

GJENOTIPIZIMI ME ANË TË METODËS MULTIPLEX PCR TË HEPATITIT B NË SHQIPËRI

*MARKU E.¹, KONI M.², MALTESE P.³, BERTELI M.³

¹Fakulteti i Shkencave Mjekësore Teknike

²Universiteti Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Biologjisë

³Universiteti Tiranës, Laboratorio MAGI association Italy

e-mail: erwinmarku@yahoo.com

Përmbledhje

Virusi i hepatitit B (HBV) paraqet një nga problemet kryesore të shëndetit publik në botë. HBV është një virus i kapsulluar (i mbështjellë) me diametër 42 nm i cili i përket familjes *Hepadnaviridae*. Gjenoma e tij është një ADN me 3,200 nukleotide cirkulare. Mutacionet gjenotip-specifike lejojnë identifikimin e deritanishëm të tetë gjenotipeve (A-H). Ne kemi përdorur një metodë molekulare shumë të ndjeshme, të shpejtë dhe efektive në identifikimin e gjenotipeve të 20 kampioneve të përzgjedhura rastësisht nga një grup prej 77 kampionesh të donatorëve të gjakut në Shqipëri, të testuar pozitivisht për HBV-në, të cilat më parë i'u ishin nënshtruar ekstraktimit të ADN-së totale (të cilat përmbushnin kushtet e sasisë dhe pastërtisë organike). Ne përdorëm reaksionet multiplekse të zinxhirit të polimerazës, *Multiplex PCR*, mbi një amplicon të ADN-virale të integruar në gjenom dhe të konservuar mirë në gjenotipet e ndryshme të HBV-së për të testuar këtë metodë në identifikimin gjenotipik të virusit. Në këtë aspekt, u përdorën tre çifte startuesish (primers) të cilat identifikonin tre gjenotipe të ndryshme (A, C dhe D), gjenotipe këto të cilat janë më të përhapurat në rajonin tonë e më gjerë. Nga rezultatet e përfuara nga eksperimentet, del që reaksionet e PCR-së të kryera mbi ampliconin viral kanë një ecuri të mirë dhe pasqyrohen qartë dhe dukshëm si banda në xhel elektroforezën me agar, ku migrimi i tyre është përcaktues i gjenotipeve virale të HBV-së krahasuar me kontrollet. Nga analiza jonë me 20 kampionet në fjalë, pothuajse të gjitha i përkasin gjenotipit D (përveç dy kampioneve me gjenotip A), një rezultat ky që përkon me studimet e mëparshme.

Abstract

Hepatitis B virus represents one of the major concerns of public health worldwide. HBV is an encapsulated virion with a diameter of 42 nm and belongs to the *Hepadnaviridae* family. Its genome consists of a 3.2 kb circular DNA. Genotype-specific mutations allow identification of eight genotypes so far (A-H). We have used a molecular method which is very sensitive, fast and reliable in identifying the genotypes present in 20 randomly selected samples out of a group of 77 blood donor samples tested HBV+ in Albania. We used multiplex polymerase chain reactions, *Multiplex PCR*, on an amplicon of viral DNA integrated with the genome and well conserved in the different genotypes of HBV, in order to test this method in the genotypic identification of the virus. In this perspective, three pairs of primers were used that identify three different genotypes (A, C and D), exactly the ones which are widespread in our region and further on. From the obtained results of the experiments, comes out that the PCR reactions conducted on the viral amplicon

were carried out fine and they come out very clearly as bands in agarose xhel electrophoresis, where their migration is the key in detecting the different viral genotypes of HBV compared to the controls. Out of our analysis of the 20 samples in consideration, almost all of the samples belong to genotype D (except two samples with genotype A), a result that is consistent with other past studies.

Fjalëkyçe: Hepatiti B, gjenotipizimi, Multiplex PCR, gjenotipi D.

Hyrje

Virusi i hepatitit B (HBV) ka të njohura tetë gjenotipe të ndryshme (A-H) të cilat ndryshojnë në sekuencat nukleotidike me më shumë se 8% (Norder H., *et al*, 2004). Disa publikime reçente kanë gjetur se lloji gjenotipik i virusit ndikon në ecurinë dhe rezultatet klinike të pacientëve me ose pa terapi antivirale (Locarnini SA, 2002). ADN-ja e HBV-së është strukturalisht komplekse. Njihen 4 ORF (opening reading frames) të mbivendosura gjerësisht mes tyre, në mënyrë që sekuencat nukleotidike të përbashkëta mund të përdoren, duke filluar nga vende të ndryshme të fillimit të translimit, për sintezën e 7 proteinave me struktura dhe funksione të larmishme mes tyre. Nga 4 rregjionet gjenomike, dy (pre-S/S dhe pre-C/C) kodojnë për proteinat strukturore të mbështjelljes së bërthamës, ndërsa dy të tjerat (P dhe X) për proteinat funksionale; respektivisht polimeraza virale dhe proteinat me funksione pjesërisht akoma të panjohura, ndaj edhe emërtimi me shkronjën X. Envelop-i viral rezulton i përbërë nga një mozaik i proteinave transmembranore, një pjesë e këtyre në formë të glikolizuar. Gjenerimi S kodon për HbsAg (p24 dhe gp 27) , më e vogla e proteinave sipërfaqësore, duke qenë e përberë nga 226 aminoacide. Nga këndvështrimi sasior është ajo më tepër e pranishme si në tërësinë e virusit ashtu edhe në grimcat sferike dhe filamentoze të tij dhe ndaj vjen edhe percaktimi “major”.

Gjenotipizimi i viruseve me anë të sekuencimit dhe krahasimit konsequent me anë të homologjisë apo me anë të analizës së pemës filogjenetike është i komplikuar dhe nevojitet shumë punë dhe si rrjedhojë nuk është praktik për qëllime diagnostike. Me avancimet reçente në teknikat molekulare, janë introduktuar disa metoda të reja gjenotipizimi një ndër të cilat është PCR-ja me startues (primers) gjenotip-specifik (Kirschberg ., *et al*, 2004). Në këtë studim, është testuar efikasiteti i kësaj metode duke marrë parasysh kampione të cilat kanë dhënë rezultat me metodën e sekuencimit në menyrë që të shihet niveli i përputhshmërisë së rezultateve.

Materiali dhe metodat

Shënim: Pikat e mëposhtme janë realizuar në Poliklinikën “At Luigji Monti” ZKM, dhe pranë Qendrës Kombëtare të Transfuzionit të Gjakut Tiranë.

- ▶ Mbledhja e 100 kampioneve të gjakut të testuar pozitiv për hepatitin B nga grupi i dhuruesve vullnetar të gjakut si dhe nga grupi i dhuruesve familjarë të gjakut si dhe;
- ▶ ekstraktimi i ADN-së nga kampionet e marra duke përdorur një metodë të shpejtë dhe efektive të marrjes së gjakut në sasi të vogël mbi një

letër filtri Whatman dhe më pas duke realizuar protokollin me standard në këtë fushë siç është ai i kompanisë Qiagen (*kiti Qiagen i ekstraktimit të ADN/ARN nga kampionet e gjakut si dhe të pështymës*).

Shënim: Pikat e mëposhtme janë realizuar në Laboratorin qëndror të shoqatës së Gjenetikës Mjeksore MAGI-onlus, Trento, Italy për një periudhë 6 mujore.

▶ Matja e përqendrimit dhe e pastërtisë së kampioneve të ADN-së u përcaktua duke përdorur analizën spektrofotometrike (*NanoDrop UV-VIS, Oklahoma, USA*).

▶ Identifikimi dhe gjenotipizimi i agjentëve viral në kampionet e ekstraktuara duke përdorur metodën e PCR-së multiplekse me startues gjenotip-specifikë.

-Për përcaktimin e gjenotipeve kemi përdorur një reaksion PCR-je të kufizuar (nested-PCR) për amplifikimin e një segmenti të konservuar të “loop”-t të madh antigenik. Shkurtimisht, është seleksionuar një porcion i gjenit kodifikues për rajonin sipërfaqësor hidrofilik e proteinës HbsAg për të amplifikuar një produkt prej 547-bp me një kopje të parë startuesish (primers) të jashtëm 5'-ACCCCTGCTCGTGTACAGGC-3';

(sense primer: pozicioni 184-204) e 5'-AAAGCCAGACAGTGGGGGAAA-3' (antisense primer; pozicioni 731-711) duke përdorur profilin e mëposhtëm termik për PCR:

denatyrimi inicial	95° x 5'		
denatyrimi	95° x 15''		
	hibridizimi	60° x 30''	38 cikle
	zgjatimi	72° x 40''	
zgjatimi final	72° x 5'		

Një kopje e dytë të startuesve më të brëndshëm (intern) 5'-GACTCGGTGGTGGACTTCTCTC-3' (sense primer; pozicioni 251-271) dhe 5'-TAAACTGAGCCAGGAGAAACG-3' (antisense primer; pozicioni 679-659), u përzgjedhën për të amplifikuar një produkt prej 429-bp duke përdorur profilin e mëposhtëm termik për PCR:

	denatyrimi inicial	95° x 5'	
denatyrimi	95° x 15''		hibridizimi
60° x 30''	42 cikle		
zgjatimi	72° x 40''		
zgjatimi final	72° x 5'		

Produktet e *nested PCR* u pastruan me një kit Cycle Pure Kit (*Omega Bio-Tech*) dhe ju nënshtruan analizimit të PCR multiplekse.

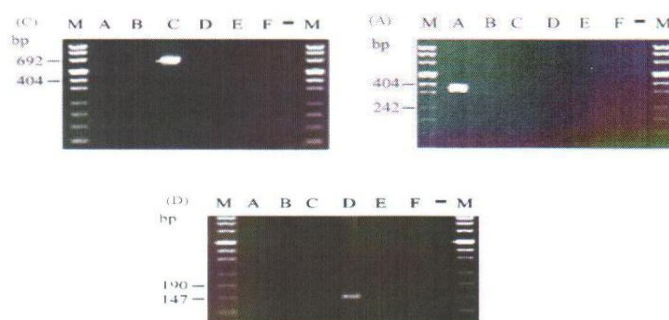
Rezultatet

Nga 100 kampionet në fjalë, 77 kampione kishin përqëndrim ADN-je nga 15-144 ng/μl, kurse 23 të tjerat më të ulët se 15 ng/μl, u eliminuan nga analizat e mëtejshme.

Nga 77 kampionet të marra për studim mbi 90% e tyre tregonin një raport OD 260nm/280nm dhe 260nm/230nm brenda vlerave normale pra kampione te pastërta, respektivisht pa mbetje proteinike dhe pa mbetje substancash të tjera organike.

Gjenotipizimi i agjentëve viral në 20 kampionet në fjalë, me anë të PCR-së multiplekse për gjenotipet A, C dhe D rezultoi në 18 kampione me gjenotip D dhe 2 kampione me gjenotip A duke marrë parasysh që nga studimi u panë vetëm bandat A (në dy raste) dhe D (në 18 rastet e tjera). Këto banda dallohen qartë në xhel elektroforezën me agar 2% për gjenotipin A, C dhe D (siç është treguar në figurën 1).

Figura 1. Bandat që dallohen në fotografimet e xhelit tregojnë për prezencën e tre gjenotipeve C (e para majtas), A (e dyta djathtas) dhe D (e fundit poshtë).



Përfundime dhe rekomandime

Metoda e PCR-së multiplekse është një metodë relativisht e thjeshtë, e shpejtë identifikimi e përshtatshme për analizim gjenotipik të HBV-së si një mjet shumë i rëndësishëm në diagnostikimin molekular të nëntipeve të ndryshme të HBV-së. Edhe pse ajo ka një ndjeshmëri të lartë, rezultatet varen shumë nga një sërë faktorësh objektiv duke filluar që nga marrja dhe ruajtja e mostrave për analizim në kushte të mirëpërcaktuara, duke vazhduar më tej tek zbatimi i saktë i protokolleve të teknikave bazë molekulare siç janë kryesisht ekstraktimi i ADN-së, niveli i pastërtisë (pra evitimi i kontaminimit të jashtëm) dhe amplifikimi i ADN-së virale me anë të reaksionit zinxhir të polimerazës, *PCR-së*.

Në bazë të analizës së bandave të ADN-virale të ndara me elektroforezë sipas peshës molekulare të treguara në tabelën e mësipërme, vetëm në dy

raste të kampioneve të analizuara ka rezultuar genotipi A ndërsa pjesa tjetër e këtyre kampioneve që janë 18 të tilla nga 20 kampione të analizuara me PCR multiplekse, kanë marrë nëntipin D të virusit HBV, rezultat ky 100% i përputhshëm me rezultatin e gjenotipeve të nxjerra më anë të sekuencimit, duke përkuar me efikasitetin jashtzakonisht të lartë të metodës, mbështetur fort nga literatura (Bartholomeusz., *et al*, 2004), dhe që mund të përdoret në teste depistimi në popullatën e gjerë edhe në Shqipëri.

Literatura

Kirschberg O., *et al*, (2004): A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-genotypes A-F, *Journal of Clinical Virology* 29; 39-43

Kondili, L.A. *et al.*, (2009): Hepatitis B, C and Delta virus infections in Albanian patients with chronic liver disease: evaluation of possible changes during the last 10 years. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*: 22, 167–171

Zehender G, Shkjezi R, Ebranati E, Gabanelli E, Abazaj Z, Tanzi E, Kraja D, Bino S, Ciccozzi M, Galli M (2012). Reconstruction of the epidemic history of hepatitis B virus genotype D in Albania. *Infect Genet Evol. Mar*;12 (2): 291-8

Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, *et al.* (2004): Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*;47: 289–309

Bartholomeusz A, Schaefer S. (2004): Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol*;14: 3–16

Chen J, Yin J, Tan X, Zhang H, Zhang H, Chen B, *et al.* (2007): Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A–F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *J Clin Virol*;38: 238–43

Liu WC, Lindh M, Buti M, Phiet PH, Mizokami M, Li HH, *et al.* (2008): Genotyping of hepatitis B virus genotypes A to G by multiplex polymerase chain reaction. *Intervirology*; 51:247–52

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, *et al.* (2006): Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.*; 28:112-125.

Lin CL, Kao JH, Chen BF, *et al.* (2005): Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin Infect Dis.*;41:1576-1581

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, *et al.* (2002): Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*;83:1267-1280

Locarnini SA. Clinical relevance of viral dynamics and genotypes in hepatitis B virus. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2002; 17(Suppl 3):S322–S328

Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC & Chen WJ. (2003): Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; 38: 95–101