

LE TECNICHE MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI DA HCV E HBV

Paolo Ravanini

Lab. di Microbiologia – Az.Osp. “Maggiore” di Novara

Molti sono i virus che possono causare epatiti acute e croniche, suddivisi in virus epatotropi maggiori (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV), e in virus epatotropi minori.

Negli ultimi anni le indagini molecolari sono diventate sempre più importanti ed utilizzate per due tipi di infezione, quella da virus dell'epatite C e quella del virus dell'epatite B. Ci limiteremo quindi a trattare le diagnostiche molecolari che riguardano questi due tipi di infezione virale.

A) Infezione da HCV

La diagnostica di routine dell'infezione da HCV ha un limite fondamentale: quello di essere una diagnostica indiretta per la ricerca di anticorpi, e quindi non permette di distinguere con sicurezza lo stato di infezione cronica da quello di soggetto guarito spontaneamente.

Nel caso dell'epatite C la diagnostica molecolare diventa fondamentale per la diagnosi sicura di infezione in atto.

Questo è particolarmente importante nei casi indeterminati al test di conferma, cioè con una sola banda anticorpale positiva; oppure nei pazienti positivi per i test di screening anticorpali, ma con valori normali di transaminasi; oppure anche nei neonati nati da madre infetta; o in quei casi di epatite acuta ad eziologia sconosciuta, per escludere una possibile “fase finestra”.

Specialmente le prime due condizioni sono molto frequenti nella pratica clinica, e possono essere risolte da un punto di vista diagnostico solo con test di biologia molecolare.

La diagnostica molecolare per HCV è però importantissima anche nel monitoraggio della terapia con Interferone e Ribavirina.

In questo caso, alcuni test sono utilissimi prima della terapia, perché rappresentano un indice prognostico molto importante. Questi sono innanzitutto il genotipo virale e la viremia “basale”, cioè il dosaggio della viremia effettuato subito prima dell'inizio del trattamento.

Durante la terapia normalmente il paziente viene poi monitorizzato mediante la ricerca dell'HCV-RNA e della viremia, per mettere in evidenza la scomparsa o meno del virus circolante.

Dopo il termine della terapia, nel follow-up, si continua a ricercare l'HCV-RNA, per evidenziare le situazioni di relapse.

Queste indicazioni sono state ormai accettate a livello mondiale, dalle attuali linee guida internazionali per la diagnosi e il monitoraggio dell'infezione da HCV.

Tra gli indici prognostici più importanti troviamo senza dubbio il genotipo virale, perché si è ormai provata una stretta relazione tra i genotipi 1 e 4 e una bassa risposta alla terapia con Interferone, mentre i genotipi 2 e 3 presentano una risposta decisamente migliore alla terapia.

In Italia i genotipi più rappresentati sono nell'ordine l'1b, il 2c e il 3a.

Anche la viremia basale è però un ottimo indice prognostico. I pazienti con basse viremie iniziali rispondono decisamente meglio alla terapia rispetto a quelli con viremie iniziali più alte.

Tutte le indagini attualmente in commercio e largamente utilizzate dai laboratori per la ricerca dell'HCV-RNA, come anche per il genotipo e per il dosaggio della viremia, utilizzano come “target” di amplificazione la regione 5'UTR, cioè la regione non trascritta presente all'inizio del genoma di HCV. Questa è infatti la regione in assoluto più costante del genoma e quindi meno variabile.

Analizziamo ora nel dettaglio quali sono oggi le possibilità diagnostiche in Biologia Molecolare per l'infezione da HCV.

Sono chiaramente tutte indagini di tipo diretto.

Per la ricerca qualitativa di HCV-RNA circolante attualmente è possibile utilizzare due metodi molto diversi di analisi, con due tecnologie di amplificazione differenti: la classica Polymerase Chain Reaction, che attualmente è ancora la più utilizzata in Italia; e la nuova TMA, che è entrata più di recente nella pratica diagnostica clinica.

Per la quantificazione della viremia invece possiamo utilizzare metodi di PCR quantitativa; oppure metodiche di Branched-DNA.

Per la genotipizzazione, il metodo sicuramente più diffuso è il Line Probe Assay, o LiPA, sulla regione UTR 5' terminale. E' possibile genotipizzare però anche su altre regioni del genoma, anche se questo implica un allungamento dei

tempi dell'analisi. Da poco tempo è anche possibile sequenziare direttamente tutta la regione UTR 5' terminale per definire così il genotipo virale.

Un metodo non molecolare per la genotipizzazione è rappresentato dalla sierotipizzazione, cioè dalla differenziazione degli anticorpi prodotti dal soggetto nel caso di infezioni da diversi genotipi. Questo test però presenta alcuni limiti, in quanto non è preciso nella tipizzazione come gli altri metodi, e inoltre non indica automaticamente la situazione del genotipo presente realmente o prevalente in quel momento nel soggetto.

La PCR e la TMA sono entrambi metodi di "amplificazione del target", cioè di amplificazione diretta di una parte del genoma, con la sintesi di nuove molecole di acido nucleico, che si accumulano e che poi vengono rivelate da sonde genetiche specifiche per la sequenza ricercata.

La differenza principale tra i due metodi sta nel fatto che la TMA utilizza direttamente l'RNA virale e lo amplifica producendo grandi quantità di ampliconi di RNA; mentre la PCR utilizza DNA e produce ampliconi di DNA. Quindi, nel caso del virus dell'epatite C, che è un virus a RNA, la PCR deve essere preceduta da una fase di retrotrascrizione da RNA a DNA.

La metodica di Branched-DNA invece è completamente diversa e non è una tecnologia di amplificazione del target, bensì del segnale di ibridazione, mediante una serie di ibridazioni sandwich sulla base dell'RNA virale con sonde specifiche. Il segnale di ibridazione viene poi rivelato in chemiluminescenza.

1) Ricerca qualitativa di HCV-RNA

a) RT-PCR

Il metodo oggi più diffuso per la ricerca qualitativa di HCV-RNA è la RT-PCR, cioè una reazione di PCR, preceduta da una fase di Retrotrascrizione.

Le componenti per una reazione di PCR sono principalmente, oltre alla sequenza target da amplificare, i primers specifici, i nucleotidi, l'enzima per l'amplificazione, cioè la DNA polimerasi termostabile, e l'enzima per il primo passaggio di retrotrascrizione, cioè la Trascrittasi inversa.

Mediante i cicli termici avviene prima la denaturazione del DNA, poi l'annealing dei primers con il target e infine la sintesi della nuova molecola complementare di DNA mediante l'azione della Taq DNA polimerasi.

Ripetendo questi cicli termici molte volte è possibile ottenere un'amplificazione di tipo geometrico, a "raddoppio", fino a una quantità finale di circa 1 miliardo di copie della regione target dopo 30 cicli di reazione, partendo da una sola copia iniziale.

Il test disponibile in commercio prevede tre momenti della metodica.

La prima fase è rappresentata dall'estrazione dell'RNA virale dal campione biologico, mediante agenti lisanti e la precipitazione in alcool per la concentrazione degli acidi nucleici.

La seconda fase consiste nella retrotrascrizione in DNA e nell'amplificazione vera e propria, cioè nella reazione di P.C.R. Queste due reazioni sono condotte nella stessa fase grazie alla duplice attività dell'enzima rTth polimerasi, che svolge sia funzione di retrotrascrittasi che di DNA polimerasi.

Nel sistema viene anche aggiunto un altro enzima, la Uracil-N-Glicosilasi, che permette di prevenire parte del problema delle eventuali contaminazioni.

La terza fase è costituita dalla rivelazione del prodotto di amplificazione, mediante l'ibridazione con una sonda specifica interna e poi una rivelazione enzimatica colorimetrica.

Il principale vantaggio della PCR qualitativa è la sua altissima sensibilità, che non può essere raggiunta dai metodi quantitativi proprio per problemi interni al metodo. La sensibilità del test attuale in commercio è di circa 50 Unità Internazionali per mL di siero o plasma.

L'alta sensibilità del test fa sì che la PCR qualitativa sia il metodo di scelta per la diagnosi iniziale di infezione da HCV e per il monitoraggio della risposta terapeutica. Inoltre può essere utilizzata anche nelle prime fasi dell'infezione, e come screening nel caso delle trasfusioni di sangue. A questo riguardo, va però precisato che la pratica corrente di allestire "pools" di plasmi riduce notevolmente la sensibilità del metodo, con la possibilità di comparsa di alcuni falsi negativi.

b) TMA

La ricerca qualitativa dell'HCV-RNA può essere effettuata anche con un metodo di TMA, cioè di Transcription Mediated Amplification.

La TMA è una amplificazione isoterma (non sono quindi necessari cicli termici), e utilizza due enzimi: una Trascrittasi Inversa e una T7 RNA Polimerasi. Questo metodo amplifica direttamente l'RNA virale e produce un elevatissimo numero di ampliconi di RNA del target.

Dopo una cattura magnetica dell'RNA target mediante una sonda specifica, l'RNA viene retrotrascritto dalla RT e poi, grazie all'attività della T7 polimerasi, vengono prodotte numerose copie di RNA complementare, che a loro volta possono fare da stampo per altre retrotrascrizioni, rientrando nel ciclo amplificativo.

Uno dei vantaggi del metodo è proprio rappresentato dalla notevole velocità ed efficienza di amplificazione, che è di tipo esponenziale, ed è più elevata rispetto ad una classica PCR.

Gli ampliconi di RNA vengono poi rivelati mediante una ibridazione con una sonda specifica ed una reazione chemiluminescente.

Le caratteristiche del test di TMA per HCV sono innanzitutto la sensibilità elevatissima, persino maggiore rispetto alla PCR (fino a meno di 10 Unità Internazionali per mL); l'ottima specificità; la possibilità di amplificare bene tutti i genotipi; un rischio di contaminazione estremamente ridotto; e la possibilità di effettuare fino a 100 test in una unica seduta operativa, a differenza della PCR in commercio che permette l'esecuzione di non più di 20 test per seduta.

I due test che abbiamo considerato, cioè la RT-PCR e la TMA, sono entrambi provvisti di un Controllo Interno, che viene amplificato insieme al target, e che permette di evidenziare eventuali inibitori della reazione e quindi di determinare se il risultato è da considerare valido o meno.

2) Quantificazione della viremia di HCV-RNA

a) RT-PCR quantitativa

La PCR non è strutturalmente un metodo adatto alla quantizzazione, perché la quantità finale dell'amplificato non è proporzionale a quella iniziale, ma dipende dall'efficienza della singola reazione di amplificazione che può variare grandemente da campione a campione.

Questo fatto implica che non è possibile né utile allestire standard esterni per costruire una curva di calibrazione. Gli standard devono essere "interni" ad ogni campione, devono seguire tutte le fasi operative del test, e devono essere coamplificati con il target.

Da queste considerazioni deriva la minor sensibilità intrinseca della PCR quantitativa rispetto ad una PCR qualitativa, di circa 10 volte, perché non è possibile raggiungere la fase di plateau dell'amplificazione, dove non sarebbe più possibile confrontare tra di loro i risultati del target e dello standard.

Il metodo commercialmente in uso oggi è un metodo di PCR non competitiva.

In questo test viene aggiunto uno Standard Interno a concentrazione nota che ha la stessa sequenza del target nei siti di legame con i primers, mentre ha una sequenza interna differente. Il target e lo standard vengono coamplificati nello stesso tubo di reazione, e quindi con la stessa efficienza, e vengono poi rivelati mediante due diverse sonde, una per il target e una per lo standard.

In questo modo è possibile risalire alla quantità iniziale del target, mediante un semplice calcolo di rapporto tra la quantità di amplificato del target e dello standard, eliminando così l'effetto di parziali inibizioni eventualmente presenti.

Il metodo quantitativo di PCR è del tutto simile ad una reazione di PCR qualitativa, con alcune differenze. A livello della fase di estrazione viene aggiunto lo standard interno. Nella fase di rivelazione vengono effettuate due diverse ibridazioni dell'amplificato, con le due sonde specifiche, e in diluizioni scalari dell'amplificato (per aumentare il range dinamico del test di quantizzazione). Da ultimo viene effettuato un calcolo per risalire alla quantità di target iniziale.

Questo metodo attualmente è anche disponibile su uno strumento, che permette una parziale automazione, in particolare delle fasi di amplificazione e rivelazione, mentre l'estrazione rimane ancora manuale.

b) Branched-DNA

Un secondo metodo disponibile per la quantificazione di HCV è il Branched-DNA.

Come già accennato, questa tecnologia non è una amplificazione del target, ma del segnale di una ibridazione diretta di tipo sandwich.

Questo metodo, però, non utilizza enzimi e quindi è possibile la costruzione di una curva esterna con standard esterni. In pratica, non essendoci enzimi coinvolti nell'amplificazione, l'efficienza di reazione è pressoché simile in tutti i campioni.

Proprio per questo motivo il test permette una quantificazione più precisa rispetto alla PCR quantitativa. La maggior precisione rappresenta proprio uno dei principali vantaggi di questo test, che presenta una ottima linearità.

Con l'ultima versione del test, la sensibilità è ormai praticamente sovrapponibile a quella della PCR quantitativa, cioè 615 Unità Internazionali, contro le 600 circa della PCR.

Un altro vantaggio è rappresentato dal range dinamico molto più ampio rispetto alla PCR. Infatti può dosare agevolmente le viremie da 3200 a 40 milioni di copie, senza dover effettuare diluizioni.

Il problema delle contaminazioni è estremamente ridotto, ed è possibile quantizzare i vari genotipi con la stessa efficienza.

La regione riconosciuta e amplificata dal test è rappresentata dalla UTR 5' terminale e da parte della regione Core.

Dopo l'estrazione, l'RNA target di HCV viene immobilizzato su un supporto solido mediante una ibridazione con varie sonde di cattura, le capture probes e le capture extender.

Successivamente si effettua una seconda ibridazione con diverse altre sonde specifiche, chiamate "label extender", le quali a loro volta fanno da "ponte" e ibridizzano con altre sonde di "preamplificazione". Queste ibridizzano a loro volta con una serie di sonde "amplifier" di amplificazione, le quali vengono poi rivelate con un sistema enzimatico in chemiluminescenza.

Il test viene oggi effettuato su uno strumento che permette di automatizzare la maggior parte dei passaggi operativi di ibridazione e di rivelazione.

Negli ultimi anni è stato fatto un notevole sforzo per riuscire a standardizzare i diversi test molecolari quantitativi per HCV.

Questo sforzo ha portato alla definizione di un primo Standard Internazionale valido a prescindere dal test utilizzato, e a cui tutti dovrebbero oggi rapportarsi.

Nel caso della PCR quantitativa per HCV, 1 Unità Internazionale (U.I.) corrisponde a circa 2,4 copie, mentre nel caso di Branched-DNA corrisponde a 5,2 copie.

3) Genotipo virale di HCV

a) Line Probe Assay (LiPA)

Il più conosciuto e diffuso test per la genotipizzazione di HCV è sicuramente il LiPA o Line Probe Assay, che utilizza la regione 5'UTR.

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'UTR.

L'amplificato viene fatto ibridizzare con una serie di sonde, diverse tra di loro, e poste in posizioni differenti su una 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.

b) Sequenziamento della 5'UTR

Da poco tempo è anche possibile genotipizzare l'HCV mediante il sequenziamento diretto della regione UTR 5' terminale.

La metodica è sicuramente molto più complessa di un test LiPA, e quindi non la trattiamo nel dettaglio. Dalla sequenza delle basi nucleotidiche si può comunque agevolmente risalire al genotipo.

Tramite questo metodo è possibile non solo identificare il genotipo e il sottotipo, ma anche il tipo di isolato presente, con una migliore definizione, e questo risultato può essere importante ai fini epidemiologici.

B) Infezione da HBV

Secondo Pawlotsky, la ricerca qualitativa e quantitativa del genoma di HBV con tecniche molecolari è il parametro più attendibile per la diagnosi e il monitoraggio dell'infezione.

Nella pratica clinica però la diagnosi qualitativa non viene quasi mai utilizzata, perché di solito i metodi sierologici "tradizionali" sono già un utilissimo strumento diagnostico. Primo fra tutti l'HbsAg (o antigene Australia), che già da solo permette di diagnosticare l'infezione in atto nella gran parte dei casi.

1) Quantificazione della viremia di HBV-DNA

Il test più utilizzato e più importante nella diagnostica molecolare di infezione da HBV è sicuramente il dosaggio della viremia plasmatica di HBV-DNA.

La determinazione dell'HBV-DNA quantitativa è utilissimo in molte situazioni, ma in particolare è insostituibile nel monitoraggio della terapia con Lamivudina, per evidenziare il livello di soppressione della replicazione e le eventuali riattivazioni virali.

I metodi utilizzati per il dosaggio della viremia, attualmente disponibili in commercio, sono i seguenti:

- l'ibridazione diretta in soluzione, senza amplificazione genomica;
- il Branched-DNA;
- la PCR quantitativa di tipo competitivo.

Il primo di questi test, l'Hybrid Capture HBV-DNA, si avvale di una fase di estrazione del genoma, seguita dall'ibridazione in soluzione con una sonda specifica ad RNA, che copre l'intero genoma del virus. L'ibrido RNA-DNA formatosi viene poi catturato su un supporto solido mediante un'anticorpo specifico per gli ibridi DNA-RNA, e successivamente viene rivelato con un altro anticorpo specifico e un sistema enzimatico.

Questo test si avvale quindi semplicemente di una ibridazione, ma non è un metodo amplificativo.

Il secondo test utilizzato è un Branched-DNA, cioè una amplificazione di segnale. La configurazione del test è sovrapponibile a quanto abbiamo già detto nel caso dell'analogo test per HCV.

Sovrapponibile a quanto abbiamo già detto per i test per l'epatite C, è anche il terzo dei test utilizzati, cioè la PCR quantitativa per HBV. Anche in questo caso ci si avvale di uno Standard Interno a concentrazione nota, aggiunto all'inizio del test e coamplificato.

Se confrontiamo queste tre metodiche ci accorgiamo dei rispettivi vantaggi e limiti.

Il limite più importante dell'ibridazione diretta è la bassa sensibilità (circa 700.000-1 milione di copie per mL), che è anche il limite del Branched-DNA.

Per contro, l'ibridazione diretta ha un buon range dinamico ed è molto facile da eseguire, mentre il Branched-DNA permette un dosaggio molto accurato.

La PCR quantitativa è sicuramente il metodo con la sensibilità più elevata (fino a 200 copie per mL). Ha però il difetto di essere più complesso nella sua esecuzione, e di avere un range dinamico molto limitato, cosa che costringe ad effettuare una serie di amplificazioni con il campione diluito per riuscire a dosare la viremia.

2) Ricerca delle mutazioni correlate con la resistenza alla Lamivudina

Da qualche tempo è diventato sempre più importante riuscire a mettere in evidenza la presenza o la comparsa di mutazioni genomiche del gene che codifica per la polimerasi virale di HBV. Alcune di queste mutazioni provocano infatti la resistenza del virus alla terapia con Lamivudina.

Oggi si conoscono abbastanza bene alcune di queste mutazioni correlate con la resistenza.

Da qualche tempo, è possibile evidenziare queste mutazioni con un metodo di Line Probe Assay, molto simile a quello utilizzato per la genotipizzazione di HCV.

Il test deve essere preceduto da un'estrazione e una amplificazione in PCR specifica per il gene della polimerasi virale. Le ibridazioni con le sonde specifiche permettono di evidenziare le tre principali mutazioni correlate con la resistenza e di fornire quindi al clinico un valido strumento per la scelta del trattamento da seguire.