

Co-Infecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região

HIV/HCV Co-Infection in Patients from Botucatu and Region (Brazilian cities)

Sílvia M. Corvino¹

Rita M.S. Henriques²

Rejane M.T. Grotto²

Maria Inês de M.C. Pardini²

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Sorocaba, SP

² UNESP- Faculdade de Medicina, Hemocentro, Laboratório de Biologia Molecular / Hepatites Virais, Botucatu, SP

Correspondência: Sílvia M. Corvino, Rua Gino Cariola, 88, Jardim Paraíso, Botucatu, SP
CEP 18609-060. E-mail: silma_cor@yahoo.com.br

Resumo

Devido à similaridade nas rotas de transmissão, a co-infecção HIV/HCV é frequente, afetando em média 30 a 50% dos portadores de HIV. O presente estudo visou avaliar uma possível associação entre os subtipos do HIV e genótipos do HCV em pacientes co-infectados, com base na análise das frequências em pacientes mono e co-infectados. Para determinação da frequência dos subtipos HIV e genótipos HCV, foram analisados respectivamente 124 e 496 pacientes mono-infectados. O estudo da co-infecção foi realizado num grupo de 150 pacientes HIV positivos e esteve presente em 22 (14,7%) dos pacientes. A frequência dos subtipos do HIV-1 em mono-infectados foi: subtipo B (85,5%), subtipo F (12,9%) e recombinante B/F (1,6%), enquanto nos genótipos HCV foi: 1a (25%), 1b (29,4%), 1a/1b (3,6%), 3a (35%), 2 (1,8%) e 5 (0,4%). Nos co-infectados o padrão de distribuição dos subtipos HIV-1 é semelhante aos mono-infectados, ou seja, subtipo B (85,0%), seguido do subtipo F (15,0%). A distribuição de frequência de genótipos HCV nos co-infectados foi: 1a (36,3%), 1b (27,3%), 1a/1b (9,1%) e 3a (27,3%) mostrando um aumento de 10% na frequência do genótipo 1, queda de 7,7% no genótipo 3 e ausência de outros genótipos. A análise estatística de associação entre os subtipos HIV e genótipos HCV (Goodman) mostrou que no genótipo 1 (HCV) ocorreu predominância do subtipo B, enquanto no genótipo 3 (HCV) a distribuição dos subtipos B e F (HIV-1) foi casual. Isto aponta para a necessidade de mais estudos desse grupo e um maior valor amostral.

Palavras-chave: Co-infecção HIV/HCV. Genótipos. Subtipos.

Abstract

HIV/HCV co-infection is a frequent event due to the similarity of the means of transmission of both viruses; 30-50% of HIV infected individuals are co-infected¹. This paper assesses the possible association among HCV and HIV genotypes in co-infected patients based on frequency distribution in mono and co-infected patients. To determine HIV and HCV genotype frequency 124 and 496 respectively, mono infected patients were analyzed. The study of co-infection was performed in 150 HIV positive patients and 22 (14.7%) patients were found. The frequency of HIV-1 subtypes was 106 B subtype (85.5%), 16 F (12.9%), and 2 B/F recombinant (1.6%); HCV genotypes were 1a (25%), 1b (29.4%), 1a/1b (3.6%), 3a (35%), 2 (1.8%) and 5 (0.4%). The HCV genotype could not be determined in 6.3% of samples using the technique. The HIV-1 subtype distribution standard was B subtype (85.0%) and F subtype (15.0%) in mono-infected as in co-infected. The frequency distribution of HCV genotypes in co-infected was 1a (36.4%), 1b (27.3%), 1a/1b (9.1%) and 3a (27.3%). These results showed a 10% increase in frequency of 1a genotype, 7.7% decrease in 3 genotype and lack of other genotypes. The statistical analysis of association of HCV genotypes and HIV-1 subtypes (Goodman Test) showed a predominance of the B HIV subtype among HCV genotype 1, and among HCV genotype 3 the distribution of B and F HIV subtypes was casual. These results suggest the need for further studies in this group and larger samples.

Keywords: Co-infection HIV/HCV. Genotype. Subtype.

Introdução

Devido à similaridade nas rotas de transmissão, a co-infecção HIV/HCV é relativamente freqüente, afetando 30 a 50% dos portadores de HIV¹.

O HIV, um retrovírus, e o HCV, um flavivírus, são ambos vírus de RNA, têm distribuição mundial, conduzem à infecção subclínica crônica², apresentam genomas altamente polimórficos como consequência de altos níveis de mutações³, e podem ser diagnosticados utilizando-se métodos sorológicos e moleculares⁴⁻⁶.

A co-infecção induz a um pior prognóstico de ambas as infecções, dificultando a resposta imunológica do hospedeiro. Neste contexto, a debilitação imunológica causada pelo HIV acaba conduzindo à evolução da infecção pelo HCV e rápido curso natural da infecção, reduzindo de aproximadamente 30 para sete anos o comprometimento hepático com aparecimento de cirrose e hepatocarcinoma, que constituem causa de morte em pacientes infectados com HIV^{7,8}.

Do mesmo modo, o HCV parece diminuir o tempo para o aparecimento de aids e morte, dificultando a reconstituição do sistema imunológico e elevando o risco de hepatotoxicidade. O comprometimento hepático decorrente da infecção pelo HCV é agravado pela utilização de drogas integrantes da Terapia Anti-retroviral de Alta Atividade (HAART)⁹, que são hepatotóxicas. O risco de hepatotoxicidade induzida por drogas em co-infectados é de três a quatro vezes superior aos mono-infectados, o que parece estar diretamente relacionado à severidade da doença hepática¹⁰.

Tanto o HCV como o HIV podem ser subdivididos em diferentes genótipos e subtipos, que apresentam diferentes níveis de divergência das seqüências originais do vírus, dependendo da região genômica estudada, resultantes de erros durante a replicação viral causadas pela ausência de atividade de reparo da enzima RNA polimerase¹¹⁻¹³.

O efeito dos diferentes genótipos do HCV na co-infecção é controverso. Alguns autores afirmam que a infecção por determinados ou múltiplos genótipos do HCV constitui um obstáculo ao tratamento pela HAART^{14,15}, enquanto outros referem não existir nenhuma influência dos genótipos do HCV na progressão da doença^{16,17}.

O presente estudo visou avaliar uma possível associação entre os subtipos do HIV e genótipos do HCV em pacientes co-infectados, com base na análise das frequências em pacientes mono e co-infectados.

Material e Métodos

Critérios de inclusão

Para determinação da frequência dos genótipos HIV e HCV foram analisados respectivamente 124 e 496 pacientes mono-infectados, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, de maneira aleatória, acompanhados rotineiramente nos ambulatórios: 1) Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e 2) Hepato-Hemocentro, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

O estudo da co-infecção foi realizado num grupo de 150 pacientes HIV positivos de Botucatu e região, escolhidos também de maneira aleatória, dos mesmos ambulatórios.

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Metodologia

O RNA viral do HCV foi detectado pela metodologia RT-PCR, utilizando-se Kit diagnóstico *Amplicor* da Roche®, seguindo as especificações do fabricante.

A genotipagem do HCV foi realizada analisando-se a região ultraconservada 5' UTR com o Kit *LiPA (Line Probe Assay – Versant HCV Genotype – Bayer™)*, segundo instruções do fabricante.

A subtipagem para o HIV-1 foi realizada pela metodologia de seqüenciamento automático de DNA *in house* abaixo descrita.

Extração de DNA: Kit *QIAmp DNA Blood (Quiagen)* segundo as especificações do fabricante.

A amplificação foi realizada por *Nested PCR* da região C2 da gp120 do envelope viral. A primeira reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando uma mistura contendo 1X *Buffer*, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4mM dNTP, 0,2pmol dos *primers* ED5 (5' – ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG – 3'), e ED12 (5' – AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG – 3')¹⁸, 2,5U de *Taq Recombinant DNA polimerase* (Invitrogen) e 150-200ng de DNA, num volume total de reação de 50µL. A reação procedeu-se com uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C-45 segundos, 55°C-30 segundos, 72°C-30 segundos, e 1 ciclo para extensão final de 72°C por 7 minutos. A *Nested – PCR* foi realizada utilizando uma mistura de reação contendo 1X *Buffer*, 2,5mM de MgCl₂, 0,4mM dNTP, 0,2pmol dos *primers* ED31 (5' – CCTCAGCCATTACACAGGCTGTCCAAAG – 3'), e ED33 (5' – TTACAGTAAAAATCCCCTC – 3')¹⁸, 2,5U de *Taq Recombinant DNA polimerase* (Invitrogen) num volume total de reação de 50µL. Adicionou-se, a seguir, 5 µL do produto amplificado na primeira reação. A reação procedeu-se com uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C-45 segundos, 56°C-30 segundos, 72°C-30 segundos, e 1 ciclo para extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto da PCR foi purificado utilizando-se o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*, obedecendo as especificações do fabricante.

A reação de marcação fluorescente foi realizada em microplaca de 96 poços, utilizando o Kit *Big Dye* (kit *ABI Prisms™*), segundo especificações do fabricante. Foram realizadas duas reações para cada amostra, utilizando os *primers* ED31 e ED33. O produto da reação de marcação fluorescente foi precipitado e lavado utilizando-se uma solução de isopropanol a 65% seguida de etanol 60% gelado. O DNA foi desnaturado a 94°C por dois minutos e as amostras foram ressuspensas com uma solução de *Loading Buffer* e formamida e submetidas

a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 5% desnaturante conduzida no aparelho *ABI Prims™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)* para seqüenciamento.

A seqüência consenso foi submetida a análise de subtipagem utilizando-se a ferramenta *genotyping* disponível *on line* pelo *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/> formpage.cgi). A análise dos resultados obtidos foi realizada através de medidas descritivas (percentual) e teste estatístico de qui-quadrado (X^2)¹⁹. O estudo de associações entre os genótipos do HCV e subtipos do HIV-1 foi realizado utilizando-se o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais^{20,21}.

Resultados

A freqüência de co-infecção HIV/HCV no grupo de 150 pacientes analisados foi

de 14,7%.

A distribuição de freqüência dos genótipos e subtipos virais em pacientes mono e co-infectados pelo HIV / HCV está representada na Tabela 1.

Em virtude de limitações das técnicas empregadas não foi possível a determinação dos subtipos HIV em 18,6 % em mono-infectados e 9,1% dos co-infectados, o mesmo ocorrendo com o HCV, onde não foi possível a determinação dos subtipos em 6,3% dos mono-infectados.

O estudo de associações entre os genótipos do HCV e subtipos do HIV-1 esta resumido na Tabela 2.

Discussão

A co-infecção HIV/HCV nas amostras estudadas foi de 14,7%. Estimativas mundiais segundo alguns autores variam, entre 4% e 90% dependendo da via de transmissão²².

Tabela 1 - Distribuição dos genótipos e subtipos virais em pacientes mono e co-infectados por HIV -1/ HCV em Botucatu e região

Table 1- *Genotype and subtype virus distributions in patients mono and co-infected by HIV-1 / HCV in Botucatu and neighboring areas*

Tipos do HIV	Subtipos do HIV	Mono-Infectados	Co-Infectados
M	B	106 (85,5%)	17 (85,0%)
	F	16 (12,9%)	3 (15,0%)
	B/F	2 (1,6%)	0
	Total	124 (100%)	20 (100%)
Genótipos do HCV	Subtipos	Mono-Infectados	Co-Infectados
1	1a	124 (25%)	8 (36,3%)
	1b	146 (29,4%)	6 (27,3%)
	1a/1b	18 (3,6%)	2 (9,1%)
	não definido	24 (4,9%)	0
	Total	312 (62,9%)	16 (72,7%)
2	2a/2c	0	0
	2b	3 (0,6%)	0
	não definido	6 (1,2%)	0
Total	9 (1,8%)	0	
3	3a	173 (34,9%)	6 (27,3%)
	3b	0	0
	3c	0	0
	Total	173 (34,9%)	6 (27,3%)
5	5a	1 (0,2%)	0
	não definido	1 (0,2%)	0
	Total	2 (0,4%)	0
Total	Total	496 (100%)	22 (100%)

Tabela 2 - Associação entre os subtipos do HIV e genótipos do HCV em pacientes co-infectados HIV/HCV

Table 2 - Association between HIV subtype and HCV genotype in HIV/HCV co-infected patients

Genótipos HCV (Genotypes)(n=20)	Subtipos HIV-1(Subtypes)(n=20)		Total
	B (%)	F (%)	
1	13 (92,86) a B	1 (7,14) a A	14
3	4 (66,67) a A	2 (33,33) a A	6

Letras minúsculas representam comparações entre grupos (subtipos HIV-1 e genótipos HCV); letras maiúsculas representam comparações de respostas dentro de um mesmo grupo. A letra "B" indica predominância em relação a "A"

A subtipagem do HIV pôde ser concluída em 124 das 150 amostras analisadas, por limitação da técnica empregada. A ausência de amplificação pode ser explicada pela intensa taxa de mutação do HIV a cada ciclo replicativo, as quais não são corrigidas pela ausência de atividade de reparo. Muitas vezes, estas mutações têm lugar no sítio de anelamento dos *primers*, impossibilitando assim a amplificação por PCR. As seqüências de má qualidade ocorrem pela coexistência de populações virais, o que impossibilita seu seqüenciamento na ausência de outras abordagens técnicas capazes de isolar as diferentes cepas, como a clonagem.

A distribuição dos subtipos HIV em pacientes mono-infectados na região de Botucatu é semelhante aos relatados em outros trabalhos brasileiros, mostrando que o subtipo B ainda é o prevalente seguido pelo F²³⁻²⁵. Nos co-infectados o padrão de distribuição de subtipos do HIV-1 é semelhante aos mono-infectados, ou seja, predominância do subtipo B (85,0%), seguido do F (15,0%). A ausência de recombinantes B/F pode estar relacionada à sua baixa freqüência na população e/ou ao reduzido número de co-infectados encontrados neste estudo. A análise estatística aponta para uma tendência de aumento do subtipo F no grupo dos co-infectados.

A distribuição dos genótipos HCV em mono-infectados da região de Botucatu segue o mesmo padrão do Estado de São Paulo²⁶ e de outros estados brasileiros²⁷⁻²⁹, ou seja, uma maior freqüência do genótipo 1 seguido pelos 3 e 2, observando-se também

a presença dos genótipos 5^{26,27,30}. Comparando-se a freqüência dos genótipos HCV entre pacientes mono e co-infectados verificamos que nos co-infectados houve um aumento de 10% no genótipo 1, uma queda de 7,7% do genótipo 3 e ausência de outros genótipos. Outros autores encontraram em co-infectados HIV/HCV uma freqüência entre 40-55% do genótipo 1, 0,4 -1,7% do genótipo 2, 20-30% do genótipo 3, 9-19% do genótipo 4^{15,16,31}. No entanto, a análise estatística pelo método de qui-quadrado (X^2) mostrou que o genótipo 2 sofreu maior influência das duas variáveis (mono-infecção e co-infecção)

O aumento na freqüência do genótipo 1 em co-infectados é motivo de preocupação, pois o tempo de tratamento preconizado para este genótipo é mais prolongado (12 meses) apresentando também uma pior resposta terapêutica⁵.

Quando se considera a freqüência dos subtipos do HCV em co-infectados, os achados atuais são contraditórios. Alguns autores¹⁵ encontraram uma freqüência para o subtipo 1a (36,3%) semelhante à obtida neste estudo enquanto outros autores vêm descrevendo freqüências inferiores para os subtipos 1a (24,1%), 1b (11,2%), 1a/1b (6,9%)¹⁶.

O estudo de associação entre parâmetros constantes de Goodman não mostrou diferenças significativas entre os genótipos do HCV, pois numa comparação entre os grupos todas as categorias refletem uma situação de igualdade. Por outro lado, o comportamento dos subtipos do HIV-1 não foi semelhante, ou seja, no genótipo 1 (HCV) ocorreu predominância do subtipo B (HIV-1) e no

genótipo 3 (HCV) a distribuição dos subtipos B e F do HIV-1 foi casual; no entanto, o tamanho da amostra limita de certa forma as con-

clusões relativas às associações entre subtipos do HIV e genótipos do HCV, o que justifica novas investigações a esse respeito.

Referências

1. Babik JM and Holodny M. Impact of highly active antiretroviral therapy and immunologic status on hepatitis C virus quasispecies diversity in human immunodeficiency virus/ hepatitis C virus-coinfected patients. *J Virol* 2003; 77(3): 1940-50
2. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351: 351-5.
3. Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, et al. Basic concepts in RNA viruses evolution. *FASEB J* 1996; 10: 859-64.
4. Nadler J. AIDS: etiologia. In: Veronesi R, Foccacia SR, ed. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 83-6.
5. Secretaria de Estado da Saúde. Manual de vigilância epidemiológica. *Hepatites virais: normas e instruções*. São Paulo; 2000.
6. Silva MD. Hepatite C e testes diagnósticos. *Cad Farmácia* 2001; 17(2): 111-5.
7. Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4): 577-9.
8. Rosado R R, Olmeda M P, Samaniego J G, Soriano V. Management of hepatitis C virus in HIV-infected persons. *Ant Res* 2001; 52: 189-98.
9. Pockros PJ. *HCV in setting of HIV Co-infection*. *Med Writers' Circle*. [cited 2003]. Disponível em: <http://www.hcvadvocate.org/hcsp/articles/Pockros-3.html>. Acessado em 06 de setembro de 2005.
10. Vento S, Garofano T, Renzini C, et al. Enhancement of hepatitis C virus replication and liver damage in HIV coinfected patients on antiretroviral combination therapy. *AIDS* 1998; 12: 116-7.
11. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, Mcneely PD, Modrow S, Wolf H, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAC, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986; 45: 637-48.
12. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL et al. The origin of Hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1977; 78: 321-8.
13. Okamoto H, Kurai K, Okada S-I, Yamamoto K, Iizuka H, Tanaka T, et al. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331-41.
14. Asten L van & Prins M. Infection with concurrent multiple hepatic C virus genotype is associated with faster HIV disease progression. *AIDS* 2004; 18: 2319-24.
15. Ramos PC, Pascual CA, Arazo GP, Aguirre EJM, Lassierra P. Clinical implications of hepatitis C virus genotype in human immunodeficiency virus infected patients with chronic liver disease. *Rev Clin Esp* 1998; 198(4) :212-6.
16. Piroth L, Bourgeois C, Dantin S, Waldner A, Grappin M, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype does not appear to be a significant prognostic factor in HIV-HCV-coinfected patients. *Lippincott W&W Inc* 1999; 13(4): 523.
17. Neau D, Jouvencel C, Legrand E, Trimoulet P, Galperin T, Chitty I, et al. Hepatitis C Virus Genetic Variability in 52 Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. *J M Virol* 2003; 71: 41-8.
18. Mullins JI. HIV-1 HMA Subtyping Kit. [cited 2004 Mar]. Disponível em <http://ubik.microbiol.washington.edu/HMA/html/primers.html>. Acessado em 21 de janeiro de 2005.
19. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics - the pare essentials*. Saint Louis ed Mosby ear book 1994. p. 260.
20. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat* 1964; 35: 716-25.
21. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 1965; 7: 247-54.
22. Mendes-Corrêa MCJ & Barone A. Hepatite C in patients co-infected with human immunodeficiency. A review and experience of a Brazilian ambulatory. *Rev Inst Med Trop* 2005; 47(2).
23. Galvão-Castro B, Couto-Fernandez JC, Mello MA, Linhares-de-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bongertz V, et al. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 335-8.
24. Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ. HIV-1 Subtypes Among Blood Donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 60-6.
25. Vicente ACP, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, et al., The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J AIDS* 2000; 23: 327-31.
26. 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*. Simpósio de Hepatite C e virus relacionados 2005: Montreal, Canadá.

27. Bassit L, Ribeiro dos Santos G, Da 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: 994-5.
28. 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.
29. 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.
30. 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(1): 156.
31. Rubio M, Rubio C, Nogués A, Manonelles A. Genotipos del virus de la hepatitis C. Estudio de 302 pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin* 2001; 116: 650-1.

Recebido em: 23/04/07

Versão final rerepresentada em: 30/08/07

Aprovado em: 24/09/07