

COMUNICAZIONE BREVE

APPLICAZIONE DI UN SISTEMA SENSIBILE E SPECIFICO DI REAL-TIME PCR PER IL DOSAGGIO DEL DNA COVALENTE CHIUSO CIRCOLARE (CCCDNA) NELLE BIOPSIE EPATICHE DI COLORO CHE SONO STATI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI FEGATO PER EPATOPATIA CRONICA DA HBV

A SENSITIVE AND SPECIFIC QUANTITATIVE REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (CCCDNA) IN LIVER BIOPSIES FOR HBV PERSISTENCE AND RECURRENCE DISEASE RISK AFTER LIVER TRANSPLANTATION DUE TO HBV-RELATED CIRRHOSIS

¹MARCUCCILLI FABBIO, ¹CIOTTI MARCO, ²LENCI ILARIA, ²TISONE GIUSEPPE, ²DI PAOLO DANIELE,
²ANGELICO MARIO, ¹PERNO CARLO FEDERICO

¹Laboratory of Molecular Virology, ²Hepatology and ²Liver Transplant Center
"Tor Vergata" University, Rome, Italy

Riassunto

Il cccDNA è una isoforma del virus dell'epatite B, implicata nella ripresa della replicazione virale nei soggetti trapiantati di fegato, affetti da epatopatia cronica da HBV. Il trapianto stesso non garantisce l'eradicazione del virus, per cui è seguito in assenza di una specifica profilassi da un alto tasso di recidiva, fino all'80%. Le linee guida, ai fini di prevenzione della recidiva da HBV prevedono la combinazione di immunoglobuline e analoghi nucleosidici capace di ridurre i tassi di recidiva al di sotto del 10%. Pertanto con il presente studio si è voluto andare ad evidenziare in forma qualitativa e quantitativa se il cccDNA persiste nel fegato dei pazienti trapiantati, sottoposti ad una profilassi post-trapianto convenzionale attraverso una metodica altamente sensibile e specifica come la real-time PCR. Per validare tale metodo abbiamo testato 44 biopsie epatiche, di 44 pazienti sottoposti a trapianto di fegato, in quanto affetti da cirrosi correlata all'epatite B. (33 uomini/11 donne, età media 55 anni, di cui 18 infettati da HBV, 11 coinfezioni HBV/HCV e 15 coinfezioni HBV/HDV. Tutti i pazienti hanno ricevuto i.v. immunoglobuline e Lamivudina dopo il trapianto con una media di follow-up di 88±40 mesi; tre di questi hanno ricevuto Adefovir e Lamivudina prima e dopo il trapianto. Per quantificare il cccDNA è stata creata una curva standard avvalendosi del plasmide pAM6 e allo stesso tempo sono state utilizzate delle biopsie come controlli positivi e negativi. Tutte le biopsie sono risultate essere undetectable al cccDNA, ad eccezione di una. Questo saggio di PCR real-time specifico e sensibile per la rilevazione del cccDNA, potrebbe rappresentare uno strumento utile per predire il rischio di recidiva HBV post-trapianto, nonché predire l'interruzione della profilassi post-trapianto.

Parole chiave: Hepatitis B virus, cccDNA, real-time PCR

Abstract

A sensitive and specific quantitative real-time PCR assay for detection of covalently closed circular DNA (CCCDNA)

The cccDNA is an isoform of hepatitis B virus implicated in the resumption of viral replication in transplant recipients liver, with liver disease chronic HBV infection. The transplantation itself does not guarantee the eradication of the virus, for which was followed in the absence of specific prophylaxis by a high recurrence rate, up to 80%. The guidelines, for the purposes of prevention of recurrent HBV infection involving the combination of immunoglobulin and nucleoside analogues capable of reduce relapse rates below 10%. Therefore, with this study we wanted to go to highlight in the form qualitative and quantitative if the cccDNA persists in liver transplant patients who underwent

prophylactic post-transplant conventional means of a highly sensitive and specific method such as real-time PCR. In order to validate this method we tested 44 liver biopsies of 44 patients undergoing liver transplantation, as affected by cirrhosis related to hepatitis B. (33 Men/11 women, mean age 55 years, of which 18 infected with HBV, HBV co-infected 11/HCV co-infected and 15 HBV/HDV. All patients received fully paid immunoglobulin and Lamivudine after transplantation with an average follow-up of 88 ± 40 months, three of which have received Adefovir and Lamivudine before and after the transplant. To quantify the cccDNA was created using a standard curve of the plasmid pAM6 and at the same time biopsies were used as positive and negative controls. All biopsies were found to be undetectable to cccDNA, except one. This real-time PCR assay specific and sensitive for the detection of cccDNA, could represent a useful tool for predicting the risk of HBV recurrence post-transplant, as well as predict the interruption of prophylaxis post-transplant.

Key words: Hepatitis B virus, cccDNA, real-time PCR

Il trapianto di fegato in pazienti affetti da epatite B è seguito in assenza di una specifica profilassi da un alto tasso di recidiva, fino all'80%^(3,6) e con un alto rischio di fallimento del trapianto, dovuto allo sviluppo di cirrosi, epatite colestasica fibrosante o epatite fulminante. La prevenzione delle recidive è di fondamentale importanza per il successo a lungo termine della terapia, e la combinazione di immunoglobuline e analoghi nucleosidici si è dimostrata efficace nel ridurre i tassi di recidiva al di sotto del 10%.⁽³⁾ Tuttavia, questa strategia preventiva necessita di essere mantenuta indefinitamente ed è associata ad alti costi che gravano sul sistema sanitario nazionale, pari a 38.000 € all'anno per ciascun paziente^(2,7), crea disagio per i pazienti ed occasionalmente effetti collaterali e non ci sono attualmente criteri per stabilire se la profilassi con immunoglobuline possa essere sospesa. Poiché è stato osservato che il rischio di riattivazione del virus dell'epatite B è dovuto alla persistenza del genoma virale in forma di cccDNA, (covalente chiuso circolare DNA) nel nucleo degli epatociti infettati e dall'assenza di farmaci efficaci, con il presente studio si è voluto andare a vedere se il cccDNA persiste nel fegato di pa-

zienti trapiantati, sottoposti ad una profilassi post-trapianto convenzionale. Il cccDNA ha un ruolo cruciale nella ripresa della replicazione del virus, come indicato dai lavori della letteratura⁽⁴⁾. Al momento i sistemi di valutazione di clearance del virus si basano nel valutare la viremia HBV DNA e la presenza dell'antigene HBsAg nel siero dei pazienti. Questo offre un vantaggio da un punto di vista di metodologia non invasiva, ma non garantisce la certezza che il virus sia realmente eradicato a livello epatico. Da ciò deriva l'importanza e l'obiettivo di identificare un nuovo marker (cccDNA) utile nel valutare l'eradicazione del virus in pazienti post-trapianto. Inoltre i sistemi di quantificazione del cccDNA sono pochi ed indaginosi, pertanto per questo studio si è sviluppato un sistema di real-time PCR tale da poter raggiungere la massima sensibilità, una peculiarità della real-time PCR stessa⁽¹⁾. La rilevazione del cccDNA al LightCycler avviene in un sistema chiuso, riducendo così il rischio di cross-contaminazione degli ampliconi e permette di ottenere risultati già dopo un'ora, a differenza della PCR tradizionale. Con questa tecnologia si è potuto monitorare i pazienti post-trapianto a distanza di sette anni, per valutare se il trattamento post-profilattico vada interrotto oppure continuato. Degli ottanta pazienti che sono stati sottoposti a trapianto di fegato, in quanto affetti da cirrosi correlata all'epatite B, nel periodo compreso tra il Millenovecentonovantatré ed il Duemilacinque nella clinica chirurgica dell'Ospedale S. Eugenio di Roma, ne abbiamo studiati quarantaquattro (33 uomini / 11 donne, età media 55 anni, di cui 18 infettati da HBV, 11 coinfezioni HBV/HCV e 15 coinfezioni HBV/HDV). I pazienti al momento del trapianto presentavano valori di viremia minori di 10^5 copie/ml (sistema Branched bDNA. Bayer) e minori di 6×10^2 copie/ml (Amplicor Roche). Tutte le agobiopsie all'arrivo in laboratorio, sia quelle conservate con terreno RPMI 1640 (Gibco. Invitrogen) e con Formalina sono state pretrattate con tre lavaggi in Phospa-

SIGLE

cccDNA - covalently closed circular DNA
 HBV - Hepatitis B virus
 PCR - Polymerase Chain Reaction
 HCV - Hepatitis C Virus
 FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer
 HBsAg - Hepatitis B surface Antigen
 PBS - Phosphate Buffer Saline
 HBcAg - Hepatitis B core Antigen
 HBIG - Hepatitis B immune globulin
 DR - Direct Repeat

te Buffer Saline (PBS) sterile a temperatura ambiente, prima di essere conservate a -80°C . Successivamente sono state congelate e si è proceduto all'estrazione del DNA virale attraverso il Kit (**QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA blood Mini Kit. Qiagen**). A seguire i 50 μl di eluato di ciascun campione estratto sono stati destinati per la ricerca del cccDNA, riscaldando a 75°C per 5 minuti ed immediatamente posti in ghiaccio per 3-5 minuti. Il DNA è stato poi digerito con 25 Unità di DNasi ATP-dipendente di Plasmid Safe (**Epicentre Technologies, Madison, WI**) per 1 ora a 37°C in presenza di buffer 1X (33 mM Tris-acetato Ph 7.8, 66 mM di acetato di potassio, 10 mM di acetato di magnesio e 0.5 mM di DTT) ed 1 mM di ATP. Trascorsa l'ora il tutto è stato centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto, per poi raccogliere l'eluato, per poi purificare il tutto (**GFX PCR DNA and gel band purification Kit Amersham Biosciences**) e infine si è proceduto all'amplificazione. Il LightCycler è uno strumento che consente di effettuare analisi in real-time PCR: le sedute prevedono un'amplificazione dell'acido nucleico (DNA) e contemporanea rivelazione con monitoraggio a video in tempo reale. Grazie all'utilizzo di capillari di vetro borosilicato e allo scambio termico tramite aria, i tempi totali di reazione sono estremamente ridotti (40-60 minuti). La rivelazione si basa sulla lettura in tempo reale della fluorescenza emessa dai prodotti di amplificazione, direttamente nel capillare. La lettura avviene ad ogni ciclo su sei canali di lettura: utilizzando sonde marcate con fluorofori diversi (nei nostri esperimenti, LC-Red 640 e LC-Red 705) il cui principio di funzionamento è quello delle sonde FRET, (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Il plasmide pAM6 è stato utilizzato come standard positivo di quantificazione attraverso diluizioni seriali (ottenendo un range di linearità da $4,5 \times 10^1$ a $4,5 \times 10^5$ copie/reazione) ed è stato acquistato presso l'American Type Culture Collection (ATCC n° 45020. 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 USA), il cui depositario è William H. Hoyer.⁽⁵⁾ Codesto plasmide ha una dimensione di 7,5 Kilobasi (Kb). L'inserto (3,2 Kb) contiene l'intera sequenza del genoma HBV inserita all'interno del vettore pBR322 (4,36 Kb). Il plasmide pAM6 è stato quantificato spettrofotometricamente ed il numero di copie è stato calcolato basandosi sul peso molecolare del plasmide e sulla densità ottica. Come controllo positivo d'estrazione abbiamo amplificato il DNA del gene housekeeping Beta-Actina, presente nelle cellule dei frustoli epatici. Come controlli negativi sono stati utilizzati, biopsie di pazienti negativi per l'antigene HBsAg, di contro

come controlli positivi sono state utilizzate biopsie di pazienti positivi per l'antigene HBsAg. Il saggio di real-time PCR ci ha permesso di quantificare in forma accurata il cccDNA nelle biopsie epatiche e i risultati mostrano che l'amplificazione può essere raggiunta a partire da quantità di tessuto epatico molto basse, in aggiunta la possibilità di usare un sistema di digestione ATPasi permette di differenziarlo rispetto alle altre isoforme. Attraverso diluizioni seriali del plasmide pAM6 si sono ottenute curve standard con un range di linearità da $4,5 \times 10^1$ a $4,5 \times 10^5$ copie/reazione. Dopo aver stabilito la specificità e la sensibilità analitica del saggio di real-time PCR, abbiamo valutato la presenza del cccDNA nelle biopsie epatiche dei quarantaquattro pazienti (trentatré uomini/ undici donne, età media 55 ± 9). Tutti i pazienti erano positivi per l'antigene HBsAg prima del trapianto, quarantadue erano HBeAg negativi, due HBeAg positivi, undici erano coinfectati con il virus dell'epatite C (HCV) e quindici con il virus dell'epatite D (HDV). Diciannove pazienti dopo il trapianto hanno ricevuto per via endovenosa le immunoglobuline (HBIG) da sole, mentre venticinque di loro oltre che con le immunoglobuline sono stati trattati con l'analogo nucleosidico Lamivudina (100 mg/giorno). Il follow-up dei pazienti dopo il trapianto è durato in media 88.3 mesi. Delle 44 biopsie processate: 43 risultano essere undetectable per il cccDNA (< 45 cp/mg), ad eccezione di una con un valore pari a 3.43×10^3 copie/mg. Allo stesso tempo, codesta biopsia risultava essere positiva al I° Round della PCR Nested per la ricerca del DNA del gene S. In aggiunta due biopsie negative al cccDNA, mostravano essere positive al II Round della PCR Nested, sempre per la ricerca del DNA del gene S. Questo risultato può essere spiegato in parte al fatto che la PCR Nested è un sistema di PCR altamente sensibile ed i primers disegnati riescono ad amplificare tutte e tre le isoforme del virus eventualmente presenti (RC, cccDNA e dsDNA). Di contro, i primers e i probes per la ricerca del cccDNA mappano sui punti di chiusura Direct Repeat (DR1 e DR2) del genoma circolare superavvolto di HBV e sono dunque capaci solo di discriminare tale isoforma. Poiché i dati della PCR Nested sono stati confermati tramite sequenziamento, la possibilità di avere ambedue i sistemi, di cui uno più specifico e l'altro più sensibile, ci potrebbe permettere in futuro di valutare la corretta e completa eradicazione del virus a livello epatico. Il principale risultato del presente studio è che, dopo un follow-up di oltre sette anni, non c'è evidenza della persistenza del cccDNA nel fegato dei quarantatré pazienti trapiantati che erano

rimasti HBsAg sieronegativi e questo nuovo approccio ha parecchie implicazioni di potenziale rilevanza clinica per la gestione dei trapiantati con infezione da HBV al tempo del trapianto. Primo, esso fornisce per la prima volta un approccio razionale ed un efficace strumento di laboratorio per selezionare quei pazienti in cui la profilassi post-trapianto possa essere interrotta senza che vi sia il rischio di riattivazione della malattia, migliorando di fatto la qualità di vita del paziente. Secondo, l'uso di questa tecnologia può consentire l'identificazione di quei pazienti trapiantati nei quali è necessario adottare una profilassi contro l'HBV molto più stringente di quella correntemente raccomandata. Terzo, l'adozione di questo saggio per la rilevazione del cccDNA nel fegato come guida per continuare o interrompere la profilassi post-trapianto potrebbe determinare una drammatica riduzione dei costi derivanti dall'uso di immunoglobuline HBIg (con o senza analoghi nucleosidici), i quali gravano tremendamente sul sistema sanitario nazionale. In conclusione noi abbiamo dimostrato che i pazienti trapiantati, sottoposti ad una profilassi a lungo termine e che non presentavano recidive virali in un periodo medio di sette anni dopo il trapianto, non mostrano evidenza di cccDNA nel loro fegato, come dimostrato con il saggio di real-time PCR. Poiché questi pazienti non hanno segni di riattivazione virale, per essi potrebbe essere considerata la possibilità di interrompere la profilassi post-trapianto.

Bibliografia

1. Ciotti M, Marcuccilli F, Guenci T, Prignano M.G, C.F. Perno. Evaluation of the Abbott RealTime HBV DNA Assay and Comparison to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 Assay in Monitoring Patients with Chronic Cases of Hepatitis B. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):2854-8.
2. Di Paolo D, Tisone G, Piccolo P, Lenci I, Zazza S, Angelico M. Low-dose hepatitis B immunoglobulin given "on demand" in combination with lamivudine: a highly cost-effective approach to prevent recurrent hepatitis B virus infection in the long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation* 2004;77:1203-1208
3. Dumortier J, Chevallier P, Scoazec JY, Berger F, Boillot O. Combined lamivudine and hepatitis B immunoglobulin for the prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation: long-term results. *Am J Transplant* 2003;3:999-1002
4. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; Sep;51(3):581-92
5. Moriarty AM, Hoyer BH, Shih JW, Gerin JL, Hamer DH. Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Apr;78(4):2606-10
6. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Werle-Lapostolle B., Bowden S., Locarnini S., Wursthorn K., Petersen J., Lau G., et al. *Gastroenterology* 126, 7 (2004)
7. Rosenau J, Bahr MJ, Tillmann HL, Trautwein C, Klemmner J, Manns MP, et al. Lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin for prophylaxis of hepatitis B reinfection after liver transplantation. Possible role of mutations in the YMDD motif prior to transplantation as a risk factor for reinfection. *J Hepatol* 2001 Jun;34(6):895-902

Dichiarazione di conflitto di interesse

Gli autori dichiarano di non aver ricevuto alcun finanziamento per il seguente studio e di non avere alcun interesse finanziario nell'argomento trattato o nei risultati ottenuti.

Corrispondenza e richiesta estratti:

TSLM Dott. F. Marcuccilli,
Department Medicine of Laboratory
Unit Molecular Virology
Viale Oxford n°81 - 00133 Rome.
tel+390620908366
fabio.marcuccilli@ptvonline.it