

# HEPATİT B VİRÜS DNA'SININ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) VE HİBRİT YAKALAMA SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ

**C. EROĞLU\*, A. PEKBAY\*\*, Ş. ESEN\*, S. HAVUZ\*\*, M. SÜNBÜL\*, M. GÜNAYDIN\*\*, H. LEBLEBİCİOĞLU\***

**\* Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları AD.**

**\*\* Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun**

## Özet

HBV DNA'sının ölçülmesi kronik hepatit B enfeksiyonuna yaklaşımda önemli bir parametredir. Son birkaç yıldır serum HBV DNA'sının daha güvenilir olarak kantitasyonu için ticari ve laboratuvarında hazırlanan moleküler testler bulunmaktadır. Çalışmamızda HBV DNA'sının saptanmasında in-house (laboratuvarında hazırlanan) PCR ve hibrid yakalama sistemi (HCS, hybrid capture system, Digene) değerlendirilmiştir. Hibrid yakalama sistemi serumun mililitresinde  $1.4 \times 10^6$  ve  $5.6 \times 10^8$  HBV genomunu belirleyebiliyordu.

HBV DNA'sının belirlenmesi için 75 serum örneği PCR ve hibrid yakalama sistemi ile test edilmiştir. Test edilen tüm serumların HBs antijeni pozitif idi.

HBV DNA pozitifliği PCR ile %36, hibrid yakalama sistemi ile %32 olarak saptandı. Hibrid yakalama sistemi ile negatif olarak belirlenen 51 örneğin, 48 (%94.1)'i PCR ile negatif 3 (%5.9)'ü pozitif olarak saptanmıştır. İki method arasında kıkare testi ile istatistiksel olarak bir anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak HBV DNA'sı saptanırken önce PCR çalışılması, eğer pozitifse hibrid yakalama sistemi gibi bir kantitatif testin yapılması uygun olacaktır.

## Summary

The measurement of hepatitis B virus (HBV) DNA levels in serum has become an important tool for managing chronic HBV infection. Several molecular approaches, either commercially available or homemade tests, have been used in the last few years to quantify serum HBV DNA levels more accurately. We have evaluated in-house PCR and the hybrid capture system (HCS, Digene) for HBV DNA detection. HCS HBV DNA method is able to quantify HBV DNA at between  $1.4 \times 10^6$  and  $5.6 \times 10^8$  HBV genomes per ml in sera.

In-house PCR and HCS HBV DNA were tested for HBV DNA determination in 75 sera. All samples of tested were positive for HBs antigen.

The ratio of HBV DNA positivity was found to be 36% by in-house PCR and 32% by HCS HBV DNA methods. Fifty-one of HCS HBV DNA negative specimens, 48 (94.1%) were negative and 3 (5.9%) were positive by in-house PCR. The results indicated that there was no statistically meaningful difference between both methods by chi-square test.

As a result, while determining HBV DNA, samples should be first studied by PCR and then if it is positive a quantitative test such as HCS will be appropriate.

## Giriş

Hepatit B virüs enfeksiyonları, korunma ve daha hassas moleküler biyolojik tanı yöntemleri geliştirilmesine rağmen halen önemini korumaktadır. Hepatit B'ye bağlı kronik enfeksiyonluların, taşıyıcılardan ayrılması ve mümkünse tedavi edilmesi gerekmektedir (1,2). Zira kronik hepatit B enfeksiyonu sonrası hepatosellüler karsinoma ve siroz gibi öldürücü komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (3).

Kronik infeksiyonların değerlendirilmesinde serum HBV DNA pozitifliği ve DNA yükünün moleküler tanı yöntemleri ile belirlenmesi çok önemlidir. HBV DNA'sının gösterilmesi için birçok metod geliştirilmesine rağmen günümüzde rutin olarak en sık prob hibridizasyon ve hedef çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır (4-6). Hibridizasyon yöntemlerinin duyarlılığı düşük ve özgüllüğü yüksek iken çoğaltma yöntemlerinde tersidir. Ancak çoğaltma yöntemlerindeki bu yüksek hassasiyet yalnızca pozitifliğin de artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hangi yöntemlerin tanı veya tedavi takibinde kullanılacağı belirlenmelidir.

Hepatit B virüs DNA'sının saptanması için kullanılan testlerin bir kısmı ticari olarak bulunurken bir kısmı da laboratuvarda hazırlanabilmektedir (4-7). Çalışmamızda HBV DNA'sının serumda gösterilmesi için laboratuvarda kolayca hazırlanabilen PCR (in-house) ve ticari olarak temin edilen hibrid yakalama sistemi (hybrid capture system, Digene) karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Serum ve HBV DNA İzolasyonu: Çalışmaya mikro ELISA (Abbot) yöntemi ile HBsAg pozitif 75 serum örneği alındı. DNA İzolasyonu için Thon ve ark. (5) tarif ettiği metod modifiye edilerek kullanıldı; kısaca 50µ serum üzerine 5 µl proteinaz K (proteinaz K 10 mg/ml, TE (Tris 100 mM, EDT 10 mM; pH: 8.0) solüsyonu eklendi. Bir saat 55°C'de tutulduktan sonra 95°C de 10 dakika inkübe edildi. Karışım 4°C'de 15 dk 20 000 g'de santrifüje edildikten sonra 5µl'si hedef DNA olarak 45µl'lik PCR karışımına katıldı (5).

PCR (in house): PCR amplifikasyonu için Thiers ve ark. (8) tanımladığı HBV'nin yüzey antijeninin kodlandığı DNA bölgesine uyan P1 (429-450): 5'- CATCTTCTTGTGGTTCTTCTG-3' ve P2 (844-822): 5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCC-3' primerleri kullanıldı. PCR karışımı 5µ örnek DNA, 36.75 µl distile su, 5 µl PCR tamponu (10 x, 2.5 mM Mg+ içeren), 2 µl (50 şer pmol p1 ve p2) primer, 1 µl deoksi nükleotit (200 mM her birinden) karışımı ve 0.25 µl (1.25 ünite) taq polimeraz içeriyordu. Karışım hazırlandıktan sonra termal cykler (PTC 100 MJ Research)'da 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk olacak şekilde 45 siklus uygulandı. Kontaminasyonu azaltmak için standart prosedürler sıkı bir şekilde uygulandı. Amplifiye edilen 415 baz çiftlik (bp) DNA agaroz jel elektroforezi ile ayrılıp etidium bromid ile boyandı. Ultraviyole ışığı altında beklenen DNA bandı görülen örnekler pozitif olarak değerlendirildi. (Resim 1).

Hibrid yakalama Sistemi: Kit prosedürünün önerileri doğrultusunda uygulandı. Hibrid yakalama testi 5 pg (1.4x10<sup>6</sup> kopya/ml) ile 2000 pg (5.6x10<sup>8</sup> kopya/ml) arasındaki HBV DNA yükünü tespit edebiliyordu.

İstatistiksel analiz: Bulguların istatistiksel analizi x testi ile yapıldı.

Bulgular

PCR ile 75 serumun 27 (%36)'sinde pozitiflik saptanırken hibrid yakalama ile 24 (%32)'ünde pozitiflik saptandı (Tablo 1). PCR ile hibrid yakalama sistemine göre fazladan 3 (% 5.9) örnekte daha pozitiflik saptandı. PCR'nin hibrid yakalama sistemine göre duyarlılığı %100, özgüllüğü %94.1, pozitif prediktif değeri %88.9, negatif prediktif değeri %100 ve temel uyumu %96 olarak saptanmıştır. PCR HBV DNA'nın pozitif saptanma oranını %4 artırmaya rağmen iki metod arasında c testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tartışma

Virüs replikasyonunun en doğru göstergesi olması nedeniyle kronik hepatit B'nin tanı ve tedavi takibinde HBV DNA saptanması büyük öneme sahiptir. Bu nedenle günümüzde rutin uygulamada ALT yüksekliği, HBs antijeni pozitifliği olan ve kronik hepatit B düşünülen her hastada HBV DNA araştırılmaktadır. Amaç HBV DNA'nın varlığının gösterilmesi ise daha hassas olan kalitatif yöntemlerin kullanılması önerilmektedir. Eğer tedavi takibi yapılacaksa belirli bir hassasiyete (≥1000 kopya/ml) sahip kantitatif testlerin kullanılması daha uygun olacaktır.

PCR metodu teorik olarak örneklerdeki tek genomu bile saptayacak kadar duyarlı olmasına rağmen iyi standardize edilmiş uygulamalarda serumun mililitresinde 10-50 virüs kopyası saptanabilmektedir (9,10). Hibrid yakalama sisteminin duyarlılık alt sınırı 1.4 x 10<sup>6</sup> kopya/ml

(5pg/ml) olarak standardize edilmiştir. Bizim sistemimizde ise serumun mililitresindeki 140000 HBV genomu (0.5 pg/ml) tekrarlanan deneylerde tespit edilebilmektedir. Bu da göstermektedir ki iki yöntem arasında duyarlılık açısından belirgin fark vardır. Fakat bu fark rutin uygulamada anlamlı bir fark olarak görünmemektedir. Duyarlılık alt sınırının  $1.4 \times 10^6$  kopya/ml gibi oldukça yüksek bir değerde olması nedeniyle hibrid yakalama testi sonucunda negatiflik elde edildiğinde virüsün örnekte hiç bulunmadığı anlamına gelmez. Virüs belirtilen alt sınırdan daha düşük bir değerde bulunabilir. Çoğu çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da PCR ile HBV DNA pozitiflik oranı hibrid yakalamaya göre yüksek bulunmuştur. (5, 7, 9-11). PCR daha ucuzdur ve hibrid yakalamanın pozitif olduğu bütün örneklerde, pozitiflik olarak saptanmıştır. Buna rağmen PCR'nin standart olmaması ve yüksek düzeyde yalancı pozitifliği uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Sonuç olarak rutinde laboratuvarından HBV DNA istek sayısı Ülkemizde HBV prevalansı yüksekliği nedeniyle oldukça fazladır ve bu testlerin yapılması yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu nedenle HBs antijeni pozitif kronik hepatit B düşünülen hastalarda HBV DNA belirlenirken örneklerin önce daha duyarlı ve ucuz olan PCR gibi bir yöntemle çalışılması, eğer kantitatif değer gerekiyorsa (tedavi takibi açısından, vb.gibi) hibrid yakalama sistemi gibi kantitatif bir yöntemin kullanılması uygun olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985, 317: 489-495.
2. Hoofnagle JH. a-Interferon therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990, 11: 5100-5107.
3. Müller R, Baumgarten R, Markus R, et al. Treatment of chronic hepatitis B with interferon alfa-2b. *J Hepatol* 1990, 11: s 137- s 140.
4. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH, Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. *J Clin Microbiol* 1989, 27: 1930-1933.
5. Thon EV. Evaluation of SHARP Signal System for Enzymatic Detection of Amplified Hepatitis B Virus DNA. *J Clin Microbiol* 1995 33: 477-480.
6. Ho SKN, Chan TM, Cheng IKP, Lai KN. Comparison of the Second-Generation Digene Hybrid capture assay with the Branched-DNA Assay for Measurement of Hepatitis B Virus DNA in Serum. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 2461-2464.
7. Pas SD, Fries E, Man RAD, Osterhaus ADME, Niesters HGM, Development of a Quantitative Real-Time Detection Assay for Hepatitis B Virus DNA and Comparison with Two Commercial Assays. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 2897-2901.
8. Thiers V, Kremsdorf D, Schellekens H, Goudeau A, Sninsky J, Nakajima E, Mack D, Driss F, Wands J, Tiollais P, Brechot C. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B- seronegative subjects. *Lancet* ii: 1273-1276.
9. Dusheiko G, Xu J, Zuckerman AJ, Clinical diagnosis of hepatitis B infection: Application of the polymerase chain reaction. In: Becker Y, Darai G (eds.) *Diagnosis of human viruses by polymerase chain reaction technology*. Springer verlag, Berlin 1992: 67-85.
10. Brechot C. Polymerase chain reaction for diagnosis of hepatitis B and viral hepatitis. *J Hepatol* 1993; 17 (3): 35-41.
11. Yücesoy M, Bahar İH, Yuluğ N. Kronik B Hepatitlilerde Hepatit B Virüs DNA'sının gösterilmesi. *Mikrobiyoloji Bult* 1995, 29: 39-46.