

APLICABILITATEA TEHNICILOR MOLECULARE ÎN GENOTIPAREA ȘI EPIDEMIOLOGIA HCV

Autori: A.M. Opreșoreanu*, C. Szmál*, D. Oțelea**, G. Opreșan*

* *I.N.C.D.M.I Cantacuzino;*

** *Institutul de Boli Infecțioase "Matei Balș", București, Romania*

Introducere: După 16 ani de la descoperirea virusului hepatitei C (HCV, familia *Flaviviridae*), elucidarea patogenezei hepatitei C rămâne încă nerezolvată. Identificarea și studierea HCV au devenit posibile datorită tehnicilor de biologie moleculară. La ora actuală HCV constituie o problemă de sănătate publică, aproximativ 3% din populația globului fiind infectată. Pentru bolnavii de hepatită C riscul de progresie spre hepatită cronică, ciroză hepatică și carcinom hepatocelular este crescut. HCV e un virus ARN pozitiv, monocatenar, caracterizat de o mare diversitate genetică datorită erorilor de încorporare a nucleotidelor de către polimeraza virală. Au fost identificate 6 genotipuri majore și peste o sută de subtipuri cu o distribuție geografică variabilă. Pe baza regiunilor relativ conservate din genom (5'UTR, core, NS5B) se poate face o discriminare între diferitele genotipuri și subtipuri.

Materiale și metode: serurile au fost colectate de la pacienți cu hepatită C aflați în diferite stadii ale bolii, înainte/după tratament și cu încărcătura virală cunoscută. După extracția ARN cu kitul Qiagen s-a realizat revers transcrierea cu primeri hexameri random (Promega). cDNA obținut a fost supus amplificării în trei regiuni genomice (5'UTR, core, NS5B) prin nested - PCR (metodă home-made, dezvoltată la institutul Pasteur, Paris). Se realizează un screening în regiunea 5'UTR prin RFLP ('restriction fragment length polymorphism') cu trei enzime de restricție (Mva I, Mvn I, Sau 3a I). Pentru identificarea subtipurilor se realizează secvențierea automată. Programele utilizate pentru analiza secvențelor de acizi nucleici au fost: BioEdit, Fasta, Mega 3, Phylip.

Rezultate și concluzii: Pe un lot de 65 de seruri s-a realizat o primă evaluare prin sistemul PCR-RFLP în 5'UTR. În urma acestei evaluări s-a observat că majoritatea profilelor se încadrează în subtipul 1b (60 de probe - 92,3%). S-au identificat și câteva tulpini din genotipurile 1a și 2. Pentru una din probe RFLP nu a putut face distincția între genotipul 4 și 5, iar în cazul serurilor provenite de la consumatorii de droguri nu s-a putut preciza cu certitudine apartenența la un anumit genotip.

Deoarece zona 5'UTR este mai puțin rezolutivă pentru identificarea subtipurilor, secvențierea rămâne metoda cea mai utilă pentru subtipare. În urma secvențierii au fost confirmate genotipurile 4a și 2a. La consumatorii de droguri genotipul identificat a fost 1a. Cu ajutorul programelor informatice s-au construit arbori care indică filiația tulpinilor de HCV. În cazul genotipului 4a, acesta se întâlnește cu precădere în Egipt. Apariția unui astfel de caz în România poate da indicii cu privire la sursa și modul de transmitere a infecției.

Astfel, genotiparea prin secvențiere nu este numai un instrument util exclusiv cercetării, ci are aplicabilitate și în medicină, în diagnosticul hepatitei C.