

Biochimica molecolare nella diagnostica delle epatiti

G. Raimondo, G. Amaddeo, C. Trimarchi

Unità di Epatologia Clinica e Biomolecolare, Dipartimento di Medicina Interna,
Policlinico Universitario di Messina

Riassunto

I virus epatitici rappresentano i principali agenti responsabili di malattia del fegato e pertanto sono fattori di rischio per lo sviluppo di cirrosi epatica ed epatocarcinoma. Per prevenire l'insorgenza di tali complicanze si avverte la necessità di una diagnosi rapida e certa delle infezioni virali onde poter aggredire rapidamente l'agente infettivo e intraprendere trattamenti farmacologici mirati. Per tale motivo, le metodiche diagnostiche attuali sono sempre più affidabili e più sensibili avvalendosi di tecniche di biologia molecolare ormai standardizzate e riproducibili su grande scala, che consentono di rilevare, amplificare, analizzare, e clonare gli acidi nucleici virali.

Summary

Molecular biology techniques in the hepatitis diagnosis

Hepatitis viruses are the most important etiological agents of liver disease worldwide and, consequently, are the main responsible for development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A prompt and accurate diagnosis of viral infection is necessary to start a specific pharmacological treatment in order to prevent the liver diseases progression. Therefore, the current diagnostic methods - based on molecular biology techniques - are highly sensitive, standardized and reproducible on large scale allowing to detect, amplify, analyse and clone the viral nucleic acids.

Le infezioni da virus dell'epatite B (HBV) e da virus dell'epatite C (HCV) sono responsabili della gran parte delle malattie epatiche nel mondo.

Si stima che oltre 2 miliardi di persone sono state infettate dall'HBV e che oltre 350 milioni di loro sono portatori cronici.

Il virus dell'Epatite B è un virus epatotropo appartiene alla famiglia degli Hepadnavirus il cui genoma è costituito da un DNA circolare a doppio filamento incompleto che contiene quattro cornici di lettura parzialmente sovrapposte: il gene S che codifica per le proteine dell'envelope; il gene Core che codifica per l'omonima proteina e per la proteina "e"; il gene P che codifica per una proteina con molteplici funzioni tra cui l'attività di trascrittasi inversa e di DNA polimerasi virale ed infine il gene X che codifica per la "proteina X" implicata nella replicazione virale e con proprietà

di transattivazione genica. Una volta che il virus è penetrato all'interno dell'epatocita, il DNA dell'HBV viene convertito in una molecola a doppio filamento completo, chiusa con legame covalente in una struttura circolare superavvolta (cccDNA) che può persistere per tutta la vita e rappresenta pertanto una continua riserva di virioni.

L'infezione da HBV può mostrare diversi patterns dal punto di vista dei marcatori virali sierici, immunologici e virologici. Si possono infatti distinguere le seguenti condizioni: la prima in cui i pazienti presentano l'antigene S circolante e l'antigene e (HBsAg/HBeAg positivi) e una attiva replicazione virale (generalmente $> 10^5$ copie/mL); la seconda condizione in cui i pazienti presentano sempre l'antigene S circolante ma sono negativi per l'antigene e (anti-HBe positivi) e sono caratterizzati dall'aver per lo più una bassa viremia ri-

spetto agli individui *e* positivi o presentare valori testimoniati una temporanea o costante soppressione della replicazione virale (<10³ copie/mL).

L'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare atte a svelare e quantificare il DNA virale varia a seconda delle condizioni cliniche sopra elencate. Vi è comunque da sottolineare che gli elevati livelli di viremia (>10⁵ copie/mL) sono riscontrati generalmente in corso di malattia conclamata di fegato; diversamente accade nelle condizioni in cui la viremia è al limite inferiore della sensibilità delle tecniche di biologia molecolare in cui non sempre vi è associazione con il danno epatico.

La determinazione quantitativa dell'HBV-DNA è quindi importante per stadiare e caratterizzare la malattia epatica ed è fondamentale nel monitoraggio della terapia con antivirali specifici per evidenziare il livello di soppressione della replicazione e le eventuali riattivazioni virali.

Le tecniche di biologia molecolare utilizzate per mettere in evidenza il DNA virale sono essenzialmente di due tipi. Il primo, ormai superato per la scarsa sensibilità, utilizza le metodiche di ibridizzazione molecolare diretta su siero, quali la *dot blot* e ibridizzazione su piastra, che consentono di svelare le grandi quantità dell'HBV-DNA a partire da concentrazioni superiori a 50.000 copie/mL. Le tecniche del secondo tipo sono quelle più sensibili quali l'amplificazione del segnale di ibridizzazione come il *Branched DNA* (Chiron) o l'*Hybrid Capture II System*, o ancora più sensibili cioè quelle che utilizzano l'amplificazione del DNA mediante una reazione polimerasica a catena (PCR). I *cut-off* delle tecniche di amplificazione in PCR (Roche Molecular System), dell'amplificazione del segnale di ibridizzazione e di amplificazione in PCR tramite *real time* sono rispettivamente crescenti in termini di sensibilità sino a raggiungere le 12 unità per mL nell'ultima¹⁻³.

L'infezione occulta da virus B (HBV) può essere definita come la persistenza a lungo termine dei genomi virali all'interno del tessuto epatico (ed in alcuni casi anche nel siero) di individui negativi per l'antigene di superficie dell' HBV (HBsAg). Questa peculiare forma di infezione virale cronica, la cui esistenza è stata sospettata sin dagli inizi degli anni ottanta, è stata ben identificata durante gli ultimi dieci anni, quando la disponibilità di tecniche di biologia molecolare più sensibili ha reso possibile la migliore definizione di alcuni dei suoi aspetti virologici, la dimostrazione della sua diffusione ubiquitaria ed il suo possibile ruolo in vari ambiti clinici.

L'analisi di estratti di DNA epatico è il più corretto approccio metodologico per l'individuazione dell'HBV occulto, ma la maggioranza dei dati ad oggi disponibili derivano da studi effettuati analizzando campioni di sangue. Test commerciali, standardizzati e validi per lo studio dell'infezione criptica non sono ancora disponibili. Ciò nonostante, attualmente, il *gold standard* per testare l'HBV occulto è ancora l'analisi di estratti del DNA dai campioni epatici così come dai campio-

ni di sangue effettuata mediante una tecnica di doppia amplificazione per PCR "*in house*" e l'uso di *primers oligonucleotidici* specifici per almeno tre differenti regioni genomiche dell'HBV. Con questo approccio, solo i casi nei quali l'HBV DNA è individuato usando almeno due differenti serie di *primers* possono essere considerati positivi per infezione occulta⁴.

Il virus dell'epatite B ha una elevata attività replicativa ed una alta frequenza di mutazioni dovuta alla mancanza dell'enzima atto a correggerle. Tali mutazioni portano all'accumulo in ciascun individuo infetto di molteplici varianti genetiche dette quasispecie virali che pertanto rappresentano delle varianti naturali. Forme varianti di HBV possono essere indotte dalla terapia antivirale specifica con analoghi nucleos(t)idici. Tutte le varianti di HBV possono essere rivelate con tecniche di biologia molecolare che ricoprono, dunque, un ruolo diagnostico fondamentale^{5,6}.

I test utilizzati per identificare le mutazioni includono:

- L'amplificazione mediante PCR e l'analisi successiva dei prodotti di amplificazione mediante sequenziamento diretto che consentendo la valutazione dell'intera regione genomica della RT (trascrittasi inversa) o di gran parte di essa (*Trugene kit*), permette l'identificazione sia delle mutazioni che conferiscono resistenza primaria ai farmaci che di quelle compensatorie. Tuttavia, esso rappresenta il metodo meno sensibile per l'individuazione di popolazioni mutanti eventualmente presenti in quantità minoritarie (<20% del *pool* di virus circolante).
- Amplificazione mediante PCR della regione genomica della RT con successivo clonaggio e analisi dei cloni mediante sequenziamento diretto. Tale procedimento consente di analizzare anche le forme minoritarie ma, per la complessità ed il costo delle procedure, non può essere proponibile in ambito diagnostico.
- L'analisi RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) permette di individuare una popolazione di mutanti che rappresenta il 5% della popolazione virale totale. In particolare, la metodica RFLP è un metodo adeguato per l'identificazione di mutazioni che risultano in un nuovo sito di restrizione. Specifiche endonucleasi di restrizione devono essere assegnate a ciascun mutante di interesse. Anche questa metodica è di difficile applicazione pratica ed inoltre non consente di individuare nuove, possibili mutazioni di interesse clinico.
- Il kit commerciale *Reverse Hybridization Assay LiPA DR* permette di individuare singoli *mismatches* nucleotidici. Può riscontrare la resistenza virale quando la popolazione mutante costituisce più del 5% di quella totale. La limitazione del test è la necessità di nuovi gruppi di sonde specifiche per ciascun mutante e per genotipizzare la variabilità esistente è richiesto un certo numero di sonde.
- Il sequenziamento con tecnologia basata su *microchip*

usando *microarray* può essere utilizzato per individuare “nuovi” mutanti, ma è di difficile realizzazione.

- MALDI TOF MS basata su analisi spettrometrica di piccoli frammenti di DNA contenenti siti di variazione. Questo test è molto sensibile e permette di identificare mutanti che costituiscono anche solo 1% della popolazione virale ma – ovviamente – è utilizzabile solo in ambito di ricerca.

Il virus dell'epatite C è l'agente eziologico di circa il 90% delle epatiti post trasfusionali precedentemente definite nonA-nonB. Stime recenti dell'OMS mostrano che il 3% della popolazione globale è stato infettato dall'HCV e vi sono 170-200 milioni di portatori cronici da HCV nel mondo, di cui 5 milioni in Europa (1-2% della popolazione) e 1,5 milioni in Italia.

Il virus dell'epatite C è un virus ad RNA e fa parte della famiglia dei *Flaviviridae*. Sono stati identificati sei diversi genotipi e oltre 90 sub-tipi. L'infezione acuta diventa cronica in una elevatissima percentuale dei casi, stimata fino all'85%. Il 20-30 % dei pazienti con epatite cronica C sviluppa nell'arco di 10-20 anni una cirrosi e l'epatocarcinoma può evolvere da una persistente cirrosi da HCV in circa l'1-4% dei pazienti per anno.

La diagnosi di infezione da HCV si basa sulla determinazione di anticorpi diretti contro antigeni virali e sulla ricerca dell'RNA genomico dell'HCV.

Le tecniche di biologia molecolare più utilizzate per la ricerca e successiva quantificazione dell'HCV-RNA sono basate su due metodiche di base: 1) l'amplificazione del substrato (PCR “classica” e PCR “real time”), 2) l'amplificazione del segnale (*Branched DNA assay*).

La determinazione dell'HCV quantitativo non è correlata alla gravità del danno epatico ma è di rilevante importanza nel monitoraggio della risposta alla terapia antivirale combinata.

Come molti virus ad RNA, l'HCV non dispone di un sistema efficiente di “correzione di bozze”, cioè di quel sistema che consente la riparazione degli errori genomici che avvengono durante i processi di replicazione dell'RNA virale. Da ciò originano con alta frequenza delle mutazioni genetiche che motivano l'ampia variabilità genomica dell'HCV. Tale variabilità si esplica sia nell'ambito del virus infettante il singolo individuo (quasispecie virali) che a livello di popolazione (genotipi e sottotipi). I genotipi vengono definiti sulla base di differenze nelle sequenze nucleotidiche dell'ordine del 30-35%. Sono pertanto sinora distinguibili 6 tipi maggiori (indicati da 1 a 6) nell'ambito dei quali è possibile operare ulteriori distinzioni in sottotipi. La variabilità genomica dell'HCV è estesa all'intero virus ed infatti sono presenti regioni più conservate (non codificanti come la 5'NC e strutturali quali il Core) e regioni con più alto grado di variabilità (E2, NS5). L'analisi di sequenza costituisce il *gold standard* per il riconoscimento del genotipo virale. Varie tecniche sono state tuttavia sviluppate per rendere più semplice e veloce la determinazione del genotipo. Le metodiche più utilizzate si basano sull'ibridizzazione con sonde geno-

tipo-specifiche, di cui sono disponibili formati commerciali come il *Line Probe Assay* (LiPA) che utilizza la regione 5'NC. Uno dei più importanti vantaggi di questo test è la possibilità di utilizzare direttamente l'amplificato ottenuto da una reazione di PCR sulla regione 5' NC. L'amplificato viene fatto ibridizzare con una serie di sonde, diverse tra di loro, e poste in posizioni differenti su uno *strip* di nitrocellulosa. Le diverse sonde riconoscono le variazioni tipiche dei singoli genotipi e sottotipi del virus, e quindi l'amplificato si legherà solo con quelle specifiche del genotipo presente. La rivelazione avviene con un metodo enzimatico e colorimetrico, e porta all'evidenziazione delle singole bande positive, da cui si può agevolmente risalire al genotipo presente. E' possibile inoltre effettuare la caratterizzazione genotipica con metodiche basate sull'amplificazione con *primers* tipo-specifici o dopo digestione con endonucleasi di restrizione e studio del poliformismo dei frammenti di restrizione (RFLP). Altra metodica utilizzata nell'analisi dei genotipi virali è quella dell'amplificazione mediante PCR e l'analisi successiva dei prodotti di amplificazione mediante sequenziamento diretto.

Bisogna comunque rilevare che i test commerciali attualmente disponibili per la diagnostica dell'infezione da HCV sono altamente sensibili e specifici, limitando a sole rare eccezioni la necessità di ricorrere a test “*in house*”^{1,7-9}.

Il virus dell'epatite delta (HDV) è il più piccolo virus ad RNA infettante l'uomo. Si tratta di un virus difettivo che necessita della presenza dell'HBV nella cellula epatica per infettarla. Pertanto, solo i pazienti già infetti dall'HBV possono essere infettati da questo virus. L'infezione può avvenire contemporaneamente a quella dell'HBV (coinfezione) o successivamente (superinfezione). La coinfezione provoca un'epatite acuta simile a quella da HBV. Se la carica virale è massima si potrà avere necrosi epatica fulminante o malattia cronica protratta. La superinfezione di un portatore cronico di HBV conduce ad un peggioramento della malattia con maggiori probabilità di evoluzione in cirrosi.

I marcatori dell'HDV vengono normalmente ricercati, ovviamente, solo nei soggetti positivi per l'HBsAg. Per una diagnosi specifica vengono determinati il genoma virale (HDV-RNA) e l'anticorpo prodotto dall'ospite (anti-HD). L'HDV-RNA è determinabile nella fase di infezione cronica se ricercato con metodiche di amplificazione (RT-PCR)¹.

Le infezioni da HBV e da HCV condividono le vie e le modalità di trasmissione, cosicché la loro coinfezione è evenienza abbastanza frequente, soprattutto nelle aree dove i due virus sono endemici e nei soggetti ad alto rischio di infezioni parenterali. Inoltre, i pazienti coinfezati sono certamente in numero superiore rispetto a quanto le indagini routinarie di laboratorio ci consentono di diagnosticare per la presenza della suddetta condizione di “infezione occulta da HBV” che ha la

sua maggiore prevalenza proprio nei soggetti con epatopatia cronica HCV-correlata.

La classica forma di doppia infezione cronica HBV/HCV – identificata dalla contemporanea positività per HBsAg e per gli anticorpi contro l'HCV (anti-HCV) – è presente in un numero non trascurabile di pazienti con epatite cronica ed è universalmente considerata una condizione favorente la progressione della fibrosi epatica e l'instaurarsi della cirrosi.

Una tappa fondamentale per una migliore caratterizzazione di questa importante categoria di pazienti è la definizione del comportamento virale nel corso di una coinfezione cronica. A questo proposito, l'attenzione di molti autori si è a lungo focalizzata sulla possibile interazione tra i due virus in caso di coinfezione. In particolare, studi *in vitro* indicano che l'HCV ha la capacità di sopprimere l'attività dell'HBV e che questo effetto inibitorio è essenzialmente mediato dalla proteina core dell'HCV. Un certo numero di studi *in vivo* sembra anche indicare una possibile reciproca interazione tra i due virus, in alcuni casi confermando un prevalente ruolo dell'HCV, mentre in altri suggerendo una mutua interferenza o addirittura una prevalente azione dell'HBV.

Per individuare sul piano clinico l'infezione virale produttiva principale responsabile del danno epatico deve essere effettuata una valutazione longitudinale del *pattern* virologico, ovvero dosaggi seriati nel tempo dell'HBV DNA quantitativo e dell'HCV RNA quantitativo mediante le tecniche di biologia molecolare precedentemente descritte. Si è dunque osservato che un ampio e complesso spettro di profili virologici può presentarsi in individui HBsAg/anti-HCV positivi: possono verificarsi infatti fasi alternanti di inibizione e ripresa di attività di uno o entrambi i virus, caratterizzate da variazioni nell'arco del tempo della quantità dei genomi circolanti dell'HBV e/o dell'HCV^{1,10}.

Bibliografia

1. Mangia A, Antonucci F, Brunetto M, Capobianchi M, Faggioli S, Guido M, et al., for the Italian Association for the Study of the Liver (A.I.S.F.). The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Dig Liver Dis* 2008 (in stampa).
2. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group. Antiviral Drug-Resistant HBV: Standardization of Nomenclature and Assays and Recommendations for Management. *Hepatology* 2007; 46: 254-65.
3. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46:160-70.
4. Raimondo G, Brunetto MR, Pontisso P, Smedile A, Maina AM, Saitta C, et al. Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B virus/ hepatitis C virus coinfecting patients. *Hepatology* 2006; 43:100-7.
5. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45:507-39.
6. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007; 45:1056-75.
7. Documento redatto dalla Commissione "Tecnologie Molecolari nella Diagnostica delle Epatopatie" dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato. Diagnostica molecolare nell'infezione da virus dell'epatite C: applicazioni nella Pratica Clinica. <http://www.webaisf.org/commconl.htm> (data di consultazione: 07.4.2008).
8. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130:231-64.
9. Locarnini S, Mason WS. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J Hepatol* 2006; 44:422-31.
10. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39:1147-71.