, 16).

Subtipagem do VHC

No presente estudo, observou-se que, do total dos casos classificados de genótipo 1, cerca de 78,3% (432/552) pertenciam ao subtipo 1a e 18,1% (100/552) ao subtipo 1b. Em 3,6% (20/552) dos casos não foi possível determinar o subtipo do vírus pelo ensaio comercial LiPA. Observou-se ainda, que a diferença proporcional entre a frequência do subtipo 1a e a do subtipo 1b foi constante em cada ano, e ao longo do período em análise, sendo sempre mais frequente para o subtipo 1a. Contudo, na literatura é descrito que o subtipo 1b é o subtipo mais prevalente a nível mundial, amplamente distribuído na Europa e em alguns países de África e do Sudoeste Asiático, encontrando-se associado a indivíduos de idade avançada e que adquiriram a infeção por transfusões sanguíneas no passado (16, 17). Neste estudo, a maioria dos casos identificados como subtipo 1b eram reclusos e de uma faixa etária mais jovem.

O segundo subtipo mais frequente na população estudada foi o subtipo 3a (28,2%), que à semelhança do que acontece para o subtipo 1a, foi descrito como comum em UDI em vários países Europeus (15-18). Neste trabalho e apesar do viés de seleção da população estudada, não pode ser excluído o eventual uso de drogas endovenosas pelos indivíduos que constituem o grupo de reclusos.

Das 1004 amostras clínicas submetidas ao ensaio comercial LiPA, não foi possível subtipar o VHC em 185 (18,4%) casos: em 126 (64,3%) o subtipo não foi discriminado e em 59 (30,1%) o subtipo não foi determinado. Em 11 casos a subtipagem foi inconclusiva. Assim, e no sentido de melhorar os resultados da classificação do VHC para estes casos, procedeu-se à sequenciação das regiões genómicas virais C/E1 e NS5B, utilizando um ensaio molecular *in-house*, desenvolvido no Laboratório Nacional de Referência IST-VIH e Hepatite B e C do INSA. Este novo método foi aplicado em 87 (44,4%) das amostras sem subtipo conhecido, nas restantes o volume disponível mostrou-se insuficiente. A sequenciação e análise das regiões genómicas amplificadas permitiram determinar com êxito o subtipo do VHC em 86 (98,9%) destas amostras. (Tabela 3).

Tabela 1: Caracterização da população estudada para genotipagem do VHC, 2008-2013.

ANO	Total (n)	Homens % (n)	Mulheres % (n)	Idade média (n)	Grupo populacional		
					Pop. em geral % (n)	¹ Reclusos	UDI % (n)
2013	140	85,7% (120)	14,3% (20)	41,2 (106)	23,6% (33)	76,4% (107)	0
2012	138	92,8% (128)	7,2% (10)	39,6 (116)	16,7% (23)	77,5% (107)	5,8% (8)
2011	71	83,1% (59)	16,9% (12)	42,4 (57)	25,4% (18)	38% (27)	36,6% (26)
2010	214	92,5% (198)	7,5% (16)	35,3 (71)	16,4% (35)	79,4% (170)	4,2% (9)
2009	226	93,4% (211)	6,6% (15)	36,5 (110)	10,6% (24)	88,9% (201)	0,4% (1)
2008	215	89,8% (193)	10,2% (22)	39,6 (146)	0,9% (2)	49,8% (105)	0
TOTAL	1004	90,5% (909)	9,5% (95)	38,6 (606)	13,4% (135)	71,1% (714)	4,4% (44)

¹ Não podem ser excluídos comportamentos de risco para a infeção VHC, nomeadamente o uso de drogas injetáveis (UDI)

Tabela 2: Resultados de genotipagem do VHC (ensaio LiPA 2.2), 2008-2013.

Ano	Genotipo 1 % (n)	Genotipo 2 % (n)	¹ Genotipo 3 % (n)	² Genotipo 4 % (n)	Inconclusivo % (n)
2013	50,7% (71)	0,71% (1)	33,6% (47)	14,3% (20)	0,7% (1)
2012	51,4% (71)	0	35,5% (49)	12,3% (17)	0,7% (1)
2011	57,7% (41)	0	21,1% (15)	15,5% (11)	5,6% (4)
2010	57,9% (124)	2,3% (5)	21,0% (45)	15,9% (34)	2,8% (6)
2009	52,3% (134)	1,8% (4)	27,4% (62)	11% (25)	0,4% (1)
2008	51,6% (111)	2,3% (5)	30,7% (66)	14,9% (32)	0,5% (1)
Total	55% (552)	1,5% (15)	28,2% (283)	13,9% (140)	1,4% (14)

¹ Todos os casos foram classificados de subtipo 3a

² Identificados casos não subtipados de genótipo 4 e casos de subtipo indiscriminado 4a/4c/4d

Tabela 3: Resultados da subtipagem do VHC pelo ensaio molecular in house em amostras clínicas não subtipadas e/ou inconclusivas no ensaio comercial LiPA 2.2.

ANO	Amostras analisadas por LiPA		Amostras analisadas pelo ensaio molecular in house (sequenciação da região CE1 e/ou NS5B do VHC) ¹		
	Total (n)	Não subtipadas e/ou inconclusivas (n)	Total (n)	Subtipadas (n)	Não subtipadas (n)
2013	140	23	23	23	0
2012	138	20	19	19	0
2011	71	16	14	14	0
2010	214	47	4	4	0
2009	226	43	6	5	1
2008	215	47	21	21	0
Total	1004	196	87	86	1

¹ Todas as amostras com volume suficiente para o ensaio molecular in house



Conclusão

O elevado desempenho revelado pelo ensaio molecular *in house* na determinação dos subtipos virais, comparativamente ao ensaio comercial LIPA, possibilita uma melhoria na classificação do VHC e, deste modo, contribui para aumentar o conhecimento do papel da diversidade genética na progressão da doença.

Num futuro próximo, e de forma mais alargada, os antivirais aprovados para tratamento da infeção pelo VHC serão administrados a doentes crónicos, facto que tem implicações clínicas e virológicas a curto prazo (19). É por isso crucial implementar a melhor estratégia laboratorial para a classificação dos vírus e estar preparado para a nova era de tratamento e monitorização da infeção pelo VHC. Neste sentido, o Laboratório Nacional de Referência de Infeções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C do INSA está já a desenvolver métodos laboratoriais que permitam a análise molecular de outras regiões genómicas do VHC alvo dos antivirais, nomeadamente dos inibidores da protease NS3/4A, bem como a pesquisa de mutações de resistência aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite C.

Referências bibliográficas:

- (1) Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29(Suppl 1):74-81.
- (2) Jafari N, Farajzadegan Z, Ataei B. Surveillance system for hepatitis C infection: a practical approach. *Int J Prev Med.* 2012;3(Suppl 1):S48-57. [LINK](#)
- (3) Hepatitis C—global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec.* 2000; 75(3): 18-19.
- (4) Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):107-15.
- (5) Marinho R, Moura M, Gira J, et al. Epidemiological aspects of hepatitis C in Portugal. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(9):1076-7.
- (6) Marinho RT, Lavanchy D. Viral Hepatitis. *Meeting News* 2011;19(2): 1-24. [LINK](#)
- (7) Vieira AM, Freire R, Mangualde J, et al. Hepatite C - casuística da consulta de hepatologia de um hospital distrital. *J Port Gastroenterol.* 2007;14(3): 134-40. [LINK](#)
- (8) Bukh J, Miller R, Purcell R. Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13(Suppl 13):S3-7.
- (9) Thomas DL. Advances in the treatment of Hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med.* 2012;20(1):5-10. [LINK](#)
- (10) Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005; 436(7053):967-72.
- (11) Kanda T, Yokosuka O, Omata M. Treatment of hepatitis C virus infection in the future. *Clin Transl Med.* 2013;2(1):9. doi: 10.1186/2001-1326-2-9. [LINK](#)
- (12) Antaki N, Craxi A, Kamal S, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int.* 2010;30(3):342-55.
- (13) Zein N, Poterucha J, Gross JB Jr, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(12):2560-2.
- (14) Avó AP, Água-Doce I, Andrade A, et al. Hepatitis C Virus Subtyping Based on Sequencing of the C / E1 and NS5B Genomic Regions in Comparison to a Commercially Available Line Probe Assay. *J Med Virol.* 2013;85(5):815-22.

- (15) de Bruijne J, Schinkel J, Prins M, et al. Emergence of hepatitis C virus genotype 4: phylogenetic analysis reveals three distinct epidemiological profiles. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47: 3832-8. [LINK](#)
- (16) Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008;48(1):148-62.
- (17) Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 11):3173-88. [LINK](#)
- (18) van Asten L, Verhaest I, Lamzira S, et al; European and Italian Seroconverter Studies. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. *J Infect Dis.* 2004;189(2):292-302. [LINK](#)
- (19) Pawlotsky JM. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000 Biol Rep.* 2012;4:5. [LINK](#)