

Caracterização molecular dos isolados do vírus da hepatite C em pacientes com tuberculose em Goiânia, Goiás

Andreia A. Andrade, Nádia R.S. Reis, Thaís A. Marinho, Regina M.B. Martins

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, CEP: 74.605-050, Brasil
andreaandrade_16@hotmail.com e rbringel@terra.com.br

Palavras-chave: HCV, tuberculose, genótipos

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) tornou-se um importante problema de saúde pública, com conseqüências epidemiológicas e clínicas, constituindo na atualidade a maior causa de doença hepática crônica, pois cerca de 50 a 85% dos casos evoluem para cronicidade, podendo desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular (LAVANCHY, 2009; PONDÉ, 2010; TE & JENSEN, 2010).

Choo e colaboradores identificaram o HCV em 1989 (CHOO *et al.*, 1989). Esse vírus é classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivírus* (ICTV 2009). A partícula viral tem cerca de 60 nm de diâmetro e apresenta um envelope lipídico. O genoma viral é formado por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 9.400 nucleotídeos (nt), possuindo uma longa região aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) flanqueada por regiões não codificantes (NC) nas extremidades 5' e 3'. A região codificante dá origem a uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos, que é clivada por proteases celulares e virais, resultando nas proteínas estruturais (*core*/proteína C e do envelope/ E1 e E2) e não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) do HCV (SHARMA, 2010).

O genoma do vírus da hepatite C é caracterizado por uma considerável variabilidade genética e diversidade geográfica, sendo classificado em seis genótipos (1-6) e diversos subtipos. Essas variações do HCV influenciam no diagnóstico, na patogênese, no tratamento da infecção e no desenvolvimento de vacinas (SIMMONDS *et al.*, 2005; IRSHAD *et al.*, 2010).

Revisado pelo Orientador.

Orientadora: Regina M. B. Martins.

Orientanda: Andreia A. Andrade.

Pós- Graduandas: Nádia R.S. Reis, Thaís A. Marinho.

Para diagnosticar a hepatite C realizam-se ensaios sorológicos, para detecção de anticorpos para o HCV (anti-HCV), e testes moleculares, que detectam o ácido nucléico viral (HCV RNA), definindo os portadores do vírus, além de caracterizá-lo em genótipos e subtipos (SCOTT & GRETCH, 2007; CHEVALIEZ, 2011).

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa com distribuição global, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido também com Bacilo de Koch, que atinge principalmente os pulmões e se mantém como uma importante causa de morbimortalidade (WHO, 2009). Estima-se que aproximadamente dois milhões de indivíduos (30% da população mundial) estão infectados com essa bactéria. No Brasil, mais de 50 milhões de pessoas estão infectadas pelo *M. tuberculosis*, estimando-se em 80.000 o número de casos novos por ano, e em 5.000 o número de óbitos anualmente (BRASIL, 2010).

Poucas são as investigações sobre a infecção pelo HCV em pacientes com tuberculose. Nos Estados Unidos, El-Serag *et al.*, (2003) verificaram, no Texas, que a infecção pelo HCV mostrou-se associada à tuberculose. Uma associação semelhante foi observada na Malásia em pacientes com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Alguns desses pacientes apresentaram hepatotoxicidade durante o tratamento para TB (NISSAPATORN *et al.*, 2006). Os trabalhos realizados por Ungo *et al.*, (1998), Kwon *et al.*, (2007) e Nader *et al.*, (2010) também destacaram a hepatotoxicidade no tratamento da TB, sendo que considerou-se como importante fator a presença da infecção pelo HCV.

Estudos realizados na Geórgia mostraram taxas altas de prevalência para o marcador anti-HCV (12% e 22%) em pacientes com TB. Fatores como história de encarceramento, transfusão sanguínea, uso de droga injetáveis, tatuagem, doença sexualmente transmissível e idade de 26-45 anos foram associados à infecção pelo HCV (RICHARDS *et al.*, 2006; KUNIHOLM *et al.*, 2008). Na Tailândia, uma prevalência de 31,5% foi estimada e fatores como uso de droga injetável e residir em Bangkok foram associados a esta infecção (SIRINAK *et al.*, 2008). O único estudo realizado na América do Sul mostrou uma prevalência de 11,8% na Argentina (PANDO *et al.*, 2008). Mais recentemente, Wang *et al.*, (2011) estimaram em Taiwan uma prevalência de 6,7% para infecção pelo HCV em pacientes com TB.

Para o melhor entendimento da participação da população com TB na infecção/disseminação do HCV, os estudos epidemiológicos englobando a detecção do RNA HCV e a caracterização viral são fundamentais. Contudo, tais estudos ainda são escassos. Além disso, para o nosso conhecimento, não existem estudos sobre a infecção pelo HCV em pacientes com TB no Brasil.

2. OBJETIVOS

- ❖ Detectar o RNA do HCV nas amostras anti-HCV positivas de pacientes com tuberculose em Goiânia - Goiás;
- ❖ Identificar os genótipos e subtipos do HCV circulantes na população estudada.

3. METODOLOGIA

3.1 População de Estudo

A população foi constituída de pacientes com tuberculose, atendidos em hospital de referência para doenças infecciosas em Goiânia-Goiás (Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad), no período de abril de 2008 a março de 2010. Os pacientes com TB (N = 402) foram entrevistados sobre dados sócio-demográficos e possíveis fatores de risco para infecção pelo HCV. A seguir, foram coletados 10 ml de sangue, os quais foram armazenados adequadamente e transportados para o Laboratório de Virologia/IPTSP/UFG. Os soros foram separados e estocados em duas alíquotas, uma a -20°C (análise sorológica) e outra a -70°C (análise molecular) até a realização dos ensaios.

3.2 Testes Sorológicos

Os soros foram testados para a detecção de anticorpos para o HCV (anti-HCV) pelo ELISA de terceira geração (*Hepanostika Ultra, Biomedical*). A positividade das amostras anti-HCV reagentes foi confirmada por *immunoblot (Recombinant Immunoblot Assay – RIBA)*.

3.3 Testes Moleculares

As amostras anti-HCV positivas foram testadas para detecção do RNA viral pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se *primers* complementares à região 5' não codificante do genoma do HCV. As amostras positivas foram submetidas à genotipagem pelo método *line probe assay* (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica). No momento, estamos quantificando o RNA HCV por PCR em tempo real.

4. RESULTADOS

De um total de 402 pacientes com tuberculose em Goiânia-Goiás, 35 (8,7%) foram anti-HCV reagentes por ELISA, sendo a positividade confirmada em 30 (7,5%) pacientes pelo *immunoblot*. Assim, estas 30 amostras anti-HCV positivas foram submetidas à detecção do RNA-HCV, sendo este encontrado em 76,6% (23/30) das amostras testadas. Foi realizada genotipagem das 23 amostras RNA-HCV positivas, encontrando-se uma predominância do genótipo 1 (n =17) , seguido do genótipo 3 (n = 6) (Tabela 1, Figura 1).

A Figura 1 apresenta a prevalência dos genótipos/subtipos do HCV em pacientes com tuberculose em Goiânia. De 23 amostras, 73,9% foram identificadas como do genótipo 1, sendo 13 (56,5%) do subtipo 1a e 4 (17,4%) do subtipo 1b, e 6 (26,1%) do genótipo 3/ subtipo 3a.

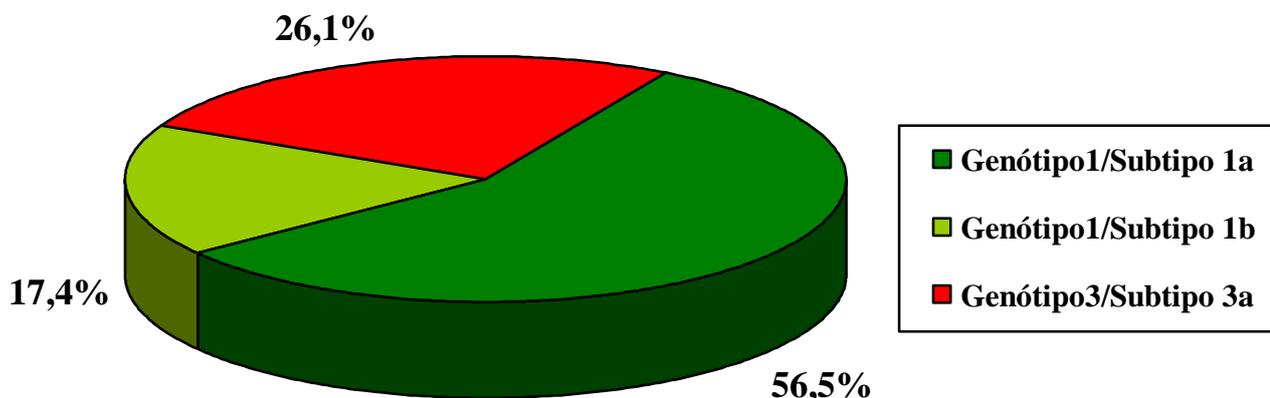


Figura1- Prevalência dos genótipos/subtipos do HCV em pacientes com tuberculose em Goiânia-Goiás.

Tabela 1- Detecção do RNA e genotipagem do HCV, nas amostras anti-HCV positivas de pacientes com tuberculose em Goiânia, Goiás

| Amostras | RNA-HCV* | Genótipos | Subtipos |
|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| TB-04 | + | 1 | 1b |
| TB-30 | - | - | - |
| TB-32 | + | 1 | 1a |
| TB-40 | + | 3 | 3a |
| TB-48 | + | 1 | 1a |
| TB-61 | + | 1 | 1b |
| TB62 | + | 1 | 1a |
| TB-76 | + | 1 | 1a |
| TB-93 | - | - | - |
| TB-100 | - | - | - |
| TB-120 | + | 1 | 1a |
| TB-139 | - | - | - |
| TB-168 | + | 3 | 3a |
| TB-172 | + | 1 | 1b |
| TB-207 | + | 3 | 3a |
| TB-208 | + | 1 | 1a |
| TB-215 | + | 1 | 1a |
| TB-216 | + | 1 | 1a |
| TB-225 | + | 1 | 1a |
| TB-290 | + | 3 | 3a |
| TB-314 | + | 3 | 3a |
| TB-338 | - | - | - |
| TB-343 | - | - | - |
| TB-346 | + | 1 | 1a |
| TB-356 | + | 3 | 3a |
| TB-359 | + | 1 | 1a |
| TB-367 | + | 1 | 1b |
| TB-371 | + | 1 | 1a |
| TB-380 | + | 1 | 1a |
| TB-397 | - | - | - |

***RNA HCV + = positivo, RNA HCV - = negativo**

5. DISCUSSÃO

Apesar da hepatite C e tuberculose serem importantes problemas de saúde pública, poucos são os estudos sobre a infecção pelo HCV em pacientes com TB e vice-versa. Deste modo, ressalta-se que este é o primeiro estudo soropidemiológico da infecção pelo HCV em pacientes com tuberculose no Brasil. Na primeira etapa desta investigação, a soropositividade para anti-HCV foi confirmada em 30 amostras, resultando em uma prevalência de 7,5% para anti-HCV na população estudada. Além disso, verificou-se que idade (30 a 49 anos), uso de drogas injetáveis e positividade para anti-HIV foram fatores independentemente associados à infecção pelo HCV.

Nesta etapa, realizou-se a pesquisa do RNA viral, marcador que define infecção presente nos indivíduos anti-HCV positivos. Portanto, ao detectar o RNA-HCV pode-se diferenciar os pacientes com tuberculose portadores e potenciais disseminadores do HCV, daqueles que foram expostos ao vírus da hepatite C (anti-HCV reagentes) e eliminaram esse agente (CHEVALIEZ, 2011). A frequência do RNA-HCV encontrada nas amostras anti-HCV positivas foi de 76,6% (23/30). Este valor está de acordo com a literatura, que é de aproximadamente 80% (STRAMER *et al.*, 2000, MARTINS *et al.*, 2006).

O padrão de distribuição dos genótipos do HCV difere geograficamente, e esta diferença tem reflexo na epidemiologia da infecção (SIMMONDS *et al.*, 2005). No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 estão distribuídos por todas as regiões, enquanto os genótipos 4 e 5 estão restritos a Região Sudeste (São Paulo), além de Salvador e Mato Grosso, respectivamente (CAMPIOTTO *et al.*, 2005, ZARIFE *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009). O genótipo 1 do HCV é predominante no País, seguido do genótipo 3 (CAMPIOTTO *et al.*, 2005), bem como em nossa região (MARTINS *et al.*, 2006), o que é concordante com os achados deste estudo. A predominância do genótipo 1 tem implicações no tratamento da hepatite C, tendo em vista que este genótipo apresenta menor resposta ao tratamento em relação ao genótipo 3 (MUNIR *et al.*, 2010).

Semelhantemente ao presente trabalho, outros estudos realizados em Goiás mostraram o subtipo 1a como o mais prevalente, seguido dos subtipos 3a e 1b em doadores de sangue, transplantados renais e usuários de drogas (MARTINS *et al.*, 2006; BOTELHO *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009). Os subtipos 1a, 1b e 3a apresentam uma distribuição mundial e, segundo SIMMONDS *ET AL.*, (2005), resultam da transmissão do HCV entre usuários de drogas e pessoas que relatam transfusão de sangue e procedimentos invasivos nos últimos 50 a 70 anos.

Portanto, este estudo mostrou uma prevalência elevada do genótipo 1 do HCV na população estudada, que está associada a baixa resposta ao tratamento com interferon e ribavirina

(MUNIR *et al.* 2010). Esses dados, assim como a taxa elevada de cronicidade da hepatite C, além da indisponibilidade de uma vacina específica para o HCV, reforçam a importância do diagnóstico e de estratégias de controle da hepatite C na população estudada.

6. CONCLUSÕES

- Detectou-se o RNA viral em 76,6% das amostras anti-HCV positivas, o que está de acordo com a literatura, correspondendo, assim, aos pacientes com tuberculose portadores e potenciais disseminadores do HCV;
- Identificou-se os genótipos 1 e 3 do HCV, com predomínio do subtipo 1a, seguido de 3a e 1b na população estudada, corroborando os dados de outros estudos realizados em Goiás, que demonstram a circulação desses genótipos/subtipos em nossa região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em Saúde - Vigilância em Saúde. **Tuberculose – Situação Epidemiológica. A Situação da doença no Brasil.** Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> Acesso em: 06 Julho 2010.

BOTELHO, S.M.; FERREIRA, R.C.; REIS, N.R.; KOZLOWSKI, A.G.; CARNEIRO, M.A.; TELES, S.A.; YOSHIDA, C.F.; MARTINS, R.M. Epidemiological aspects of hepatitis C virus infection among renal transplant recipients in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.472-6, 2008.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DASILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V. et al . Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.38,n.1, p. 41-49, 2005.

CHEVALIEZ, S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection.. **Clinical Microbiology and infection**, v.17, n. 2, p.116-21, 2011.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244:p. 359-362, 1989.

EL-SERAG, H.B.; ANAND, B.; RICHARDSON, P.; RABENECK, L. Association between hepatitis C infection and other infectious diseases: a case for targeted screening? **The American Journal of Gastroenterology**, v.98, n.1, p.167-174, 2003.

ICTV 2009. Hepatitis C virus. In: Virus Taxonomy:2009 Release – The Universal Virus Database, version 2009. Buchen- Osmond, C (Ed) Columbia University , New York, USA. Disponível em : < [http://www.ictvonline.org/virus Taxonomy.asp?version = 2009](http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009)> Acesso em: 06 de abril de 2010.

IRSHAD, M.; ANSARI, M.A.; SINGH ,A.; NAG, P.; RAGHVENDRA, L.; SINGH, S.; BADHAL, S.S. HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenicity and response to treatment. **Hepatogastroenterology**, v.57, n.104, p.1529-38, 2010.

KWON ,Y.S.; KOH,W.J.; SUH,G.Y.; CHUNG, M.P.; KIM,H.; KWON, O.J. Hepatitis C virus infection and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. **Official Publication of the American College of Chest Physician**, v. 131, p.803-808, 2007.

KUNIHOLM, M.H.; MARK, J.; ALADASHVILI, M.; SHUBLADZE, N.; KHECHINASHVILI, G.; TSERTSVADZE, T.; DEL RIO, C.; NELSON, K.E. Risk factors and algorithms to identify hepatitis C, hepatitis B, and HIV among Georgian tuberculosis patients. **International Journal Infectious Diseases**, v.12, n.1, p. 51-56, 2007.

LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. **Liver International**, v.29, p. S74-S81, 2009.

LOPES, C.L.R.; TELES,S.A.; ESPÍRITO SANTO,M.P.; LAMPE,E.; RODRIGUES,F.P.; MOTTA-CASTRO,A.R.C.; MARINHO,T.A.; REIS,N.R.; SILVA,A.M.; MARTINS,R.M. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43,n.1, p.43-50,2009.

MARTINS,R.M.B. Prevalência,fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. **Revista Saúde Pública**,v.43, n.1, p.43-50,2009.

MARTINS, R.M.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, A.; R, SOUTO, F.J.; MUSSI A, AMORIM, R.M.; MARTINS, C.R. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de Sao Paulo** , v. 48, n. 1, p. 53-5, 2006.

MUNIR, S.; SALEEM, S.;IDREES, M.; TARIQ, A.; BUTT ,S.; RAUFF, B.; HUSSAIN, A.; BADAR, S.; NAUDHANI ,M.; FATIMA, Z.; ALI, M.; ALI, L.; AKRAM, M.; AFTAB, M.; KHUBAIB, B.;AWAN, Z. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. **Virology Journal**, v. 1, n.7, p. 296,2010.

NADER, L.A.; DE MATTOS, A.A.; PICON,P.D.; BASSANESI,S.L.; DE MATTOS,A.Z.; PINEIRO RODRIGUES,M. Hepatotoxicity due to rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in patients with tuberculosis: anti-HCV a risk factor? **Annals of Hepatology : Official Journal of the Mexican Association of Hepatology**, v.9, p.70-4,2010.

NISSAPATORN, V.; KUPPUSAMY, I.; JOSEPHINI, F.P.; JAMAIAH, I.; KHSIRUL, R.M. Tuberculosis: a resurgent disease in immunosuppressed patients. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.37, n.3, p.153-160, 2006.

PANDO, M.A.; DE SALVO, C.; BAUTISTA, C.T.; EYZAGUIRRE, L.; CARRION ,G.; FEOLA ,M.; LADO, I.; HOFFMAN, M.; BIGLIONE, M.M.; CARR, J.K.; MONTANO, S.M.; SANCHEZ, J.L.; WEISSENBACHER, M.; AVILA, M.M. Human immunodeficiency virus and tuberculosis in Argentina: prevalence, genotypes and risk factors. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.190-197, 2008.

PONDÉ, R.A.DE ALMEIDA.; Hidden hazards of HCV transmission. **Medical Microbiology Immunology**,v.200,n.1,p.7-11,2010.

RIBEIRO, L.C.; SOUTO, F.J.; DO ESPÍRITO-SANTO, M.P.; G-OLIVEIRA, R.;LAMPE,E. An autochthonous case of hepatitis C virus genotype 5a in Brazil: phylogenetic analysis. **Archives of Virology**, v.154, n.4, p.665-70, 2009.

RICHARDS, D.C.; MIKIASHVILI, T.; PARRIS, J.J.; KOURBATOVA, E.V.; WILSON, J.C.; SHUBLADZE, N.; TSERTVADZE, T.; KHECHINASHVILI, G.; DEL RIO, C.; BLUMBERG, H.M. High prevalence of hepatitis C virus but not HIV co-infection among patients with tuberculosis in Georgia. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.10, p.396-401, 2006.

SCOTT, J.D.; GRETCH, D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 297, n. 7, p. 724-32, 2007.

SHARMA, S. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. **The Indian Journal Medical Research**, n.131, p.17-34, 2010.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D.G.; OKAMOTO, H.; PAWLOTSKY, J.M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L.J.; THIEL, H.J.; VIAZOV, S.; WEINER, A.J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SIRINAK, C.; KITTIKRAISAK, W.; PINJEESEKIKUL, D.; CHARUSUNTONSRI, P.; LUANLOED, P.; SRISUWANVILAI, L.O.; NATENIYOM, S.; AKKSILP, S.; LIKANONSAKUL, S.; SATAYAWUTHIPONG, W.; BURAPAT, C.; VARMA, J.K. Viral hepatitis and HIV-associated tuberculosis: risk factors and TB treatment outcomes in Thailand. **BMC Public Health**, v.18, p. 245, 2008.

STRAMER, S.L.; CAGLIOTI, S. & STRONG, D.M. - NAT of the United States and Canadian blood supply. **Transfusion**, **40**, p. 1165-1168, 2000.

TE, H.S.; JENSEN, D.M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. **Clinics Liver Disease**. v.14n.1p. 1-21, 2010.

UNGO, J.R.; JONES, D.; ASHKIN, D.; ELENA S. HOLLENDER, E.S.; DAVID, B.; ALBANESE, A.P.; ARTHUR, E.P.; Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role

of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.157, p.1871-1876, 1998.

WANG, J.Y.; LIU, C.H.; HU, F.C.; CHANG, H.C.; LIU, J.L.; CHEN, J.M.; YU, C.J.; LEE, L.N.; KAO, J.H.; YANG, P.C.; Risk factors of hepatitis during Anti-tuberculous treatment and implications of hepatitis virus load. **Journal of infection**, p.1-8, 2011.

WHO - World Health Organization. **Global Tuberculosis Control: A Short Update to the 2009 Report**. Geneva, 2009, 39p.

ZARIFE, M.A.; DE OLIVEIRA, E.C.; ROMEU, J.M.; DOS REIS, M.G. Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 567-9, 2006.