

HEPATİT B YÜZEY ANTİJENİ POZİTİF SERUMLARDA HBV-DNA'NIN "IN-HOUSE" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE HİBRİD YAKALAMA YÖNTEMLERİYLE EŞ ZAMANLI ARAŞTIRILMASI*

SIMULTANEOUS DETECTION OF HBV-DNA IN THE HEPATITIS B SURFACE
ANTIGEN POSITIVE SERUM SAMPLES BY IN-HOUSE POLYMERASE CHAIN
REACTION AND HYBRID CAPTURE ASSAY

Tercan US**, **Abdurrahman KİREMİTÇİ****

Gül DURMAZ**, **Yurdanur AKGÜN****

ÖZET: Bu çalışmada, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olan 136 serum örneğinde HBV DNA varlığı, "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve hibrit yakalama (HY) yöntemiyle (Digene Hybrid Capture System, Digene, UK) eş zamanlı olarak araştırılmıştır. Örneklerin 53'ünde (%38.9) PZR ile, 34'ünde (%25) HY yöntemiyle HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. Buna göre PZR ile pozitif bulunan 19 (%13.9) örnekte HY yöntemiyle negatif sonuç alınmıştır ($p < 0.001$). PZR ile HBV DNA'sı negatif olan hiçbir serumda hibridizasyonla pozitifliğe rastlanmamıştır. Seksen üç serum örneğinde ise her iki yöntemle de negatif sonuç elde edilmiştir. Sonuç olarak, HY yöntemine göre çok daha duyarlı bulunan PZR yönteminin HBV DNA açısından tarama, HY yönteminin ise özellikle antiviral tedaviye yanıtın izlenmesi amacıyla uygulanması yarar sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: HBV DNA, polimeraz zincir reaksiyonu, hibrid yakalama yöntemi.

SUMMARY: In this study, a total of 136 serum samples positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg), have been screened for the presence of HBV DNA, by using in-house polymerase chain reaction (PCR) and hybrid capture (HC) assay (Digene Hybrid Capture System, UK), and the results have been compared by means of their performances. Of the serum samples tested, 53 (38.9%) and 34 (25%) were found positive for HBV DNA by PCR and HC assays, respectively. Accordingly, 19 (13.9%) PCR positive samples, were found negative with HC assay ($p < 0.001$). None of PCR negative samples were positive with HC assay. Eighty three (61%) of the 136 specimens were found negative by both of the methods. As a result, it was concluded that, in-house PCR was significantly more sensitive than HC assay for the detection of HBV DNA and may be used for the detection of HBV DNA, while HC assay may be useful especially for monitoring and predicting the response to antiviral therapy.

Key words: HBV DNA, polymerase chain reaction, hybrid capture assay.

* XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (1-5 Ekim 2002, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

** Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

GİRİŞ

Hepatit B enfeksiyonunun tanısında, hasta serumunda hepatit B virusu (HBV) DNA'sının gösterilmesi esasına dayanan moleküler tanı yöntemleri yaygın bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Duyarlı olmaları, kullanılan antiviral ajanın etkinliğinin izlenmesinde kullanılabilimleri, mutant suşların saptanmasına olanak sağlamaları ve en önemlisi viral replikasyonun varlığını ve viral yük düzeyini belirleyebilmeleri moleküler tanı yöntemlerinin serolojik testlere en önemli üstünlükleri arasında sayılabilir¹⁻³. Hasta serumunda viral DNA varlığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve hibridizasyon yöntemleriyle saptanabilmektedir, ancak HBV DNA'nın bu iki yöntemle gösterilmesinin klinik anlamları birbirinden oldukça farklıdır¹. Bu çalışmada, HBsAg pozitif hasta serumlarında HBV DNA varlığının, PZR ve hibridizasyon yöntemleri ile eş zamanlı olarak çalışılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

HBV serolojik belirleyicileri, enzim immünoassay (EIA, AxSYM, Abbott) yöntemiyle saptanan hastalardan HBsAg'i pozitif bulunan 136'sının serum örneğinde HBV DNA varlığı hibrit yakalama (Digene Hybrid Capture assay, Digene, UK) ve in-house PZR yöntemleriyle çalışıldı.

Hibrit Yakalama Yöntemi (Digene Hybrid Capture system, Digene, UK): Hasta serumu (50 µl) denatüre edildikten sonra özgül HBV RNA probuyla hibridize edildi. Oluşan RNA:DNA hibritleri, alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş olan anti-hibrit antikör ile kaplanmış tüplere aktarıldı. Daha sonra ortama kemilüminesan bir substrat ilave edildi. Substrat, bağlı alkalen fosfataz tarafından parçalandığında ortaya çıkan ışığın yoğunluğu rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak lüminometrede ölçüldü. Yayılan ışığın yoğunluğu ile örnekteki HBV DNA miktarı doğru orantılı olduğundan bu yöntemle kantitatif bir sonuç elde edilmiş oldu. Çalışmaya ml'de 10, 200 ve 2000 pg HBV DNA içeren standart serumlar alınarak sınır (cut-off) değeri saptandı (10 pg/ml), negatif kontrol ile de testin geçerliliği teyit edildi. Sınır değerinin üzerinde sonuç veren örnekler pozitif kabul edildi.

PZR Yöntemi: Serum örneklerindeki HBV DNA, proteinaz K- fenol ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra, 10 µl DNA ekstraksiyon ürünü üzerine 5 µl 10xPZR tamponu, 2 µl DNTP, 1 µl MgCl₂, 0.5 µl primer I, 0.5 µl primer II, 0.25 µl Taq polimeraz, 31.25 µl bidistile su ilave edilerek, 30 siklus otomatik "Thermal- Cycler" da (Perkin-Elmer Cetus 9700) çoğaltıldı. Kullanılan primer çiftinin (Biometra, Germany) dizilimi; primer I: 5'-TTA-GGG-TTT-AAA-TGT-ATA-CCC-3' ve primer II: 5'-CAT-CTT-CTT-GTT-GGT-TCT-TCT-G-3' şeklinde idi.

Elde edilen amplifikasyon ürününün saptanması, yatay agaroz jel elektroforez işlemi ile gerçekleştirilerek, görüntüleme ve değerlendirme UV translüminatörde yapıldı. 397 baz çiftlik DNA bandının varlığı, pozitif PZR sonucu olarak kabul edildi⁴.

İstatistiksel analiz: Fisher'in kesin x² testi uygulandı.

BULGULAR

HBsAg'i pozitif olan 136 serum örneğinde iki farklı yöntemle HBV DNA varlığının araştırıldığı bu çalışmada; PZR ile örneklerin 53'ünde (%38.9), hibridizasyon ile 34'ünde (%25) pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna göre PZR yöntemi ile HBV

DNA'sı pozitif bulunan örneklerin 19'unda (%13.9) hibridizasyon yöntemi ile HBV DNA saptanamamıştır. Çalışmada, örneklerin 83'ünde (%61) her iki yöntemle de negatif sonuç alınmıştır. PZR yöntemi ile HBV DNA'sı negatif olan hiçbir serumda hibridizasyon ile pozitifliğe rastlanmamıştır (Tablo I).

Tablo I: HBsAg Pozitif Serumlarda PZR ve Hibridizasyon Yöntemleriyle Saptanan HBV DNA Sonuçları

	Hibridizasyon		Toplam
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
PZR			
Poz (%)	34 (25)	19 (13.9)	53 (38.9)
Neg (%)	0	83 (61)	83 (61)
Toplam	34 (25)	102 (75)	136 (100)

TARTIŞMA

Hasta serumunda HBV DNA varlığının gösterilmesi, HBV enfeksiyonunun tanısında ve özellikle viral replikasyonun izlenmesinde oldukça önemlidir. Serumda HBV DNA varlığı hem PZR hem de hibridizasyon yöntemleriyle araştırılabilmektedir^{2,3}.

Bu çalışmada, 136 HBsAg pozitif hasta serumunun PZR yöntemi ile 53'ünde (%38.9), hibridizasyonla 34'ünde (%25) HBV DNA varlığı saptanmıştır. Diğer bir deyişle PZR ile pozitif sonuç alınan 53 serumun 19'unda (%13.9) hibridizasyonla HBV DNA saptanamamıştır. Aspinall ve arkadaşları³, PZR ve hibridizasyon yöntemleriyle saptadıkları pozitiflik oranlarını sırasıyla, %35.7 ve %33.3, Eroğlu ve arkadaşları⁵ %36 ve %32, Yüce ve arkadaşları⁶ ise %54.6 ve %51.6 olarak bildirmektedirler. Bu çalışmalara göre PZR ve hibridizasyonun duyarlılıkları birbirine oldukça yakındır. Diğer bazı çalışmalarda ise PZR ile çok daha yüksek oranda pozitiflik elde edildiği bildirilmektedir⁷⁻¹². HBsAg'i pozitif hastaların serumlarında PZR ve hibridizasyonla HBV DNA saptanma oranlarının karşılaştırıldığı bu çalışmalarda; Bevilacqua ve arkadaşları⁷ %20 ve %14, Kuştımur ve arkadaşları⁸ %24 ve %11, Yetişkul ve arkadaşları⁹ %68.1 ve %56.8, Zanella ve arkadaşları¹⁰ %100 ve %64.8, Zaaijer ve arkadaşları¹¹ %93 ve %28 ve Theilmann ve arkadaşları¹² %90 ve %23 oranlarında pozitiflik elde etmişlerdir. Çalışmamızda saptanan oranlar da, bu çalışmalar gibi PZR'in daha duyarlı olduğunu göstermektedir. HBV DNA'yı saptamada PZR'in hibridizasyonuna göre en az 10^4 kez daha duyarlı olduğu, bu yöntemle düşük titrede viremi olduğunda bile HBV DNA'nın varlığının ortaya konulabileceği bilinmektedir^{1,2,13}. Ancak, PZR ile, hibridizasyona göre daha fazla oranda yalancı pozitiflik alınabileceği de unutulmamalıdır^{1,14}. Ayrıca HBV DNA yönünden pozitif PZR sonucuna karşılık, hibridizasyonla negatiflik elde edilmesinin klinik açıdan ne anlama geldiği yeterince bilinmemektedir¹⁴. Yukarıda bahsedilen çalışmaların tamamı, HBsAg'i pozitif hasta serumlarında yapılmasına karşın, PZR ile saptanan pozitifliklerde %20 ile %100 arasında, hibridizasyonla saptanan pozitifliklerde ise %11 ile %64.8 arasında büyük sapmalar gözlenmektedir. Bu durum, hasta profillerinin farklılığından kaynaklanabildiği gibi, HBV DNA'nın varlığını gösteren bu testlerin henüz tam anlamıyla standardize edilememiş olması, "in-house" PZR yöntemlerinde HBV'ye ait farklı primer çiftlerinin kullanılması ve değişik firmalara ait hibridizasyon kitlerinin seçilmesi nedeniyle de laboratuvarlar arasında değişkenlik olabilmektedir¹³.

Çalışmamızda, HBsAg'i pozitif 136 hasta serumunun 83'ünde (%61) her iki yöntemle de negatiflik elde edilmiştir. Aspinall ve arkadaşlarının³ %64.3'lük negatiflik oranı, bizim sonucumuza en yakın olanıdır. HBsAg pozitif hastalarda, Yetişkul ve arkadaşları⁹ %31.8 ile daha düşük, Kuştımur ve arkadaşları⁸ %76.4 ile daha yüksek oranlarla HBV DNA negatiflikleri bildirmişlerdir. Araştırmamızda PZR ile HBV DNA saptanamayan serumların hiçbirinde hibridizasyonla pozitiflik gözlenmemiştir. Benzer şekilde diğer araştırmacılar da, HBV DNA'nın PZR ile saptanamadığı, buna karşılık hibridizasyonla saptandığı hiçbir olguya rastlamadıklarını bildirmişlerdir^{3,8,9}.

Polimeraz zincir reaksiyonu, HBV enfeksiyonunun gösterilmesinde hibridizasyona oranla çok daha duyarlıdır. Bu yöntemle, vireminin düşük titrede olduğu hastalar (anti-HBe'si pozitif olanlar gibi) ve kan vericileri (bunlarda HBsAg henüz pozitifleşmemiş olabilir) HBV DNA açısından güvenle taranabilir. Diğer taraftan PZR ile HBV DNA varlığının saptanması her zaman aktif replikasyonu göstermez. Bu durumda duyarlılığı daha düşük olmasına karşın özgüllüğü daha yüksek olan ve kantitatif sonuç alınmasına olanak sağlayan hibridizasyon yöntemine başvurulmalıdır. Hibridizasyonla HBV DNA pozitifliğinin saptanması, viral replikasyon ve enfektivitenin varlığını gösterir. Hibridizasyonla uzun süreli pozitiflik elde edilen hastalarda, kronik aktif karaciğer hastalığı gelişme olasılığının yüksek olduğu bildirilmektedir. Kantitatif sonuç alınabildiğinden bu yöntem, tedaviye alınan hastalarda kullanılan antiviral ilacın etkinliğinin ölçülebilmesine de olanak sağlar^{1,2,13,15}.

Sonuç olarak, duyarlılığı daha yüksek olan PZR yönteminin, viral hepatit B enfeksiyonu olan hastaların serolojik profilleri belirlendikten sonra, moleküler tanı testleri içerisinde birinci basamak test olarak kullanılmasının; maliyeti daha yüksek olan hibridizasyon yöntemine ise kantitasyon için baş vurulmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Mahoney FJ: Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. Clin Microbiol Rev 1999, 12: 351-366.
2. Badur S: Viral hepatitlerin tanısında moleküler biyoloji teknikleri, s: 447-462. Kılıçturgay K, Badur S (Ed), Viral Hepatit 2001, 2001, 1. baskı. Deniz Ofset, İstanbul.
3. Aspinall S, Steele AD, Peenze I, Mphahlele MJ: Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA: Comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. J Viral Hepatitis 1995, 2: 107-111.
4. Eroğlu C, Pekbay A, Esen Ş ve ark: Hepatit B virus DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hibrit yakalama sistemi ile belirlenmesi. Viral Hepatit Derg 2001, 7: 390-392.
5. Yokosuka O, Tagawa M, Omata M: PCR detection of hepatitis B virus, pp: 322-326. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993, ASM, Washington DC.
6. Yüce A, Gündüz S: Kronik B hepatitli hasta serumlarında HBV-DNA'nın chemiluminescence ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile gösterilmesi. 28.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-9 Ekim 1998, Antalya. Özet Kitabı: 04-80.
7. Bevilacqua F, Conti A, Marcello A, et al: Screening of HBV-DNA in chronic HBsAg carriers. Microbiologica 1991, 14: 279-286.

8. Kuştımur S, Yalınay Çırak M, Külâh C ve ark: HBsAg pozitif serum örneklerinde hepatit B virus DNA'sının (HBV DNA) PCR ve hibridizasyon yöntemleriyle saptanması. 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 8-13 Ekim 2000, Antalya. Program ve Özet Kitabı: P11-01.
9. Yetişkul S, Aydın F, Çubukçu K ve ark: HBV DNA'nın PCR ve hibridizasyon yöntemleri ile eş zamanlı araştırılması. 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 8-13 Ekim 2000, Antalya. Program ve Özet Kitabı: S02-03.
10. Zanella I, Rossini A, Domenighini D, et al: Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-time amplification, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, 21: 22-26.
11. Zaaijer HL, Borg FT, Cuypers HTM, Hermus MCAH, Lelie PN: Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 2088-2091.
12. Theilmann L, Fischer M, Galle PR, Nassal M: Detection of HBV DNA in HBsAg-positive sera after amplification using the polymerase chain reaction. *Liver* 1989, 9: 322-328.
13. Wolk DM, Jones MF, Rosenblatt JE: Laboratory diagnosis of viral hepatitis. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1109-1126.
14. Robinson WS: Hepatitis B virus and hepatitis D virus, pp: 1652-1679. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), *Principles and Practice of Infectious Disease*. 2000, 4th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
15. Koff RS: Hepatitis B and hepatitis D, pp: 850-858. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (Eds), *Infectious Disease*. 1998, 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia.