

HBV-DNA PCR SONUÇLARININ, HBV SEROLOJİK GÖSTERGELERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI

Tercan US*, Yurdanur AKGÜN*, Birsen KANAN*

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

Özet

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) gibi moleküler tanı yöntemlerinin kullanıma girmesi ile, hepatit B infeksiyonlarının tanı ve takibinde kriter olarak kabul edilen serolojik göstergelerin yorumlanmasında bazı değişiklikler olmuştur. Bu çalışmada, hasta serumunda PCR yöntemi ile çalışılan HBV-DNA sonuçları ile, Enzyme Immunoassay (EIA) yöntemi ile elde edilen HBV serolojik göstergeleri (HBs Ag, HBe Ag, Anti-HBe) arasındaki ilişki araştırılmıştır.

PCR ile HBV-DNA, 231 hastanın 63'ünde (%27,3) pozitif olarak bulunmuştur. HBs Ag (+) 140 serum örneğinde (%83,5), HBV-DNA negatif iken 62'sinde (%98,4) HBV-DNA pozitif olarak saptanmıştır. Sırasıyla HBe Ag (+) 43 (%62,3), HBe Ag (-) 20 (%12,3) ile Anti-HBe (+) 23 (%13,6), anti-HBe(-) 40 (%64,5) serum örneğinde HBV-DNA pozitifliği gösterilmiştir. Buna karşılık HBe Ag (+) 26 örnekte (%37,7), HBV-DNA (-) bulunmuştur.

Sonuç olarak, HBV infeksiyonlarının izlenmesinde ve kronik hepatit B tedavisinde kriter olarak kabul edilen serolojik göstergelerin yanısıra, mutlaka HBV-DNA'nın da bakılmasının daha doğru olacağı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: HBV-DNA, PCR, Serolojik markırlar

Summary

COMPARISON OF HEPATITIS B VIRUS (HBV)-DNA BY PCR WITH 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 changed. In this study, the results of PCR analysis performed to test the presence of HBV viral DNA compared with serological markers of HBV tested via micro enzyme immunoassay. HBV-DNA was found positive in 63 (27,3%) patients of 231 with PCR. HBs Ag (+) 140 (83,5%) samples did not contain viral DNA whereas HBV-DNA positive 62 (98,4%) samples had HBsAg, It was showed HBV-DNA positivity respectively in HBe Ag(+) 43 (62,3%), HBe Ag (-) 20 (12,3%), Anti-HBe (+) 23 (13,6%) and Anti HBe (-) 40 (64,5%) serum samples. But HBe Ag (+) 26 (37,7%) samples did not have HBV-DNA.

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

Key Words: HBV-DNA, PCR, Serological markers

Giriş

Hepatit B enfeksiyonu tüm dünyada ve özellikle yurdumuzda önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada 400-500 milyon, ülkemizde ise 4 milyon civarında taşıyıcısı bulunan hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonların da kronikleşme oranı %5-10'dur (1,2). Taşıyıcılarda enfeksiyon asemptomatik kalabildiği gibi %20-40 oranında siroz, primer hepatosellüler karsinoma ve kronik karaciğer hastalığı ortaya çıkabilmektedir (3,4). Kronik HBV enfeksiyonları sağaltım giderleri ve iş kaybı nedeniyle büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle HBV enfeksiyonlarında kronik hepatit tanısının konulması ve özellikle viral replikasyon olup olmadığının belirlenmesi son derece önemlidir. HBV'nin aktif replikasyonunu doğrudan gösteren en duyarlı ve güvenilir belirleyicinin HBV DNA olduğu bilinmektedir. Bu amaçla uygulanan moleküler tanı yöntemlerinden biri olan PCR, 1983'de düşünülen ancak 1990'lı yıllarda kullanıma giren, nükleik asitlerin çoğaltılması esasına dayanan diagnostik bir testtir. PRC, düşük titrede viremi olsa bile, onu ortaya çıkarabilecek kadar duyarlı bir yöntemdir (5,6).

Bu çalışmada, hem bölgemizde PCR yöntemi ile HBV-DNA araştırılmasının rutin olarak laboratuvarımızda çalışmasını sağlamak, hem de HBV-DNA sonuçları ile EIA yöntemiyle elde edilen HBV serolojik göstergeleri arasındaki ilişkiyi belirlemek hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı PCR laboratuvarına başvuran HBV enfeksiyonu ön tanılı 231 hastanın serum örneği çalışma kapsamına alınmıştır.

EIA testi: HBV serolojik göstergeleri (HBsAg, HBeAg, Anti-HBe) mikro-enzim immünassay yöntemiyle (Organon Technika , Hollanda) araştırılmıştır.

PRC yöntemi: HBV-DNA'sı, hasta serum örneklerinden proteinaz K/Fenol ekstraksiyonu yöntemi ile saflaştırılmıştır (7).

1.Serumdan HBV-DNA ekstraksiyonu:

1.5ml lik mikrosantrifüj tüplerinin içine, 100 ml serum, 300 ml TE tamponu (tris EDTA SDS tamponu), 25 ml Proteinaz K (20mg/ml) konularak karıştırıldı ve iki saat 45oC'de bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda tüpler 5-10 sn santrifüjde çevrilerek, kenarlarda ve kapakta oluşmuş damlacıkların düşmesi sağlandı. Doymuş fenol çözeltisinden (+4oC'de) tüplere 400 ml konulup, vortekslenildikten sonra, mikrosantrifüjde (12.000xg) 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz alınarak, üzerine 1/1oranında fenol-kloroform karışımından sıvı faz ile eşit miktarda konularak vortekslenildikten sonra, 12.000 xg de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak faz başka bir tüpe alınarak, yapılan bu işlem bir kez de kloroform/ izoamil alkol karışımı (9/1) ile tekrarlandı. Son olarak elde edilen berrak fazın üzerine 50 ml 3 M sodyum asetat ve 600 ml %70' lik etil alkol (-20oC) eklenerek, 30sn vortekslenildikten sonra, bir gece -20 oC de bekletildi. Daha sonra 15 dakika mikrosantrifüj (16.000 xg) yapıldıktan sonra üstteki sıvı dökülerek elde edilen çökelti kendiliğinden kurumaya bırakıldı. Daha sonra nükleik asit çökeltisi 50 ml distile suda eritildi.

2. PCR çoğaltma işlemi:

0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içine sırasıyla 10 x PCR tamponu 5 ml, 2.5m dNTP (10mM) 1ml MgCl₂ , 0.5ml primer I (25 pM), 0.5ml primer 2 (25pM), 31.25 ml bidistile H₂O, 0.25ml Taq polimeraz (1.25 ü), 10ml DNA ekstraksiyon ürünü konuldu. Kullanılan primer setleri, HBV genomunun S, P bölgelerini kodlayan primer çifti (Biometra) olup, primer 1:5'-TTA-GGG-TTT-AAA-TGT-ATA-CCC-3 ve Primer 2: 5'-CAT-CTT-CTT-GTT-GGT-TCT-TCT-G-3' baz sırasına sahiptir. Amplifikasyon için kullanılan solüsyonlar Boehringer M. firmasından sağlanmıştır. Çoğaltma işlemi için kullanılan otomatik Thermal-cycler (Perkin-Elmer Cetus 9700) içine yerleştirilen mikrosantrifüj tüpleri 95oC'de 1 dk (denatürasyon) 55oC'de 1dk (bağlanma) ve 72oC'de 1 dk (uzama) olmak üzere 30 siklusa tamamlanacak şekilde inkübe edildi.

3. PRC ürününün saptanma aşaması:

397 baz çifti büyüklüğündeki amplifikasyon ürününün saptanması, yatay agaroz-jel elektroforez işlemi ile gerçekleştirildi. Her numuneden 10 ml alınıp üzerine 3 ml yükleme tamponu eklenerek,

0.5 gr/ml etidyum bromid içeren %1.5 agaroz jelde 150 V'da 30 dakika süreyle elektroforez işlemi tatbik edildi. Etidyum bromid ile boyanan DNA bandı, hasta örnekleriyle beraber elektroforeze konan moleküler ağırlık markırı (fX 174, Hae III ile kesilmiş) ile karşılaştırılarak pozitif ve negatif kontrollerle birlikte değerlendirildi. Değerlendirme U.V translüminatörde yapıldı. 397 baz çiftlik DNA bandının saptanması pozitif PCR sonucu olarak alındı ve UV monitör ile görüntülendi (Resim 1).

Bulgular

Çalışma kapsamına alınan 231 hastanın, 63'ünde (%27.3) HBV-DNA pozitif bulunmuştur (Tablo 1).

HBs Ag pozitifliği ile HBV-DNA pozitifliği arasındaki ilişki (Tablo 2) incelendiğinde, HBV-DNA (+) bir hastada (%1.6) HBs Ag'nin negatif, HBs Ag(+) 140 hastada (%83.5) HBV-DNA'nın negatif olduğu görülmüştür.

HBV-DNA ile HBe Ag, Anti-HBe işaretleri arasındaki ilişki tablo 3. de yer almaktadır. Buna göre, HBe Ag (+) 26 (%37.7) hastada HBV-DNA negatif iken, HBe Ag (-) 20 (%12.3) hastada HBV-DNA pozitif bulunmuştur. Anti HBe (+) 146 (% 86.4) hastada DNA negatif iken, 23 (%13.6) hastada HBV-DNA pozitif olarak saptanmıştır.

Tartışma

Hepatit B virüs tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik belirleyicilerden olan HBs Ag, HBe Ag ve anti-HBe, değerlendirilmelerinde son yıllarda bazı değişiklikler olmuştur. İnfeksiyonun göstergesi olan HBs Ag nin varlığı her zaman viral replikasyonun bir kanıtı değildir. HBe Ag pozitifliği, hem kronik ve fulminant hepatite dönüşme riski açısından hastanın kendisi, hem de bulaştırıcı olması nedeniyle çevresi için önemli sayılmış ve aktif replikasyonun belirleyicisi olarak ele alınmıştır. Anti-HBe (+)liği hastalarının gerek klinik, laboratuvar ve histolojik değerlendirilmeleri, gerekse PCR ile HBV-DNA'nın bu hastalarda saptanabilmesi, bu antikor varlığının yorumunda yeni görüşlerini ön plana çıkmasına neden olmuştur (8).

Bu çalışmada, 231 hastanın (202'si HBs Ag(+), 29'u Hbs Ag(-) 63'ünde (%27.3) HBV-DNA, PCR yöntemiyle pozitif saptanmıştır. Elazığ'da yapılan bir çalışmada (9) %42.5 oranında HBV-DNA (+) liği, İzmir'de (10) yapılan bir çalışmada ise %45.7 lik pozitiflik gösterilmiştir. Canylmaz ve ark. (11) ise 322 HBs Ag (+) hastanın 72'sinde (%22.56), Pekbay ve ark. (12) %39.8 HBV-DNA pozitifliği saptamışlardır. HBs Ag bilindiği gibi, küresel, tübüler ve/veya kor bölgesi içerir. Bu çalışmada HBV-DNA saptanamayan HBs Ag (+) serumların kor bölgesi içermeyen antijenik yapılardan oluştuğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada HBV-DNA (+) hastaların birinde (%1.6), HBs Ag (-) olarak bulunmuştur. Thiers ve Ark. (13) benzer şekilde HBsAg (-) üç olguda, Wang ve Ark (14) transaminazları normal, HBs Ag (-) donörlerin % 4'ünde Pao ve Ark. (15) ise %11'inde HBV-DNA varlığı göstermişlerdir. Bu araştırmalar, tüm serolojik göstergeleri negatif kişilerin de HBV taşıyabileceklerini ve bulaştırıcı olabileceklerini akla getirmektedir. Bu bulgu, özellikle HBs Ag negatif kanların uygulanmasından sonra alıcılarda ortaya çıkan post-transfüzyonel HBV infeksiyonlarının izahında önemlidir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada HBe Ag (+) serumların tümünde, Anti-HBe (+) serumların %60.9'unda, HBe (-) ve Anti-HBe (-) serum örneklerinin %52'sinde HBV-DNA pozitif bulunmuştur (16). Garcia ve Ark (17) çalışmasında ise HBe Ag (+) olguların %74.1'inde, Anti HBe (+) lerin ise %42 sinde HBV-DNA tespit etmişlerdir (17).

Bu çalışmada, HBe Ag (+) serumların %62.3'ünde, HBe Ag (-) lerin %12.3'ünde, Anti-HBe (+) lerin %13.6'sında ve Anti-HBe (-) serumların %64.5'inde HBV-DNA varlığı gösterilmiştir. Erensoy ve ark. (10) yaptıkları çalışmada, HBeAg (+) hastaların %90.6 sinda, Anti-Hbe (+) lerin %20'sinde, HBV-DNA'yı pozitif saptamışlardır. Bizim çalışmalarımızda HBV-DNA pozitifliğinin daha düşük, diğer bulgularının ise benzer olduğu görülmektedir.

Japonya'da yapılan bir çalışmada, HBe Ag (-), Anti HBe (+) hastaların tümünde HBV-DNA PCR ve hibridizasyon yöntemiyle gösterilmiştir. Bu hastaların tamamında prekor mutasyonu, %87.3'ünde

ise X gen bölgesinde mutasyon tesbit edilmiştir. Aynı çalışmada prekor mutasyonun virüs için kurtuluş mutasyonu olduğu, X-gen mutasyonlarının ise replikasyonu azalttığı belirtilmiştir (18). Sonuç olarak günümüzde gittikçe yaygınlaşan PCR gibi moleküler tanı yöntemlerinin, serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda tanıya gidilmesinin yanısıra, antiviral tedavinin izlenmesi gibi rutin işlemlerde, ayrıca çeşitli mutasyonların gösterilmesindeki gerekliliği ortadadır. Bu nedenle diğer laboratuvar göstergelerin yanında mutlaka HBV-DNA'sının da araştırılmasının daha doğru olacağı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Moradpour D, Wads JR: Understanding Hepatitis B virus infection. N Eng J Med 1995, 332:1092-1093.
2. Taşyaran MA: HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi, Viral Hepatit 98 Kılıçturgay K (Ed),1998,794.
3. Rubini SJ: Hepatitis Viruses. Howard BJ (Ed) Clinical and Pathogenic Microbiology, 1987: 817-828.
4. Robinson WS: Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds) Principles and Practdice of Infections Diseases, 4 th edition, New York, Churcill Livingstone, 1995:1406-1439.
5. Brehot C: Polymerase chain reaction for diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. J Hepatol 1993;17 (Supp 13): 35-41.
6. Türkoğlu S, Badur S: İnfeksiyon hastalıkları tanısında PCR Türk Mikrobiyol Cem Derg. Yayını No: 22.1995, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, S.II.
7. Yakusuka O, Taguwam Omata M: PCR delection hepatitis B virus. Persing DH, Smith TF, Tenoven FC, White TS (eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications kitabında, 1993,332, ASM Washington DC.
8. Badur S: Viral hepatitlerinin tanısında moleküler biyoloji yöntemleri, Kılıçturgay K (Ed), Viral Hepatit 98; 359-371.
9. Aşçı ve Ark: Serumda HBV-DNA'sının PCR yöntemi ile taranması ve HBV serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. Viral Hep Derg 1996: 2(1):6-9.
10. Erensoy S, Özacar T, Zeytinoğlu A, Anda B, Bilgiç A: Serumda HBV-DNA'sının, hepatit B seroloji göstergeleriyle karşılaştırılması infeksiyon Derg. 1995: 9 (1-2): 157-160.
11. Canyılmaz D, Çubukçu K ve ark: 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı 6-10 Ekim, 1997; S: 446.
12. Pekbay A, Günaydın M ve Ark: 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı 6-10 Ekim, 1997, S: 437.
13. Thiers V, Nakajima E, Krem Dorj D et al: Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects, Lancet, 1988, 2: 127-1275.
14. Wang JT, Wang TH, Seu C et al: Delection of HBV-DNA by PCR in plasma of volunteer bloods negative for hepatitis B surface antigen. J Infect Dis 1991: 163: 397-402.
15. Pao CC, Yao DS, Lin C et al: Serum HBV-DNA in HBV seropositive and seronegative patients with normal liver function. Am J Clin Pathol. 1991,95: 591-596.
16. Gupta BP, Jayasuryan N, Jamee LS: Direct delection of HBV from dried blood spots by PCR. J Clin Microbiol, 1992 30(8): 13-16.
17. Garcia F Jr, Garcia F, Berna L MC et al: Evaluation of enzyme immunoassay for HBV-DNA based on anti-double-stranded DNA. J Clin Microbiol, 1995, February, 1995, 33(2):413-415.
18. Fukuda R, Thanh NX, Ishimura N et al : X gene and precore region mutations in the Hepatitis B virus genome in persons positive for antibody to HBe Ag.J Infect Dis,1995; 172; 1191-1197.