

METODE DE GENOTIPARE A VIRUSULUI HEPATITIC D

**Dr. Laura Iulia Poloșanu¹, Dr. Olguța Diaconu¹, Dr. Ana Maria Buburuz²,
Dr. Răzvan Ioan Grecu³, Prof. Dr. Luminița Smaranda Iancu¹**

¹*Departamentul de Medicină Preventivă și Microbiologie Interdisciplinară, Facultatea de Medicină Generală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa“, Iași*

²*Departamentul de Medicină Internă, Facultatea de Medicină Generală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa“, Iași*

³*Departamentul de Asistență Primară a Stării de Sănătate și Epidemiologie, Facultatea de Medicină Generală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa“, Iași*

REZUMAT

Infecția cu virusul hepatitic D (VHD) este cunoscută ca fiind una dintre infecțiile care cauzează cele mai severe forme de hepatită, având prognosticul cel mai rezervat, cu rate înalte de hepatită fulminantă și insuficiență hepatică. Până în prezent, au fost descrise 8 genotipuri de VHD. Având în vedere implicarea diferitelor genotipuri în evoluția bolii hepatice, o abordare ideală a pacientului ar trebui să cuprindă și genotiparea VHD. Acest studiu a avut drept scop identificarea metodelor de genotipare a VHD descrise până în prezent. Obiectivele au constat în: identificarea metodelor folosite în genotiparea VHD, analiza comparativă a metodelor identificate și aprecierea celei mai fiabile metode pentru utilizarea în practica medicală.

Pentru o abordare integrativă a metodelor de genotipare VHD utilizate până în prezent, am efectuat o căutare în principalele baze de date și am luat în considerare studii originale, peer-reviewed, realizate pe subiecți umani. Am identificat 4 metode de genotipare descrise în diferite studii de-a lungul anilor: hibridizare, RT-LAMP (*Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification*), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) și PCR urmat de secvențiere.

Studiul poate să reprezinte un punct de plecare în stabilirea metodei standard de genotipare VHD.

Cuvinte cheie: virus hepatitic D, genotipare, diagnostic

INTRODUCERE

Infecția cu virusul hepatitic D (VHD) este cunoscută ca fiind una dintre infecțiile care cauzează cele mai severe forme de hepatită, având prognosticul cel mai rezervat, cu rate înalte de hepatită fulminantă și insuficiență hepatică (1). Odată cu descoperirea virusului Delta în 1977 de către Rizzetto, au apărut diferite controverse în legătură cu modul de acțiune al acestui virus (2). În prezent, nu există un tratament specific împotriva infecției VHD, terapia bazată pe interferon fiind singura armă utilizată pentru a lupta împotriva acestei boli (3, 4).

VHD este un subiect care naște multiple controverse din cauza diversității genetice care determină evoluții diferite ale bolii și influențează răspunsul la tratament și prognosticul (5). Au fost descrise până în prezent 8 genotipuri de VHD (numerotate de la 1 la 8) (6). VHD-1 este ubicuitar, în timp ce restul genotipurilor prezintă o distribuție geografică specifică: VHD-2 este întâlnit mai frecvent în Orientul îndepărtat, Japonia, Taiwan și anumite regiuni din Rusia; genotipul 3 se regăsește predominant în bazinul amazonian, în timp ce genotipul 4 este prezent în principal în Taiwan și Japonia, iar genotipurile 5-8, la pacienții africani care au emi-

Autor corespondent:

Dr. Laura Iulia Poloșanu, Str. Teodor Codrescu nr. 11, Iași

E-mail: laurapolosanu@gmail.com

grat spre Europa de Nord (7, 8). VHD-1 este asociat atât cu forme severe de boală, cât și cu forme ușoare, iar VHD-2 – cu o simptomatologie clinică moderată. VHD-3 determină un tablou clinic sever, iar asocierea cu genotipul F al virusului hepatitic B (VHB) a determinat hepatită fulminantă în majoritatea cazurilor din America de Sud. În ceea ce privește VHD-4, există studii care au arătat că în anumite regiuni se asociază cu o progresie mai rapidă a afectării hepatice spre ciroză (9). În ultimul timp, mai multe studii au arătat că această diversitate genetică a VHD poate influența și metodele de cuantificare a genomului ARN-VHD. Având în vedere că majoritatea tehnicilor utilizează genotipul 1 al VHD ca standard pentru validare, multe dintre metode tind să subestimeze încărcătura virală în cazul celorlalte genotipuri VHD (10).

Diagnosticul hepatitei D constă în determinarea anticorpilor totali anti-VHD care sunt prezenți atât în forma acută de boală, cât și în cea cronică. Totuși, există studii care au demonstrat că acești anticorpi pot lipsi la pacienții cu ARN-VHD prezent (11). Astfel, diagnosticul infecției VHD ar trebui să fie completat întotdeauna de determinarea și cuantificarea ARN-VHD. Pentru aceasta, au fost descrise de-a lungul timpului diverse metode de identificare a genomului VHD, unele mai rapide, altele mai specifice, altele cu un risc mai mic de contaminare (12). Este dificil de apreciat cea mai bună metodă de genotipare deoarece majoritatea tehnicilor descrise sunt tehnici *in-house* (realizate în propriul laborator) care folosesc protocoale diferite. Cele mai mari discrepanțe se întâlnesc în design-ul primerilor (corespunzător antigenului VHD sau regiunii ribozomale) (13), în etapele de amplificare (realizate manual sau automat, într-o singură etapă sau mai multe, folosind hibridizarea sau probe modificate TaqMan) (14,15) și în stabilirea standardului intern de calitate (ARN-VHD transcris *in vitro* sau plasmide ADN care conțin secvențele țintă ale VHD) (16,17). Având în vedere că există atât de multe variabile care trebuie luate în considerare, implementarea unei metode standard de cuantificare a ARN sau ADNc este departe de a fi realizată. Acest aspect a fost subiectul multor controverse în ultimii ani, dezbateri care au condus la implementarea în 2013 de către Organizația Mondială a Sănătății – World Health Organization (WHO) a unui

standard de control pentru VHD-1, folosit în metodele bazate pe tehnicile de amplificare a acizilor nucleici (18). Totuși, există studii ulterioare care au arătat că tehnicile care folosesc acest standard tind să subestimeze cuantificarea ARN-VHD în cazul celorlalte genotipuri (10).

Luând în considerare implicarea diferitelor genotipuri în evoluția clinică a pacientului cu hepatită B, o abordare ideală a acestor pacienți ar trebui să fie finalizată de determinarea genotipului VHD. Astfel, în acest articol ne îndreptăm atenția spre următorul pas în diagnosticul VHD, respectiv genotiparea. La fel cum s-a observat în cuantificarea încărcăturii virale, există, de asemenea, o diversitate în tehnicile de genotipare ale VHD. În prezent, genotiparea este folosită doar în scopul cercetării. O metodă rapidă și eficientă de genotipare care ar putea fi utilizată în practica medicală ar putea îmbunătăți managementul pacientului și ar putea reprezenta un punct de plecare în dezvoltarea terapiilor țintă. Până în prezent, nu există metode standard de genotipare a VHD. Multe studii au descris diverse metode de identificare a genotipului VHD, dar nu se poate aprecia care metodă este mai eficientă.

OBIECTIVE

Scopul acestui studiu este de a înțelege mai bine fiecare metodă de genotipare VHD descrisă în ultimii ani. Obiectivele au fost reprezentate de: identificarea tehnicilor folosite în genotiparea VHD și realizarea unei comparații între ele; aprecierea celei mai bune metode de genotipare și estimarea probabilității de a fi aplicate ca metode standard în genotiparea genomului ARN-VHD.

MATERIALE ȘI METODE

Strategii de căutare

Pentru a realiza o abordare integrativă a metodelor de genotipare VHD, am efectuat o căutare amplă în principalele baze de date: PubMed, Google Scholar, Cochrane library și Embase. În acest scop, am folosit următoarele cuvinte cheie: “HDV genotyping”, “hepatitis D genotype”, “RT-PCR AND HDV”, “RLFP AND HDV”, “direct sequencing AND HDV”, “RT-LAMP AND HDV” și „Hybridization AND HDV”.

Criterii de includere

Pentru a identifica metodele, am luat în considerare articole originale, peer-reviewed, care descriu metode de genotipare ale VHD realizate pe subiecți umani. Nu s-au luat în considerare protocoalele de studiu, rapoartele de caz, opiniile experților și studiile realizate pe animale.

REZULTATE

În acest studiu am identificat patru metode de genotipare descrise în diferite studii. Metodele sunt: hibridizarea, RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification*), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) și PCR urmat de secvențiere (Tabelul 1).

TABELUL 1. Studiile și metodele identificate

Metode de genotipare	Studii
PCR-RFLP	Wu 1995 (19) Mirshafiee 2009 (20) Souza 2015 (21)
Hibridizare	Sun 2004 (22)
PCR + secvențiere directă	Altuğlu 2005 (23) Shang 2012 (24) Coller 2018 (25) (qRT-PCR on automated platform)
RT-LAMP	Wang 2012 (26)

DISCUȚII

Deși vaccinarea anti-VHB poate preveni infecția cu virus Delta, infecțiile cronice VHD încă reprezintă o problemă majoră de sănătate, diagnosticul precoce fiind crucial. Markerii serologici (antigenul și anticorpul) nu sunt suficienți pentru un diagnostic complet. Genotiparea VHD este importantă deoarece reprezintă singurul mod prin care putem aprecia evoluția pacientului, estima răspunsul la tratament și formula un prognostic.

Diferite metode au fost descrise de-a lungul timpului pentru a atinge acest scop, de la hibridizare, RT-LAMP la RFLP și PCR, urmat de secvențiere. Deși sunt studii care analizează fiecare metodă din punct de vedere al acurateței și aplicabilității în laboratoarele clinice, nu a fost încă publicată, până în prezent, nicio comparație între aceste metode.

Prima metodă de genotipare VHD a fost tehnica hibridizării, descrisă de Gupta în 1989 (27). De atunci, alte 5 genotipuri au fost identificate și au

fost utilizate cel puțin 2 tehnici noi de genotipare (28). Genotiparea prin hibridizare este o metodă care folosește secvențe de ADN cunoscute pentru a hibridiza secvențele complementare din ADN-ul studiat, secvențe care vor fi recunoscute ulterior prin marcarea fluorescentă. Această tehnică folosește secvențe de ADN scurte (oligonucleotide) luate dintr-o bază de date pentru a construi secvența țintă care trebuie identificată (29).

Până în prezent, nu există studii care să identifice acuratețea metodei de hibridizare în genotiparea VHD. În 1994, Gallenger și colab. au descris o metodă de hibridizare pentru cuantificarea VHD și nu pentru genotipare (30). În 2004, Sun și colab. au prezentat o asociere între PCR și hibridizare, oferind o potențială soluție pentru diagnosticul diferitelor genotipuri VHD.

Hibridizarea prezintă o specificitate bună, însă o sensibilitate scăzută, în timp ce PCR are un risc crescut de contaminare (22). Cu trecerea timpului, tehnicile bazate pe PCR au fost îmbunătățite și, în prezent, există metode PCR într-o singură etapă, cu un risc minim de contaminare și sensibilitate și specificitate înalte (15). În plus, Sun și colab. au descris metoda ca fiind foarte simplă cu un raport cost-eficiență satisfăcător care folosește cip-uri cu gene pentru diagnosticul clinic (22). La momentul actual, nu există metode de genotipare validate pentru toate genotipurile VHD. Avantajul acestei metode este abilitatea de a identifica un număr mare de ținte omogene.

RFLP (sau polimorfismul lungimii fragmentului de restricție) este o metodă simplă de genotipare care clivează produșii obținuți prin PCR (ampliconii) folosind enzime de restricție. A fost descrisă pentru prima dată în 1995, când Wu și colab. au folosit *XhoI* și *SacII* ca enzime de restricție (19). După atașarea acestor enzime de restricție, genotipul ADNc-VHD este clivat, rezultând fragmente de diferite dimensiuni, care, odată încărcate în gelul de electroforeză, vor migra în câmp electric în funcție de greutatea moleculară. Astfel, pentru fiecare genotip VHD există un pattern caracteristic de migrare a diferitelor secvențe de ADNc.

Genotiparea prin RFLP a fost comparată cu secvențierea directă și s-a dovedit a fi o metodă mai eficientă pentru cele 3 genotipuri VHD existente în acel moment. Această metodă s-a dovedit a fi de ajutor în descoperirea celorlalte genotipuri mai târ-

ziu, în 1998 (31). De asemenea, Mirshafiee și colab. au afirmat despre această metodă că este una simplă și fiabilă (20). Recent, în 2015, Souza și colab. au descris o tehnică PCR-RFLP capabilă să identifice toate genotipurile VHD (21). Pentru a valida această metodă, autorul citat a comparat rezultatele cu cele obținute prin analiză filogenetică. Astfel, RFLP s-a dovedit a fi o altă metodă fiabilă, ușor de aplicat. Aceasta nu necesită marcarea radioizotopică și poate fi folosită pentru analiza mai multor probe, în studiile clinice și epidemiologice.

PCR este metoda clasică folosită în amplificarea oricărui genom ARN sau ADN. În principiu, pentru amplificarea genomului ARN, se recomandă transcrierea în ADNc cu ajutorul unei reverstranscriptaze pentru o stabilitate mai mare a produsului analizat (18). Ulterior, genotiparea prin secvențiere directă presupune secvențierea întregului genom ARN-VHD, urmată de analiza filogenetică în care secvențe specifice din fiecare genotip sunt urmărite, identificate și stocate în diferite bănci de gene, de exemplu, GeneBank.

În ceea ce privește PCR urmată de secvențiere, au fost descrise diferite metode de-a lungul anilor. În 2005, Altuglu și colab. au folosit RT-PCR-secvențiere aplicată unui lot de pacienți infectați cronic VHD din Turcia, afirmând, de asemenea, că este o metodă eficientă (23). Mai târziu, Shang și colab. au propus în 2012 o tehnică bazată pe Real-Time PCR, în care ampliconii au fost utilizați direct pentru secvențiere, evitând pașii de extracție ARN, de reverstranscripție și electroforeză utilizați în studiul descris anterior de Altuglu și colab. (24). Astfel, acest ultim studiu citat pare să fie o alegere mai bună în genotiparea VHD, având în vedere riscul redus de contaminare. Recent, Collier și colab. au prezentat o metodă mult mai promițătoare în care extracția și amplificarea sunt realizate pe o platformă automată (25).

RT-LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification* – Amplificarea izotermică mediată prin buclă) este o altă metodă de genotipare VHD descrisă de Wang și colab. în 2012 (26). Spre deosebire de

PCR convențional și Real-Time PCR, această metodă se realizează în mai puține etape și implică un echipament mai economic. Sunt necesari doar 4 primeri special construiți care recunosc secvențe țintă ADN (32) și o temperatură constantă de 65°C pentru 50 de minute pentru ca reacția de amplificare să aibă loc. Astfel, avantajele acestei tehnici sunt simplitatea, eficacitatea amplificării și riscul redus de contaminare. De asemenea, această metodă necesită și mai puțin timp (o oră) în comparație cu PCR (2 ore) pentru întreg procesul de analiză. În plus, oferă posibilitatea de a identifica macroscopic rezultatele. În acest studiu, Wang și colab. au evaluat potențialul de aplicabilitate al RT-LAMP testând sensibilitatea și specificitatea metodei în comparație cu Real-Time PCR, dar parametrii exacti nu au fost calculați. Cel mai mare dezavantaj al acestei tehnici este faptul că a fost construită doar pentru a identifica genotipul 1 VHD (26). În concluzie, și această metodă pare a fi o metodă fiabilă care necesită a fi testată și în cazul celorlalte genotipuri VHD.

CONCLUZII

Având în vedere că toate aceste metode se bazează pe utilizarea unor standarde construite de fiecare laborator (in-house), o comparație exactă între metode este dificil de realizat. Dintre toate tehnicile prezentate, hibridizarea și RT-LAMP ar putea constitui viitorul pentru diagnosticul rapid al genotipului VHD, în situații de urgență, în timp ce RFLP și PCR-secvențierea par a fi metodele de bază, fiabile, care pot fi utilizate de rutină în orice laborator pentru cercetare și diagnostic clinic. RFLP rămâne o alegere bună pentru țările subdezvoltate care nu dispun de o platformă de secvențiere. Acest studiu ar putea reprezenta un punct de plecare pentru implementarea unei metode standard de genotipare a VHD. Sunt necesare studii ulterioare pentru descrierea unui standard în genotiparea VHD și pentru dezvoltarea unor tehnici care ar putea fi utilizate și în practică.