

HEPATİT B VİRUS (HBV) DNA'SININ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) VE HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Serpil TUNCAY YETİŞKUL, Faruk AYDIN, Kıvanç ÇUBUKÇU, Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, Yelda YAZICI, Ali Osman KILIÇ

ÖZET

Bu çalışmada Hepatit B virus yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olan 44 serum örneğinde HBV-DNA varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve hibridizasyon yöntemleri ile araştırılarak iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldı. Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile DNA izolasyonundan sonra PCR yapılan örneklerin % 68.18'inde HBV-DNA pozitifliği tespit edildi. Hibridizasyon yöntemi ile ise HBV-DNA %56.81 oranında pozitif bulundu. Hibridizasyon ile negatif saptanan 19 serum örneğinin 5'inde PCR ile HBV-DNA saptandı.

Sonuç olarak, HBsAg pozitif olan hastaların daha ucuz ve hassas bir yöntem olan PCR ile taranmasının, bunu takiben tedavi planlanan olgularda biyokimyasal ve klinik kriterler göz önünde bulundurularak viral yükteki değişikliklerin takibinde kantitatif hibridizasyon yönteminin kullanılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: HBV-DNA, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Hibridizasyon

SUMMARY

DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) DNA BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND HYBRIDIZATION METHODS

In this study, HBV DNA was investigated in Hepatitis B Virus surface antigene (HBsAg) positive sera samples from 44 patients, using both PCR and hybridization methods and the results were compared. After DNA isolation using phenol-chloroform extraction method, HBV-DNA was positive in 68.18% of the sera samples by PCR and 56.81% by Digene Hybrid Capture System. In 5 of hybridization negatif 19 samples, HBV-DNA was detected by PCR.

We concluded that HBsAg positive patients should be first screened by PCR, which is more sensitive and cost effective than hybridization method, followed the changes in viral load may be determined by hybridization for the treatment planning cases according to biochemical and clinical findings.

Key words: HBV-DNA, PCR, Hybridization (Digene Hybrid Capture System)

Giriş

Hepatit B Virus (HBV) insanlarda akut hepatit, kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıklara neden olmaktadır (1). HBV Hepadnavirus familyasında, 42 nm çapında, zarflı, çift sarmal DNA içeren, ikozahedral simetrik bir virus olup, zarfında protein yapıda yüzey antijeni (HBsAg), kor bölgesinde ise revers transkriptaz, RNA bağımlı DNA polimeraz enzimlerini içerir (2). HBV'nin yüzey antijeninden başka diğer iki önemli antijeni kor antijeni (HBcAg) ve e antijeni (HBeAg)'dir (3). HBeAg virus partiküllerinde yer almaz, HBV ile infekte hepatosit yüzeyine ve seruma salgılanır. Önceleri HBeAg'nin serumda bulunması viral partiküllerin, DNA polimerazın ve HBV-DNA'nın serumda bulunduğunun, dolayısı ile replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (4). Son yıllarda, gerek HBV'nin genetik varyasyonlarına gerekse daha duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesine bağlı olarak alışlagelen serolojik profiller dışında tablolar karşımıza çıkmaktadır. HBV antijenlerinin yokluğu veya

HBV'ye karşı oluşan antikorların varlığı enfeksiyonun olmadığını kanıtlamak için yeterli değildir (5). Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve hibridizasyon gibi duyarlılığı yüksek moleküler biyolojik tekniklerin kullanılması, DNA incelemelerini mümkün kılmıştır. Özellikle seronegatif kişilerden bulaşan HBV enfeksiyonlarında, tek göstergenin HBV-DNA olduğu kanıtlanmıştır. HBV-DNA saptanması, viral replikasyonun ve virüsün serumda varlığının en doğru göstergesidir (6).

Çeşitli tanı merkezlerinde farklı primer çiftleri ve farklı protokoller kullanılmaktadır, bu nedenle PCR standart bir yöntem değildir. Halbuki hibridizasyon yöntemi belirli bir standarta sahiptir. Bu çalışmada merkezimizde kullanılan PCR protokolünün hassasiyetinin öğrenilmesi ve hibridizasyon yöntemi ile kıyaslanması amaçlanmıştır.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

Not: XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (8-13 Ekim 2000, Antalya) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya 1 Ocak - 30 Haziran 2000 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na başvuran HBsAg pozitif 44 hastanın serum örneği alındı. EDTA'lı tüp içine alınan yaklaşık 2 ml kan örneğinden ayrıştırılan serum örnekleri çalışma gününe kadar iki ayrı mikrosantrifüj tüpünde -20°C 'de saklandı. Serum örneklerinin bir grubu kalitatif sonuç veren PCR yöntemi ile, diğer grubu kantitatif değerlere ulaşılabilen, sıvı fazda gerçekleşen ve radyoaktif olmayan kemilüminesan moleküler hibridizasyon yöntemi (Digene Hybrid Capture System) ile çalışılarak HBV-DNA varlığı araştırıldı.

PCR yönteminde, serum örnekleri SDS, proteinaz-K, tamponlu fenol, kloroform izoamilalkol (24:1) yöntemiyle ekstrakte edildi. Daha sonra 70 ml Na-asetat (pH 4.9) ilave edildi. Yüzde 96'lık etanol ile -20°C 'de bir gece bekletilerek DNA'nın presipitasyonu sağlandı, %70 etanol ile yıkandıktan sonra 55°C 'de kurutuldu. DNA 20ml TE (10 mM TrisHCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0) içerisinde çözdürüldü ve 10ml'si PCR amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon için 5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3' ve 5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3' primerleri kullanılarak HBsAg gen bölgesinin 329-587 nükleotidleri arasında kalan 259 baz çiftlik bölgesi çoğaltıldı (7). PCR için otomatik thermal-cycler (TECHNE) kullanıldı. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 60 voltta 1 saat yürütüldü, 0.1 g/ml etidiyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole transilluminatörde incelenerek polaroid kamera ile görüntülendi.

Hibridizasyon yönteminde serum örnekleri, Digene Hybrid Capture System ile kit prosedürüne uyularak çalışıldı ve sonuçlar lumino-metrede okundu. Nükleik asit miktar tayini yapılarak mililitrede 5 pikogram ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan 44 serum örneğinin PCR yöntemiyle 30'unda (%68.18), hibridizasyon yöntemiyle 25'inde (%56.81) HBV-DNA pozitif bulundu. Hibridizasyonda 5 pg/ml'nin altında değer ölçülen 19 serum örneğinin 5'i (%26.3) PCR ile pozitif bulundu (Tablo 1).

| Tablo 1: HBsAg pozitif olgularda PCR ve hibridizasyon metodları ile HBV-DNA sonuçları ve birbiri ile ilişkisi | | | | |
|---|--------|---------------|-------------|-------------|
| | | HİBRİDİZASYON | | |
| | | + | - | Toplam |
| | | (>5 pg/ml) | (<5pg/ml) | |
| PCR | + | 25 (%56.81) | 5 (%11.36) | 30 (%68.18) |
| | - | 0 | 14 (%31.81) | 14 (%31.81) |
| | Toplam | 25 (%56.81) | 19 (%43.18) | 44 (%100) |

Tartışma

Çalışmamızda HBsAg pozitif olan serumlarda PCR ile %68.18 oranında HBV-DNA pozitif bulundu. Ülkemizde farklı protokoller kullanılarak yapılan değişik çalışmalarda Aşçı ve arkadaşları (4), HBsAg pozitif serumlarda HBV-DNA pozitifliğini %42.3, Kuştür ve ark. (8) %38 oranında bulmuşlardır. Sönmez ve ark. (6) asemptomatik taşıyıcılarda bu oranı %31.3, Heper ve ark. (9) ise %26.6 olarak bulmuşlardır. HBV-DNA pozitifliği oranlarının bu değişkenliği çalışmaya alınan grupların, farklılığından ve PCR yöntemlerinin standardizasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda HBsAg pozitif olan serumlarda hibridizasyon yöntemi ile HBV-DNA pozitifliği % 56.81 oranında bulundu. Zaaifler ve arkadaşlarının (10) 109 HBsAg pozitif serumda aynı hibridizasyon yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada HBV-DNA pozitiflik oranı % 28 bulunmuştur. Mıstık ve ark. (11) hibridizasyon yöntemi ile pozitiflik oranını %34, Kuştür ve ark. (8) %26, Tansuğ ve ark. (12) ise %13.6 olarak bulmuşlardır.

Hibridizasyon ile negatif bulunan serum örneklerinin %26.3'ü PCR ile pozitif bulundu. HBsAg pozitif örneklerde hibridizasyon negatif iken PCR ile Badur ve ark. (3) %8.5, Kuştür ve ark. (8) ise %16.2, Tekeş ve ark. (13) ise %6 oranında pozitiflik bulduklarını rapor etmişlerdir. Pawlotsky ve ark. (14) yaptıkları çalışmada, hibridizasyon ile negatif bulunan serum örneklerinin %50'sinde PCR ile pozitif sonuç almışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçların aksine Otlu ve ark.'nın (15) yaptığı bir çalışmada hibridizasyon ile %22.8 olan pozitiflik oranı, PCR ile %15.3 olarak saptanmıştır.

HBV-DNA'nın tespiti için değişik moleküler biyolojik teknikler mevcuttur. HBV-DNA düzeyi, HBV enfeksiyonunun antiviral tedavisinin prognozu açısından önemlidir. Antiviral tedavinin amacı, HBV replikasyonunun durdurulması ve daha sonra virusun eradike edilmesidir (10). Serumda HBV-DNA'nın 8 haftadan daha uzun süre hibridizasyon ile saptanması kronikleşme eğilimini, tersi durum iyileşme olacağını yansıtır. Yüksek düzeyli HBV-DNA varlığı, replikasyonun ileri derecede olduğunu ifade eder (16). Tedavi uygulanacak olgularda replikasyonun en kesin göstergesi olan HBV-DNA düzeyinin belirlenmesi önemlidir (10). Hibridizasyon esasına dayanan yöntemlerin kolay uygulanabilme, yüksek özgüllükte olma ve kantitatif sonuç alınabilme gibi üstünlükleri yanında duyarlılıkları düşüktür (17).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, HBsAg pozitif olan hastaların öncelikle PCR ile araştırılması, daha sonra biyokimyasal ve klinik bulgular değerlendirilerek tedavi planlanan olguların kantitasyon için hibridizasyon çalışmasına alınmasının uygun olacağını ortaya koymuştur. Sonuç olarak; laboratuvarlar arası standardizasyon problemlerine rağmen HBV-DNA varlığının araştırılmasında tarama testi olarak en duyarlı tekniklerden biri olan PCR'in kullanılması hem ucuz, hem de hassas olması açısından tercih edilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Kılıçturgay K, Mısıktık R: Türkiye’de viral hepatitler. "K. Kılıçturgay (ed). Viral Hepatit 94, 2. baskı" s 1-14, 1994
- 2- Murray R P, Rosenthal K S, Kobayashi G S, Pfaller M: Hepatitis Viruses ‘Medical Microbiology 3. Baskı’ Kitabında s 523, 1998.
- 3- Badur S: Hepatit B Virus Moleküler Viroloji ve Serolojik Tanı, "K. Kılıçturgay (ed). Viral Hepatit 94, 2. Baskı" Kitabında s 75-79, 1994, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
- 4- Aşçı Z, Akbulut A, Doymaz MZ, Felek S, Kılıç S: Serumda Hepatit B Virus DNA’sının PCR yöntemi ile taranması ve HBV serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. Viral Hepatit Dergisi, 1996, 2(1): 6-9.
- 5- Yücesoy M, Taşlı H, Bahar İH, Yuluğ N: Değişik serolojik belirleyicilerin değerlendirilmesinde HBV-DNA saptanmasının önemi. Viral Hepatit Dergisi, 2000, 2: 109-112.
- 6- Sönmez E, Durmaz R, Kızılkaya N, Özbilge H, Günel S, Yoloğlu S: HBsAg pozitif serumlarda HBV-DNA’nın iki ayrı PCR yöntemi ile taranması ve sonuçlarının serolojik göstergelerle karşılaştırılması. The Journal Of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 1996, 1(3): 172-176.
- 7- Yokosuka O, Tagawa M, Omata M: PCR detection of Hepatitis B Virus, "Diagnostic Molecular Microbiology" Kitabında s 322-326, 1993.
- 8- Kuştımur S, Çırak M, Fidan İ, Mansuroğlu H, Rota S, Türet S: Serumda Hepatit B Virus DNA (HBV-DNA) Saptanmasının PCR ve hibridizasyon yöntemleri ile karşılaştırılması, I. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Nisan 2000, Kapadokya, Kongre Kitabı s:26.
- 9- Heper Y, Mısıktık R, Özakin C, Töre O: Hepatit B Virus (HBV) markerleri ile HBV-DNA ilişkisi: Bursa bölgesi sonuçları. Viral Hepatit Dergisi, 1999, 2: 137-139.
- 10- Türet S, Fidan İ: HBsAg pozitif serum örneklerinde Hepatit B virus DNA’sının hibridizasyon yöntemi ile tespiti ve HBeAg ve Anti-HBe pozitiflikleri ile karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 1999, 33: 215-221.
- 11- Mısıktık R, Akalın H, Heper Y, Özakin C, Helvacı S, Töre O: HBV-DNA’sının PCR ve Hibridizasyon yöntemleri ile karşılaştırılması olarak gösterilmesi, IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, 1998, Ankara, Program ve Kongre Kitabı s:145.
- 12- Tansuğ Ş, Ünal E, Düzgünsıvacı E, Güvel H: HBsAg pozitif olguların ve bu olgularda HBV-DNA düzeylerinin değerlendirilmesi. Viral Hepatit Dergisi, 1999, 2: 129-136.
- 13- Tekeş S, Alp MN, Şimşek S, Kalkanlı S, Budak T: D.Ü. Tıp Fakültesi Genetik Tanı Laboratuvarına Başvuran 340 Hastanın ‘Hybrid Capture Sistemi’ ve PCR yöntemi ile belirlenmiş HBV-DNA sonuçlarının değerlendirilmesi, I. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Nisan 2000, Kapadokya, Kongre Kitabı s:20.
- 14- Pawlotsky JM, Bastie A, Lonjon I at all: What Technique should be used for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples?. J Virol Methods, 1997, 65(2): 245-53.
- 15- Otlı B, Durmaz R, Şahin K, Tekerekoğlu M, Büyükberber N: Hepatit B Virus DNA’sının araştırılmasında “In House” Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Yönteminin ‘Digene Hybrid Capture’ sistemi ile karşılaştırılması, I. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Nisan 2000, Kapadokya, Kongre Kitabı s:21.
- 16- Yenen OŞ: Viral hepatitler, "Wilke TA, Söyletir G, Doğanay M (ed) İnfeksiyon Hastalıkları" Kitabında s:633-681, 1996, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- 17- Durmaz R: Moleküler yöntemlerin uygulanmasında karşılaşılan sorunlar, IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, 1998, Ankara, Program ve Kongre Kitabı s:79.