

SERUMDA HEPATİT B VİRUS (HBV) DNA'SININ PCR YÖNTEMİ İLE TARANMASI VE HBV SEROLOJİK GÖSTERGELERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI

Zühal Aşçı*, Ayhan Akbulut**, Mehmet Z. Doymaz*, Süleyman Felek**, S. Sırrı Kılıç**

ÖZET

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) gibi moleküler biyolojik yöntemlerin kullanıma girmesi ile 1970 li yıllardan beri Hepatit B prognozunun takibi ve kronik aktif hepatit B tedavisine başlama da kriter kabul edilen serolojik göstergelerin yorumlanması tartışılır olmuştur. Bu çalışmada; bölgemizde PCR yöntemi ile HBV DNA çalışmalarının başlamasını sağlamak ve HBV DNA sonuçları ile, Enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) yöntemiyle elde edilen HBV serolojik göstergeleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

Enzyme immuno assay yöntemiyle HBsAg pozitif bulunan 130 serum örneğinde Proteinaz K/Fenol ekstraksiyonu yöntemi ile HBV DNA araştırılmıştır.

EIA ile HBsAg pozitif bulunan 130 serum örneğinin 55'inde (% 42.3) PCR ile HBV DNA pozitif bulundu. HBeAg (+) HBe (-) 44 serum örneğinin 40'ında (% 90.9) HBeAg (-), anti-HBe (+) 66 serum örneğinin 10'unda (% 51.1) HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca HBeAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmasına rağmen ($p < 0.00001$) HBeAg (+) olan 56 serum örneğinden 12'sinde (% 21.4) HBV DNA (-) HBeAg (-) olan 74 serum örneğinin 11'inde (% 14.9) HBV DNA (+) bulunmuştur.

Sonuç olarak; HBV enfeksiyonu prognozunun takibinde ve kronik hepatit B tedavisinde kriter olarak serolojik göstergeler yanında, mutlaka HBV DNA sınır da bakılmasının daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virusu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SUMMARY

Evolution of DNA of Hepatitis B virus in serum by PCR and comparison with the serological parameters of (HBV)

With the introduction of molecular biological techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR) into the routine applications, importance and relevance of serological assays in following the prognosis and treatment regimens of Hepatitis B Virus infections started to be debated. In this study, the results of PCR analysis performed to test the presence of HBV viral DNA in serum of Hepatitis B virus surface antigen positive subjects and comparison of PCR analysis with serological markers were reported.

DNA of Hepatitis B Virus was investigated by proteinaz K/phenol extraction method in 130 HBsAg positive sera tested via micro enzyme immuno assay method.

Accordingly, in 44 HBeAg positive, anti-HBe negative samples, 90 % (40 samples) were positive for HBV viral DNA whereas 15.1 % of anti HBe positive, and HBeAg negative samples contained HBV viral DNA sequences. There was statistical correlation between HBeAg and viral DNA ($p < 0.00001$). Twenty one percent of 56 HBeAg (+) samples did not contain HBV viral DNA while 14.5 % of 74 HBeAg (-) had HBV viral DNA.

In conclusion, to obtain a detailed information about the prognosis and effect of the treatment regimen in HBV infections PCR analysis of viral DNA along with serological markers should be advised.

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

GİRİŞ

HBV insanlarda akut hepatit, kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıkların nedenidir. 1970'li yıllardan sonra HBV ile ilgili infeksiyonların laboratuvar değerlendirilmelerinde HBV'nin antijenik yapıları ve bunlara karşı oluşan antikorlar araştırılmaya başlanmıştır (1,2).

HBV'nin HBsAg, HBcAg, HBeAg olmak üzere üç antijeni vardır. HBsAg virus yüzey antijenidir, serumda bulunur. HBcAg kor antijenidir ve genellikle serumda bulunmaz, hepatositler içinde bulunur. HBeAg virus partiküllerinde yer almaz, HBV ile infekte hepatosit yüzeyine ve seruma sekrete edilir. HBeAg'nin serumda bulunması; önceleri viral partiküllerin, DNA polimerazın ve HBV DNA'nın serumda bulunduğu (replikasyonun) bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. HBsAg'ye karşı anti-HBe'nin oluşması ile iyileşmeye gidişin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (2).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu 1983'de düşünülen ancak 1990 yıllarında kullanıma giren, nükleik asitlerin çoğaltılması esasına dayanan diagnostik bir testtir. PCR, düşük titrede viremi olsa bile, onu ortaya çıkarabilecek kadar duyarlıdır (3, 4).

Bu çalışmada; hem bölgemizde PCR yöntemi ile HBV DNA çalışmalarının başlamasını sağlamak hem de HBV DNA sonuçları ile, EIA yöntemiyle elde edilen HBV serolojik göstergeleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ile Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında EIA ve HBV serolojik göstergeleri saptanan HBsAg olumlu 130 serum örneğinde PCR yöntemi ile HBV DNA araştırılmıştır.

EIA testi: HBV serolojik göstergeleri mikro-enzim immün assay (EIA) yöntemiyle ticari kitler kullanılarak (Organon Technika, Hollanda) araştırılmıştır.

PCR yöntemi: HBsAg olumlu serum örneklerinde HBV DNA, Proteinaz K/Fenol ekstraksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır (5).

Serumda DNA Ekstraksiyonu

1,5 ml lik Eppendorf mikrosantrifüj tüplerinin içine 500 µl K tamponu (20 mM Tris pH: 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2 SDS, 10 mg Pronase (ml)

ve 100 ml hasta serumu, pozitif kontrol (su: Sigma Distiled Water) bırakıldı, 30 sn vortekslendi, iki saat 37°C'de benmaride inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüplerinin üzerine fenol-kloroform (1:1) 600 µl eklenerek 30 sn vortekslendi. Mikrosantrifüj'de (16000 x g) 5 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz alınarak tekrar fenol-kloroform ekstraksiyonu yapıldı (İki veya 4 kere tekrarlandı). En son elde edilen sıvı faz üzerine 50 µl 3 M sodyum asetat ve 500 µl soğuk etanol eklenerek 30 sn vortekslendi, bir gece -20°C'de bekletildi. Daha sonra 15 dk mikrosantrifüj (16.000 x g) yapıldı, sıvı faz döküldü üzerine % 70'lik soğuk etanol eklendi. Tekrar 15 dk. mikrosantrifüj (16.000 x g) yapıldıktan sonra üstteki sıvı dökülerek elde edilen çökelti kendiliğinden kurumak üzere ters çevrildi. Çökelti kuruduktan sonra 100 µl TE buffer (10 mM Tris pH: 8.0 1mM, EDTA) ile süspansiyonları yapıldı.

PCR amplifikasyonları

0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içine sırasıyla solüsyonlar eklendi:

10 µl DNA içeren çözelti, 5 µl primer 1 (20 pm/ml stoktan), 5 µl primer 2 (20 pm/ml stoktan), 16 µl dNTP mix (1.25 mM herbirinde), 10 µl BSA (1 mg/ml), 10 ml MgCl₂ (2.5 mM), 10 µl 10 x Taq buffer, 33 m steril distile su, 1 Taq (minimum 2 ünite). mikrosantrifüj tüplerinin en üstüne ise 50 µl mineral oil ilave edildi. Kullanılan primer setleri yüzey antijenini kodlayan genin 328. ve 587. bazları arasındaki 259 bazlık bir bölümü amplifiye etmek üzere seçilmişlerdir (4). Primer 1: 5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3' ve Primer 2: 5- AAA GCCC CTG CGA ACC ACT GA-3 baz sırasına sahiptir. Amplifikasyon için kullanılan solüsyonlar Stratagene firmasından sağlanmıştır.

Reaksiyon için otomatik thermal-cycler kullanıldı. Thermal-cycler içine yerleştirilen mikrosantrifüj tüpleri 95°C'de 2 dk (denatürasyon) 55°C de 2 dk (bağlanma) ve 72°C de 2 dk (uzama) olmak üzere 30 siklusa tamamlanacak şekilde inkübe edildi. 259 bp amplifikasyon ürününü görüntülemek amacıyla agaroz-jel elektroforezi ile DNA'ların varlığı araştırıldı. Her numuneden 10 µl alınıp üzerine 3 µl yükleme tamponu eklenerek % 1 lik agaroz -jel'in (7.5 µl 5 x TBE = (54 gr Tris, 27.5 gr. borik asit, 20 µl 0.5 M EDTA pH: 8.0) + 67.5 dH₂O x 0.75 agaroz + 10 µl etidyum bromid (10 mg/ml) tarak boşluklarına eklendi. Amplifiye edilmiş karışım 150 V'da elektroforez edildi. Etidyum bromid ile boyanan DNA bantları UV monitor ile görüntüldü (Resim 1). İstatistiksel analizlerde bu iki gr-

bun karşılaştırmasında ki kare testi kullanıldı.

BULGULAR

HBsAg (+) 130 hasta serum örneğinin 55'inde (% 42.3) HBV DNA pozitif bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. HBsAg (+) serumlarda HBV DNA sonuçları

	HBsAg n	(+) %
HBV DNA (+)	55	42.3
HBV DNA (-)	75	57.7
Toplam	130	100

HBeAg pozitifliği ile HBV DNA pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak HBeAg (+) 12 (% 21.4) serum örneğinde HBV DNA bulunamamış, HBeAg (-) 11 (% 14.9) serum örneğinde HBV DNA pozitif bulunmuştur (Tablo 2).

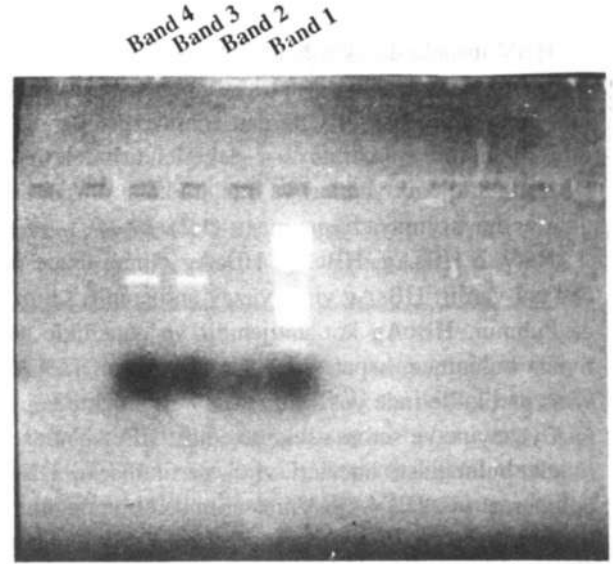
Tablo 2. HBeAg pozitifliği ile HBV DNA arasındaki ilişki

HBV DNA	HBeAg +		HBeAg -	
	n	%	n	%
HBV DNA (+)	44	78.6	11	14.9
HBV DNA (-)	12	21.4	63	85.1
Toplam	56	100	74	100

HBeAg (+) anti-HBe (-) serumlarda % 90.9'i HBeAg (-) anti-HBe (+) % 15.1; HBeAg (-) anti-HBe (-) 8 serum örneğinden 1 (% 12.5)'inde HBV DNA pozitif bulunmuştur (Tablo 3)

Tablo 3. HBsAg olumlu örneklerde HBV DNA ile HBeAg ve anti-HBe arasındaki ilişki

HBeAg	HBV DNA +		HBV DNA -		Toplam
	n	%	n	%	
HBeAg+ anti-HBe -	40	90.9	4	9.1	44
HBeAg - anti-HBe+	10	15.2	56	84.8	66
HBeAg+ anti-HBe +	4	33.3	8	66.7	12
HBeAg + anti-HBe+	1	12.5	7	87.5	8



Resim 1. PCR'da çoğaltılmış HBV DNA bantlarının UV monitör ile görüntüsü.

- Band 1, Qx 174 hae III Marker
- Band 2, Negatif kontrol
- Band 3, Pozitif kontrol
- Band 4, Hasta serumu

TARTIŞMA

Hepatit B virus infeksiyonunun tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik göstergelerden HBeAg ve anti-HBe, değerlendirilmelerindeki değişiklikler nedeniyle, son yıllarda daha da önemli olmuştur. HBeAg pozitifliği hem kronik ve fulminan hepatitle seyretmesi açısından hastanın kenetisi, hem de bulaştırıcı olması açısından çevresi için önemli sayılmış, anti-HBe (+) hastaların gerek klinik, laboratuvar ve histolojik değerlendirmeleri, gerekse PCR ile HBV DNA tesbiti bu yorumlamanın yanlış olduğunu ortaya çıkarmıştır (3-6).

HBeAg'nin gerçek fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, konağın HBV'ye karşı immun cevabını kontrol ettiği sanılmaktadır. Özellikle HBV'de prekor mutasyonu olduğunda HBeAg sentezlenemez. Böylece virusun konağın HBeAg aracılığıyla oluşturduğu sitotoksik cevaptan kurtulup yaşamını sürdürdüğüne ve replikasyon devam ettiğine inanılır. Ancak HBeAg'nin kaybolması HBV DNA'sında belirgin bir azalma da oluşturur (1, 2, 7, 8). Kronik HBV infeksiyonu tedavisinde interferon kullanımına HBeAg (-) viruslar

oluşmadan başlanmasının, tedavi oranını artıracığı belirtilmektedir (1).

HBsAg ya 22 nm lik küresel ve tübüler partiküllerden ya da 42 nm lik içinde kor bölgesini de içeren büyük partiküllerden oluşur. Eğer kor bölgesi içeren büyük partiküller var ise infeksiyolur ve virus içerir (2, 9).

İzmir'de yapılan bir çalışmada HBsAg olumlu 302 serum örneğinin 138'inde (% 45.7) sıvı hibridizasyon yöntemi ile HBV DNA pozitif bulunmuştur (10).

Çalışmamızda da % 42.5 oranında HBV DNA pozitif bulunmuştur. Tespit edilemeyenlerin HBV genomu içermeyen antijenik yapılara bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Hindistan'da yapılan bir çalışmada HBeAg pozitif 12 serum örneğinin tamamında, anti HBe pozitif 23 serum örneğinin 14'ünde (%60.9) HBeAg ve anti-HBe negatif 25 serum örneğinin 13'ünde (% 52) HBV DNA pozitif bulunmuştur (11).

Malatya'da yapılan bir çalışmada ise; HBeAg pozitif 18 serum örneğinin tamamında, anti-HBe pozitif 62 serum örneğinin 7'sinde (% 11.2) PCR ile HBV DNA tespit edilmiştir (12).

İzmir'de sıvı hibridizasyon yöntemi ile yapılan HBV DNA araştırmasında; HBeAg pozitif, anti-HBe negatif hastaların % 90.6'ında HBeAg negatif, anti HBe pozitif hastaların % 20'sinde HBV DNA pozitifliği tespit edilmiştir (10).

Japonya'da yapılan bir çalışmada; HBeAg (-), anti-HBe (+) 19 asemptomatik HBV taşıyıcısının tamamında PCR ve Hibridizasyon teknikleri ile HBV DNA tespit edildiği, bu hastaların tamamında prekor mutasyon, 17'sinde de (% 87.3) X gen bölgesinde mutasyonlar tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada prekor mutasyonun virus için kurtuluş mutasyonu olduğu, X gen bölgesindeki mutasyonların ise replikasyonu azalttığı belirtilmiştir (13).

Çalışmamızda HBeAg (+) anti-HBe (-) serumlarda % 90.6, HBeAg (-) - anti HBe (+) serumlarda % 15.1, HBeAg (-)- anti-HBe (-) 8 serum örneğinden 1 (% 12.5) inde HBV DNA pozitif bulunmuştur. Çalışmamız sonuçları İzmir'de yapılan çalışma sonuçlarına benzerdir. Bu sonuçlar bizlere bölgemizde de mutant suşların varlığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak; HBV infeksiyonu prognozunun takibinde ve kronik hepatit tedavisinde kriter olarak serolojik göstergeler yanında, mutlaka HBV DNA'nın da

bakılmasının daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kılıçturgay K: Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Derg.* 1995 1: 1-7.
2. Badur S: Hepatit B virusu (HBV) moleküler viroloji ve serolojik tanı. K. Kılıçturgay (ed). "Viral Hepatit 94" Kitabında s, 65, 1. Baskı 1994. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
3. Brehot C: Polymerase Chain reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. *J Hepatol* 1993; 17 (Suppl 3): 35-41.
4. Türkoğlu S, Badur S: Infeksiyon Hastalıkları Tanısında PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* Yayımlı No: 22 S.11, 1995, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul
5. Yakusuka O, Taguwa M, Omata M: PCR detection hepatitis B virus. "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TS (Eds), *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications.*" Kitabında p. 332, 1993, American Society for Microbiology, Washington DC
6. Durmaz R: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve mikrobiyolojide kullanımı *Mikrobiyolo Bülteni* 1995; 29: 304-320.
7. Krassgard K, Wartzin P, Aldershuhile J, Kroyger P, Anderson P, Nielsen J O: Hepatitis B virus DNA in HBsAg positive blood donors: relation to the HBe system and outcome in recipients. *J Infect Dis* 1986; 153: 298.
8. Marugama T, Lino S, Koike K, Yasuda K, Milich DR: Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1993; 105: 1141.
9. Robinson WS: Hepatitis B and hepatitis delta virus, "Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (ed), "Principles and Practice of Infectious Disease" Kitabında p. 1001, 1990, Wiley Medical Publications, New York.
10. Erensoy S, Özacar T, Zeytinoğlu A, Anda B, Bilgiç A: Serumda Hepatit B Virus DNA'sının (HBV DNA) Hepatit B virus (HBV) serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. *Infekt Derg.* 1995; 9 (1-2): 157-160.
11. Gupta BP, Jayasuryan N, Jameel S: Direct detection of hepatitis B virus from dried blood spots by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 1992 30 (8): 1913-16.
12. Sönmez E, Durmaz R, Kızılkaya N, Özbilge H, Günel S, Yoloğlu S: HBV DNA'sının iki ayrı PCR yöntemi ile taranması ve sonuçlarının serolojik göstergelerle karşılaştırılması. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı, s: 176, 1996.
13. Fukuda R, Thanh NX, Ishimura N, et al. X gene and pre-core region mutations in the Hepatitis B virus genome in persons positive for antibody to hepatitis B_e antigen: Comparison between asymptomatic "Healthy" carriers and patients with severe chronic active hepatitis. *J Infect Dis*, 1995, 172, 1191-1197.