

SEROPOZİTİF VE SERONEGATİF KİŞİLERDE HEPATİT B VİRÜS DNA'SININ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI

Ayşen BAYRAM*, İclal BALCI*

* Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Özet

Bu çalışmada laboratuvarımıza hepatit B öntanısı ile başvuran hastalarda hepatit B virüsü (HBV) göstergelerinin yanı sıra, HBV DNA'nın araştırılması ve çeşitli serolojik profilleri saptanan hastalarda HBV DNA'nın varlığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İlk aşamada ELISA yöntemi ile serolojik profilleri belirlenen serum örnekleri çeşitli gruplara ayrılmıştır. Daha sonra proteinaz K / fenol yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapılan örneklerle PCR tekniği uygulanmıştır. Birinci grupta bulunan HBsAg'ı ve HBeAg'ı pozitif, anti-HBe'si negatif 72 serum örneğinin 55'inde (% 76.38), ikinci grupta bulunan HBsAg'ı ve anti-HBe'si pozitif, HBeAg'ı negatif 108 örnekten 37'sinde (% 34.26), üçüncü grubu oluşturan antiHBc anti-HBc IgG dışındaki bütün serolojik göstergeleri negatif olan 36 örneğin 11'inde (% 30.55) HBV DNA tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak çalışmaya alınan ve bütün serolojik göstergeleri negatif bulunan 30 örneğin ise hiçbirinde HBV DNA saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Hepatit B, HBV serolojisi, HBV DNA, polimeraz zincir reaksiyonu

Summary

THE INVESTIGATION OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN SEROPOSITIVE AND SERONEGATIVE PATIENTS WITH POLYMERASE CHAIN REACTION

The aim of this study was to search for HBV DNA along with hepatitis B virus (HBV) markers and to estimate its presence in patients with various serologic profiles referred to our laboratory with suspicion of hepatitis B infection. First the sera were classified into groups regarding to their serological profiles, which were carried out with ELISA technique. Following the extraction of DNA with proteinase K/ phenol method, PCR technique was applied to the specimen. HBV DNA was detected in 55 (76.38 %) out of 72 in the first group of patients with serological markers positive for HBsAg and HBeAg and negative for anti-HBe. In the second group, positive for HBsAg and anti-HBe and negative for HBeAg, 37 (34.26%) out of 108 were found to be positive for HBV DNA. In the third group, composed of sera only positive for antiHBc IgG, HBV DNA was detected in 11 (30.55 %) of 36 cases. HBV DNA could not be demonstrated in any of the control group composed of 30 seronegative patients.

Key words: Hepatitis B, HBV markers, HBV DNA, polymerase chain reaction

Giriş

Hepatit B son yıllarda başta Dünya Sağlık Örgütü olmak üzere tüm dünyanın en az AIDS kadar önemsendiği ve yakın gelecekte yeryüzünden eradike edilmesi planlanan hastalıkların başında

gelmektedir. Bütün dünyada olduğu gibi, ülkemizin de önemli sağlık sorunlarının başında gelen hepatit B enfeksiyonları ile ilgili yoğun çalışmalar uzun yıllardan beri süregelmektedir. Günümüzde HBV ile ilgili laboratuvar çalışmalarında moleküler biyolojik teknikler kullanılarak HBV DNA'nın araştırılması gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle herhangi bir serolojik gösterge saptanamayan (seronegatif) kişilerden bulaşan posttransfüzyonel hepatit B olgularında ve HBV mutantları ile meydana gelen hepatit enfeksiyonlarında enfeksiyonun tek göstergesinin HBV DNA olduğunun kanıtlanması bu çalışmaların hız kazanmasına yol açmıştır. Çalışmamızın amacı, laboratuvarımıza hepatit B öntanısıyla başvuran hastalarda HBV'ye ait serolojik profillerin yanı sıra HBV DNA'yı araştırarak, çeşitli serolojik göstergelerin pozitif ya da negatif bulunduğu durumlarda HBV DNA'nın varlığının önemini değerlendirmektir. HBV DNA'nın tespit edilmesiyle serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda tanıya gidilmesinin yanı sıra, hastalığın prognozunun ve antiviral tedavinin etkinliğinin izlenmesi gibi hayati önemi olan işlemler de gerçekleştirilebilecektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına 1998-1999 yılları arasında hepatit B öntanısı ya da taraması amacıyla başvuran hastaların serumları dahil edilmiştir. Serum örneklerinde HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe ve anti-HBc IgG göstergeleri mikro ELISA ve EIA yöntemleri ile ticari kitler (Bioelisa, Biokit S.A., Spain ve IMX System, Abbott Diagnostics, USA) kullanılarak, üretici firmaların önerdiği yöntemlerle araştırılmıştır.

Hastalar belirlenen serolojik profillerine göre çeşitli gruplara ayrılmışlar, tüm serolojik göstergeleri negatif bulunan örnekler ise kontrol grubu olarak ele alınmışlardır. Serum örneklerinde HBV DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. PCR uygulaması öncesinde örneklerden proteinaz K-fenol yöntemi ile ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ürünler çoğaltma karışımı konmuş tüplere aktarıldıktan sonra "thermal cycler" cihazında (Personal Cycler 20, Biometra, U.S.A.) amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda HBV S genine ait primerler (5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCC-3' ve 5'-CATCTTCTTGTTGTTTTCTCTG-3') kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi sonrası elde edilen PCR ürünleri etidyum bromid içeren agaroz jele applike edilerek yatay elektroforezde 120-130 V akım verilerek 20-30 dakika yürütülmüştür. Oluşan bantlar jelin transillüminatörde (Vilber Lourmat, Torcy, France) ultraviyole (UV) ışığı altında izlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu bantlarının beklenen boyda olduğuna moleküler ağırlık markörünün (FX174 DNA, HaeIII Digest, Boehringer Mannheim) bantları ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.

Bulgular

Hastaların 216'sında B tipi hepatit enfeksiyonunu düşündüren çeşitli serolojik profiller mevcut olup, bu hastalar serolojik profillerine göre üç gruba ayrılarak çalışmaya alınmıştır. Buna göre; HBsAg'i, HBeAg'i ve anti-HBcIgG'si (antiHBc total) pozitif bulunan hastalar birinci grup, HBsAg'i, anti-HBe'si ve anti-HBc IgG'si pozitif olanlar ikinci grup olarak belirlenmiştir. Anti-HBc IgG'si pozitif, bunun dışındaki diğer serolojik göstergeleri negatif bulunan hastalar ise üçüncü grup olarak ele alınmışlardır. Bütün serolojik göstergeleri negatif bulunan 30 serum örneği ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 1).

Birinci grupta bulunan HBsAg (+), HBeAg (+), antiHBe (-), antiHBcIgG (+) 72 olgunun 55'inde (% 76.38), HBV DNA pozitif bulunmuştur. İkinci grupta yer alan HBsAg (+), HBeAg (-), anti-HBe (+), anti-HBc IgG (+) 108 hastanın 37'sinde (% 34.26) HBV DNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Anti-HBc IgG dışındaki tüm serolojik göstergeleri negatif bulunan 36 "izole anti-HBc" olgunun 11'inde (% 30.55), HBV DNA pozitif olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan ve tüm serolojik belirleyicileri negatif bulunan 30 serum örneğinin hiçbirinde HBV DNA varlığı tespit edilmemiştir (Tablo 2).

Çalışmada elde edilen sonuçlar chi square (χ^2) istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Çalışılan hasta grupları içerisinde birinci grup HBV DNA'nın tespit edilme sıklığı açısından ikinci ve üçüncü gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). İkinci ve üçüncü gruplarda bulunan hastalar arasında HBV DNA'nın tespiti açısından istatistiksel bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Tartışma

Ülkemizde 1972 yılından beri donörler, normal popülasyon ve risk grupları arasında yapılan çok sayıda çalışmanın sonuçlarına göre HBsAg seroprevalansı bölgeden bölgeye değişmek üzere % 3.9 - 12.5 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar yurdumuzda 4 milyon civarında taşıyıcı bulunduğunu göstermektedir ki bu rakam gelişmiş ülkelere oranla oldukça yüksektir (1).

HBsAg ile birlikte serumda HBeAg'nin saptanması aktif replikasyonun ve enfektivitenin kanıtı olarak ele alınmakta ve bu tip örneklerde genelde HBV DNA varlığına rastlanmaktadır. Kronik hepatit B veya asemptomatik taşıyıcı gibi HBsAg pozitif vakalarda serumun enfeksiyözitesini saptamada, antiviral tedavi endikasyonu koymada ve tedaviyi takip ederek hastalığın prognozunu değerlendirmede HBV DNA tespiti en uygun yol olarak gözükmektedir.

Çalışmamızda HBsAg'i ve HBeAg'i birlikte pozitif bulunan 72 hastanın 55'inde (% 76.38) PCR yöntemi ile HBV DNA tespit ettik. Elde ettiğimiz bu sonuç HBeAg pozitifliği ile HBV DNA pozitifliği arasında paralellik olduğunu göstermektedir ve literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur (2 - 4).

HBeAg-anti-HBe serokonversiyonunu takiben olguların büyük bölümünde virüs replikasyonunun bittiği kabul edilmektedir. Anti-HBe'nin nispeten düşük enfektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğinin bir göstergesi olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle bazı çalışmalarda duyarlı PCR tekniği ile antiHBe ve HBV DNA'nın birlikte pozitif bulunduğu gösterilmiştir (5). Pawlotsky ve arkadaşları (6) inceledikleri olguların %82'sinde, Heper ve arkadaşları (7) olguların %32'sinde anti-HBe ve HBV DNA'yı birlikte pozitif bulmuşlardır. Bu durum anti-HBe pozitif olgularda serokonversiyondan sonra da replikasyonun devam ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz HBeAg'i negatif, HBsAg'i ve anti-HBe'si pozitif olan 108 hasta serumundan 37'sinde (%34.26) HBV DNA pozitif bulunmuştur. Bu sonuç HBsAg'i ve antiHBe'si pozitif olan hastalarda HBV DNA'ya bakılmasının hastalığın prognozunu değerlendirmede önemli bir kriter olduğunu göstermektedir.

Anti-HBc IgG HBsAg taşıyıcılarında yüksek titrede bulunur, yıllarca hatta hayat boyu pozitif kalabilir. Hepatit B enfeksiyonunun tanısında serumda anti-HBc IgG'ye (anti-HBc) tek başına rastlanması "olağan dışı serolojik profil" olarak adlandırılmasına rağmen, çok ender görülen bir olay değildir. Badur (8) İstanbul'da incelediği 760 kan donörünün %11.6'sında, Akbak (9) Ankara'da incelediği sağlıklı çocukların %2.5'inde tek başına anti-HBc varlığı saptamışlardır. HBsAg'nin saptanamayacak düzeyde var olduğu kronik enfeksiyonlar, HBV antijenlerine karşı hümmoral immün yanıtta bir bozukluk ya da diyabetliler ve kronik böbrek hastalarında sık görülen bir durum olan anti-HBs oluşturmama söz konusu olduğunda serumda sadece anti-HBc oluşur (10, 11).

Çalışmamızda anti-HBc dışındaki tüm serolojik göstergeleri negatif bulunan 36 serum örneği HBV DNA yönünden incelenmiştir. Tek başına anti-HBc'si pozitif olan 36 vakanın 11'inde (% 30.55) HBV DNA PCR yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuç Neifer ve arkadaşları (12) ile Joller ve arkadaşlarının (13) bu tür olgularda yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarına (sırasıyla % 36 ve % 39) göre bir miktar düşüktür. Bu durumun çalışmamızda ele aldığımız tek başına anti-HBc olumlu vakaların, yalancı pozitifliklerin elimine edilmesi amacıyla tekrarlanan ya da indirgeyici testlere tabi tutulmamış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak değerlendirdiğimiz ve HBV'ye ait bütün serolojik göstergeleri negatif bulunan 30 serum örneğinden hiçbirisinde HBV DNA tespit edilmemiştir. Sonuç olarak zaman içinde gittikçe geliştirilen ve duyarlılıkları her gün daha da artan laboratuvar yöntemleri enfeksiyon hastalıklarının tanısında karanlıkta kalan kısımları aydınlatmaktadır. PCR tekniği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar HBV enfeksiyonlarının tanı kriterlerinin 1990'lı yıllara dek kabul edilenden çok daha farklı seyredebileceğini kanıtlamıştır. Bu duyarlı yöntemlerin

geliştirilmesi ile HBeAg'nin replikasyon kriteri olarak görülmesi ve anti-HBs'nin belirmesiyle birlikte replikasyonun sonlanması gibi klasik birtakım bilgilerin zaman içinde değişebileceği görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yenen OŞ: Hepatit B, "A Willke Topçu, G Söyletir, M Doğanay (eds), İnfeksiyon Hastalıkları, 1.Baskı" Kitabında s 664-692, 1996, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
2. Badur S: İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında PCR, "A Willke, S Ünal, M Doğanay (eds), 7.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Ürgüp, 11-15 Eylül 1994" Kitabında s 49-61, 1994, Kent Matbaacılık, Ankara.
3. Ljunggren KK, Nordenfelt E, Kidd A: Correlation of HBeAg/Anti-HBe, ALT levels and HBV DNA PCR results in HBsAg positive patients. J Med Virol, 1993, 39:297-302.
4. Tansuğ Ş, Ünal Z, Düzgünsıvacı E, Güvel H: HBsAg pozitif olgular ve bu olgularda HBV DNA düzeylerinin değerlendirilmesi, "IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu" Program ve Kongre Kitabında s 147, 1998, Ankara.
5. Kurt H: HBV enfeksiyonu; klinik bulgular, "Kılıçturgay K (ed), Viral Hepatit'98 1.Baskı" Kitabında s101-106, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
6. Pawlotsky JM, Bastie A, Lonjon I, et al.:What technique should be used for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples? J Virol Meth, 1997, 65:245-253.
7. Heper S, Mistik R, Özakin C, Töre O: Hepatit B virüs (HBV) markerleri ile HBV DNA ilişkisi: Bursa bölgesi sonuçları. Viral Hepatit Derg,1999, 5: 137-139.
8. Badur S: Posttransfüzyon hepatit sorunu. Türk Mikrobiol Cem Derg, 1991, 21:234.
9. Akbak M: Çocukluk yaş grubunda hepatit B seroprevalansı, risk faktörleri, bulaşma yolları ve HBV seropozitif çocuklarda aile taraması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 1996, Ankara.
10. Badur S: Hepatit B virüsü (HBV) moleküler viroloji ve serolojik tanı, "K. Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit '94, 1. Baskı" Kitabında s 65-90, 1994, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
11. Bilgiç A, Erensoy S: Viral hepatitlerde alışlagelmışin dışında serolojik profiller. III. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu (7-9 Kasım 1996, Ankara)'nda Atölye Çalışması. Viral Hepatit Derg, 1998, 4(1):63-79.
12. Neifer S, Molz B, Sucker U, Kreuzpaintner E, Weinberger K, Jilg W: High percentage of isolated Anti - HBc - positive persons among prisoners. Gesundheitswesen, 1997, 59(6):409-412.
13. Joller Jemelka HI, Wicki AN, Grob PJ: Detection of HBs antigen in "Anti-HBc alone" positive sera. J Hepatol, 1994, 21(2):269-272.