



Artigo/Article

Hibridização reversa e sequenciamento na genotipagem do vírus da hepatite C

Reverse hybridization and sequencing for genotyping the hepatitis C virus

Patrícia Martinez Levada¹, Camila Fernanda Verdichio de Moraes², Silvia Maria Corvino¹, Rejane Maria Tommasini Grotto^{1,2}, Giovanni Faria Silva² e Maria Inês de Moura Campos Pardini^{1,2}

RESUMO

Introdução: Os métodos de genotipagem do vírus da hepatite C têm sido muito discutidos. O objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias de hibridização reversa e sequenciamento direto para a genotipagem do vírus da hepatite C. **Métodos:** Noventa e uma amostras de plasma de pacientes assistidos na Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista foram utilizadas. A genotipagem por hibridização reversa foi realizada utilizando o kit comercial *INNO-LiPA*® v.1.0. O sequenciamento direto foi efetuado em sequenciador automático utilizando protocolos *in house*. **Resultados:** A genotipagem por sequenciamento direto mostrou-se eficiente na resolução dos resultados inconclusivos pelo kit comercial. O kit mostrou resultados errôneos em relação à subtipagem viral. Além disso, a genotipagem por sequenciamento direto revelou um erro do kit com relação à determinação genotípica questionando a eficiência do método também para a identificação do genótipo viral. **Conclusões:** A genotipagem realizada por meio de sequenciamento direto permite uma maior acurácia na classificação viral quando comparada à hibridização reversa

Palavras-chaves: Vírus da hepatite C. Genotipagem. Hibridização reversa. Sequenciamento direto.

ABSTRACT

Introduction: The methods for genotyping the hepatitis C virus have been much discussed. The aim of this study was to compare the methodologies of reverse hybridization and direct sequencing for genotyping the hepatitis C virus. **Methods:** Ninety-one plasma samples from patients attended at the Botucatu Medical School, São Paulo State University, were used. Genotyping by reverse hybridization was performed using the *INNO-LiPA*® v.1.0 commercial kit. Direct sequencing was performed in an automated sequencer using in-house protocols. **Results:** Genotyping by direct sequencing was shown to be efficient for resolving cases that had remained inconclusive after using the commercial kit. The kit showed erroneous results in relation to virus subtyping. Moreover, direct sequencing revealed an error of the kit regarding the genotypic determination, thereby raising doubts about the efficiency of reverse hybridization for identifying the virus genotype. **Conclusions:** Genotyping by direct sequencing allowed greater accuracy of virus classification than did reverse hybridization.

Key-words: Hepatitis C virus. Genotyping. Reverse hybridization. Direct sequencing.

1. Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
2. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

Endereço para correspondência: Dra. Maria Inês M.C. Pardini. Divisão Hemocentro/FMB/UNESP. Distrito Rubião Júnior s/n, 18618-970 Botucatu, SP.
Tel: 55 14 3811-6041 ramal 220; Fax: 55 14 3811-6041 ramal 205
e-mail: inespardini@gmail.com

Recebido para publicação em 16/07/2009
Aceito em 19/01/2010

INTRODUÇÃO

O padrão ouro na determinação dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C (VHC) é a análise da sequência genômica viral completa. No entanto, devido a maior praticidade e rapidez, outros procedimentos são normalmente adotados na rotina laboratorial¹. A genotipagem do VHC pode examinar várias regiões do genoma. A região mais usada pelos testes comerciais de genotipagem é a 5'UTR devido à facilidade de amplificação com iniciadores universais. Entretanto, alguns autores^{1,2} têm questionado a eficiência desta região quanto à genotipagem e, principalmente, quanto à subtipagem viral. A genotipagem por hibridização reversa, distribuída sob o nome comercial de *Line Probe Assay (INNO-LiPA*®) (*Siemens Medical Solutions Diagnostics*), é muito utilizada em vários países. Este teste utiliza sondas específicas para diferentes partes do genoma viral imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose^{2,3}. Existem atualmente duas versões do *LiPA* (1.0 e 2.0). A primeira versão contém sondas para a região 5'UTR do genoma viral e a última, além destas, inclui sondas para a região genômica *core* do VHC³.

Os métodos de genotipagem, assim como a região do genoma viral a ser utilizada, constituem temas de discussão na comunidade científica ressaltando a importância de trabalhos que avaliem comparativamente as metodologias em uso para a determinação dos genótipos e subtipos do vírus C. O presente trabalho teve por objetivo comparar as metodologias de hibridização reversa (kit *INNO-LiPA*® v.1.0) e sequenciamento direto das regiões 5'UTR, *NSSB* e *core* do genoma do VHC como ferramentas para a determinação dos genótipos e subtipos virais.

MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizadas 91 amostras de plasma de pacientes atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A genotipagem por hibridização

reversa foi realizada com o kit *INNO-LiPA*® v.1.0 (*Siemens Medical Solutions Diagnostics*). A genotipagem por sequenciamento direto foi efetuada segundo protocolos *in house*. A extração do RNA viral foi realizada a partir do plasma utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen*) segundo as especificações. Em seguida, realizou-se uma etapa de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity* (*Applied Biosystem*) segundo recomendações. Para todas as amostras de cDNA obtidas foram realizadas amplificações por *Nested-PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) das regiões 5'UTR e NSSB. Nos casos em que ocorreram falhas de amplificação para a região NSSB foi feita a PCR do fragmento 5'UTR-core. As reações de amplificação da região 5'UTR foram realizadas utilizando os primers PTC1, NCR2, PTC3 e NCR4 segundo protocolos descritos na literatura⁴. Foram utilizadas duas estratégias de amplificação da região NSSB. Na primeira estratégia, os primers 242 e 243 já descritos anteriormente⁵ foram utilizados. Na segunda estratégia de amplificação, foram utilizados os primers PR3 e PR4 segundo protocolo previamente descrito¹. A segunda reação de PCR de ambas as estratégias foi realizada com os primers PR3 e PR5 segundo metodologia já descrita¹. A amplificação da região 5'UTR-core foi realizada utilizando os primers Q1, AQ1, Q2 e AQ2 segundo condições detalhadas anteriormente⁶. A reação de marcação fluorescente foi efetuada utilizando o kit *ABI PrismTM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing v3.1* (*Applied Biosystems*) e a eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante a 6% em aparelho automático *ABI 377* (*Applied Biosystems*) segundo recomendações do fabricante. A qualidade dos cromatogramas foi avaliada com o software *Phred*⁷ utilizando como critério de validação o escore de 20. As sequências de boa qualidade foram posteriormente analisadas, por meio do software *BioEdit*⁸ com a finalidade de construir sequências consenso. As sequências consenso resultantes foram então genotipadas pelo *HCV-Blast* disponível no banco de dados *The Los Alamos HCV Sequence* (<http://hcv.lanl.gov>)⁹.

Ética

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP (Ofício nº166/08 – CEP) em 05 de maio de 2008.

RESULTADOS

Os resultados da genotipagem pelo kit comercial e por sequenciamento direto das três regiões genômicas do VHC encontram-se detalhados na **Tabela 1**. Algumas amostras não puderam ser genotipadas por sequenciamento direto devido a falhas na etapa de amplificação. Noventa e uma amostras foram amplificadas para a região 5'UTR e 62 para NSSB. A região 5'UTR-core mostrou-se eficiente na amplificação de 28 das amostras que falharam para NSSB.

DISCUSSÃO

Os resultados inconclusivos pelo *INNO-LiPA*® puderam ser solucionados em 100% dos casos pela metodologia de sequenciamento direto. Todas estas amostras tiveram seus genótipos determinados pelo sequenciamento da região 5'UTR. Cinco delas também puderam ser genotipadas pelo sequenciamento de uma segunda região do genoma viral (NSSB ou 5'UTR-core) confirmando os resultados obtidos com o sequenciamento da região 5'UTR com relação à determinação genotípica. Com relação à subtipagem,

entretanto, uma amostra subtipada como 1a/1b pela região 5'UTR foi determinada como 1b pelo sequenciamento da região 5'UTR-core, discrepância que será abordada mais adiante neste trabalho. Foi proposto que a eficiência da hibridização reversa seria limitada nos casos de amostras com grande número de variantes virais, pois haveria necessidade de condições muito elevadas de estríngência¹⁰. No presente estudo, três das amostras referidas acima exibiram sobreposição de picos em algumas posições da sequência de nucleotídeos da região 5'UTR (**Figura 1**), o que provavelmente significa a presença de variantes virais.

Para avaliar possibilidade de mistura dos subtipos 1a e 1b determinada pelo *INNO-LiPA*®, em dez amostras, verificou-se a eficiência da posição 243 de 5'UTR. Segundo Stuyver et al¹¹, uma adenina (A) nesta posição seria característica do subtipo 1a enquanto que a presença de uma guanina (G) determinaria o subtipo 1b. Foram utilizadas, em paralelo, as genotipagens por uma segunda região. Uma das dez amostras apresentou sobreposição dos picos de A e G na posição 243 de 5'UTR (**Figura 2**), o que caracterizaria uma mistura 1a/1b. Nenhuma destas amostras pôde ser amplificada para a região NSSB, utilizando-se, portanto, a genotipagem por sequenciamento da região 5'UTR-core. A subtipagem pela região 5'UTR-core confirmou os resultados da análise de 5'UTR para sete amostras divergindo em relação a duas amostras subtipadas como 1b por 5'UTR que foram subtipadas como 1a por 5'UTR-core e uma amostra subtipada como 1a/1b, caracterizada como 1a por 5'UTR-core. Além das amostras já referidas uma terceira amostra genotipada apenas como 1 pelo kit comercial exibiu sobreposição dos picos de A e G na posição 243 da região 5'UTR. A análise da região 5'UTR-core para esta amostra resultou no subtipo 1a. Além das discrepâncias já relatadas até o momento, cinco amostras genotipadas como 1b pelo sequenciamento da região NSSB apresentaram uma A na posição 243 de 5'UTR e seis amostras subtipadas como 1a por meio das regiões NSSB ou 5'UTR-core apresentaram uma G na posição 243 de 5'UTR. Tais discrepâncias mostram que a posição 243 de 5'UTR não foi eficaz como critério para a discriminação entre os subtipos 1a e 1b.

Houve total concordância entre a genotipagem por sequenciamento direto das amostras genotipadas como 3a pelo *INNO-LiPA*® v.1. Para as amostras classificadas como 2 pelo kit comercial, a genotipagem realizada por sequenciamento direto da região 5'UTR não foi totalmente conclusiva entre os subtipos 2a e 2c já que as sequências da região 5'UTR são idênticas para ambos os subtipos¹². A genotipagem realizada por sequenciamento direto da região NSSB pôde subtipar conclusivamente as amostras como 2c.

Um dos pacientes componentes deste estudo revelou estar infectado pelo genótipo 5 do VHC segundo a genotipagem pelo kit comercial *INNO-LiPA*®. O isolado viral obtido da amostra de plasma deste paciente foi genotipado como 1b por sequenciamento direto das regiões 5'UTR e 5'UTR-core. Todos os testes foram realizados novamente e os resultados discrepantes foram confirmados. Tais resultados são importantes não apenas pela questão epidemiológica, mas principalmente pela definição da conduta terapêutica. É importante salientar ainda que as três sondas adicionais para a região core do genoma viral incluídas na versão 2.0 do kit comercial *INNO-LiPA*® não solucionariam o problema aqui destacado já que apenas permitem uma maior precisão na determinação do genótipo 6 e melhor distinção entre os subtipos 1a e 1b.

TABELA 1 - Genótipos e subtipos determinados pelas metodologias de hibridização reversa (LiPA) e sequenciamento direto das regiões 5'UTR, NSSB e 5'UTR-core sendo n° = número ou nome da amostra e inc = inconclusivo.

Genótipo VHC sequenciamento					Genótipo VHC sequenciamento					Genótipo VHC sequenciamento				
n°	SUTR	NSSB	core	LiPA	n°	SUTR	NSSB	core	LiPA	n°	SUTR	NSSB	core	LiPA
3	1b	1a		1a	113	3a		3a	3a	231	1b	1a		1a
4	1a	1a		1a	120	1a	1b		1a	232	3a	3a		3a
6	1b		1a	1a/1b	121	1b	1b		1b	237	1b	1b		1b
10	1a	1a		1b	124	1b	1b		1b	238	1b	1b		1b
14	1b	1a		1a	127	2a/2c	2c		2	239	1a		1a	1
15	1b	1b		1b	133	1a		1a	1	257	1b	1b		1b
18	1a	1a		1a	136	3a	3a		3a	263	1a		1a	1a/1b
23	1a	1a		1a	138	1b	1b		1b	275	3a	3a	3a	3a
24	1b		1b	1b	140	2a/2c	2c		2	278	3a			inc
27	1b	1b		1b	145	1a	1a		1a	281	1b		1b	1a/1b
29	1a		1a	1a/1b	152	1a	1a		1a	284	1a		1a	1a/1b
33	1b	1b		1a	157	1b	1b		1b	285	1a/1b		1a	1a/1b
34	3a		3a	3a	163	1b		1a	1a/1b	288	1a		1a	1
36	1b	1b		1b	165	3a	3a		3a	297	1b	1b		1b
38	1a	1b		1a	167	1b	1b		1b	303	1b	1b		1b
43	1b	1b		1b	168	1b	1b		1b	305	1a			inc
46	1b	1a		1a	172	1b	1b		1b	320	3a	3a		3a
47	1b	1b		1b	173	3a	3a		3a	325	1a	1a		1a
48	1a		1a	1a/1b	176	1b	1a		1b	326	1b	1b		1b
62	1a/1b		1b	inc	190	3a	3a		3a	344	3a	3a		3a
64	1b	1b		1b	193	1b	1b		1b	352	1a	1b		1a
70	3a	3a		3a	201	3a	3a		3a	356	1a		1a	1
75	1b		1b	5	202	3a	3a		3a	367	1a		1a	1
78	2b	2b		inc	203	1b	1a		1b	390	1a/1b		1a	1
88	1b	1b		1b	206	1a	1b		1a	398	1a		1a	1a/1b
91	3a		3a	inc	209	1a	1b		1a	1A	1b	1a		1b
96	1a	1a		1a	210	3a	3a		3a	1N	1a	1a		1
97	1a		1a	1a/1b	214	1b		1b	1b	1P	1b	1b		1b
103	3a		3a	3a	216	3a		3a	3a					
105	1b		1b	inc	217	1b	1b		1a					
107	1b	1b		1b	220	1b	1b		1b					

VHC: vírus da hepatite C, genótipos do VHC: 1: a, b, a/b; 2: b; 3: a; 5.

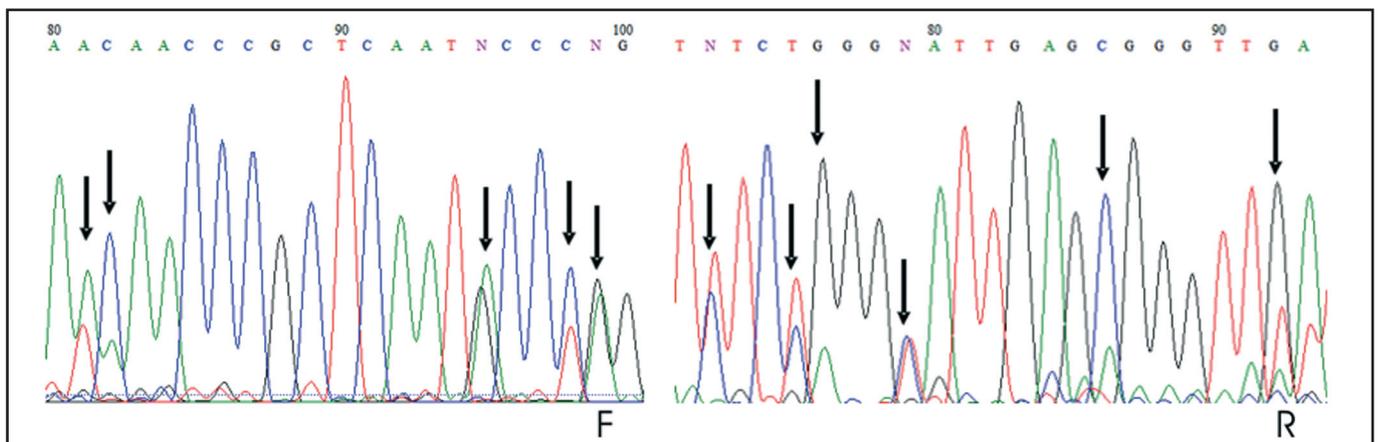


FIGURA 1 - Cromatogramas das seqüências da região genômica 5'UTR do VHC obtidos de amostra com resultado inconclusivo pela genotipagem com o kit INNO-LiPA® v.1.0. F: seqüência obtida com o primer forward; R: seqüência obtida com o primer reverse. As seqüências exibem sobreposições de picos em algumas posições (indicadas pela setas).

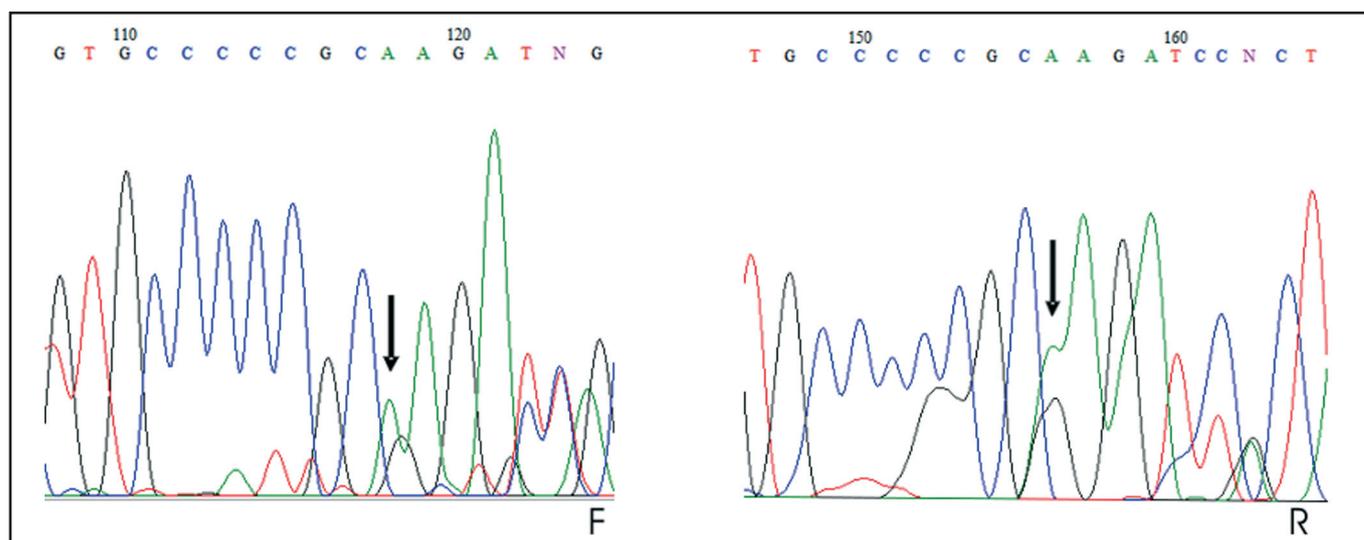


FIGURA 2 - Cromatogramas de seqüências exibindo sobreposições de picos de adenina (verde) e guanina (preto) na posição 243 da região 5'UTR do genoma do VHC (posição indicada pela seta) de uma amostra previamente classificada como 1a/1b pela genotipagem com kit comercial INNO-LiPA® v.1.0. F: seqüência obtida com o primer forward; R: seqüência obtida com o primer reverse.

Por meio da análise dos resultados, obtidos neste trabalho, concluiu-se que: a inclusão de uma região genômica viral com maior diversidade genética, adicional à 5'UTR, garantiu uma maior precisão na determinação dos genótipos e subtipos virais; a região 5'UTR-core, utilizada no caso de falha de amplificação da região NSSB, mostrou eficiência na determinação dos genótipos e subtipos virais; o sequenciamento direto foi eficaz na solução dos casos de resultados inconclusivos pela hibridização reversa realizada com o kit; o kit comercial INNO-LiPA® v.1.0 produziu resultados errôneos com relação à subtipagem do VHC; a genotipagem por sequenciamento direto revelou ainda um erro do kit com relação à determinação genotípica, influenciando a conduta terapêutica e questionando a eficiência do método comercial também quanto à identificação dos tipos virais.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUPOORTE FINANCEIRO

Rede Estadual de Hepatites Virais, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), DOCT Confeções.

REFERÊNCIAS

- Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of NSSb region. *J Virol Methods* 2003;109:187-193.
- Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi G. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol* 2001;63:17-21.
- Cavalheiro NP. Hepatitis C: genotyping. *Braz J Infect Dis* 2007;11:25-27.
- Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JA, Contreras M, Aloysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in

blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990;335:1419-1422.

- Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:1021-1025.
- Verma V, Chakravarti A. Comparison of 5' noncoding-core with noncoding regions of HCV by RT-PCR: Importance and clinical implications. *Curr Microbiol* 2008;57: 206-211.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res* 1998;8:175-185.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41: 95-98.
- Kuiken C, Yusim K, Boykin, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 2005;21:379-384.
- Stuyver L, Van Arnhem W, Wyseur A, Hernandez F, Delaporte E, Maertens G. Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10134-10138.
- Stuyver L, Rossau A, Wyseur M, Duhamel B, Vanderborgh H, Van Heuverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74:1093-1102.
- Le Pogam S, Dubois F, Christen R, Raby C, Cavicchini A, Goudeau A. Comparison of DNA enzyme immunoassay and line probe assays (Inno-LiPA I and II) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1461-1463.