

HBV DNA Saptanmasında Sıvı Hibridizasyon ve Real-Time PCR Yönteminin Karşılaştırılması (*)

Sinem AKÇALI (**), Tamer ŞANLIDAĞ (**), Beril ÖZBAKKALOĞLU (**)

(*) Bu çalışma 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde (28 Haziran-1 Temmuz 2004) poster olarak sunulmuştur.

(**) Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Bu çalışmada HBV DNA'nın saptanmasında kullanılan standart yöntem olarak kabul edilen sıvı hibridizasyon yöntemi ile yakın zamanda kullanıma giren real-time PCR yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Rutin tarama amacıyla gönderilen ve hepatit B serolojik belirleyicileri (HBsAg, anti HBc total) mikro EIA (Organon Teknika) yöntemi ile pozitif olarak saptanan 55 serum örneği çalışmaya alınmıştır. Örnekler real time PCR ve hibridizasyon yöntemleri ile çalışılmıştır. 55 örneğin 29'u her iki yöntemle de pozitif olarak belirlenmiştir. Sıvı hibridizasyon yöntemiyle 55 örneğin 31'i (%56), real-time PCR yöntemiyle ise 50'si (%90) pozitif olarak saptanmıştır. Ancak hibridizasyon yöntemiyle negatif olarak saptanıp, real-time PCR yöntemiyle pozitif olarak saptanan 21 örneğin 20'sinde HBV DNA düzeyleri, hibridizasyon yönteminin yakalama sınırı olan 1.4×10^6 kopyanın altında bulunmuştur. Buna karşılık real-time PCR ile negatif olarak saptanan 2 örnek, hibridizasyon yöntemiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde iki yöntem arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($r=0.754$, $p<0.05$). Sonuç olarak, real time PCR'in geniş bir dinamik aralığa sahip olması ve hibridizasyon yönteminin saptayamadığı miktarları tesbit edebilme avantajları göz önüne alınarak, HBV DNA'nın kantitasyonunda duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: HBV DNA, real time PCR, hibridizasyon.

SUMMARY

Comparison of Liquid Hybridisation and Real-Time PCR Methods in Determination of HBV DNA

The aim of this study was to compare the liquid hybridisation method which is used as a standard method for detection of HBV DNA and a new method, real-time PCR. Fifty-five serum samples, received for routine screening and hepatitis B markers (HBsAg, antiHBc total) were found positive by mikro EIA (Organon Teknika), were evaluated in the study. All samples were tested with real-time PCR and liquid hybridisation method. Twenty-nine of 55 samples were found positive with both real-time PCR and liquid hybridisation method. Thirty-one of 55 samples (56%) were positive only with the liquid hybridisation, and 50 samples (90%) were positive only with the real-time PCR. In 21 samples HBV DNA were found negative with liquid hybridisation but were found positive with real-time PCR, however, 20 of this 21 sera, HBV DNA levels were lower than the 1.4×10^6 copy, which is known the detection limit of the liquid hybridisation method. Furthermore, 2 samples which was found negative with the real-time PCR, were evaluated as positive with the liquid hybridisation method. There was no statistically meaningful difference between both methods ($r=0.754$, $p<0.05$). In conclusion, because of the real-time PCR has a broad detection interval and its sensitivity for the very low level of HBV DNA, it may be used as a sensitive and reliable method for the quantitation of HBV DNA.

Key words: HBV DNA, real time PCR, hybridization.

GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) infeksiyonları, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunu olmayı sürdürmektedir. Türkiye'deki prevalansı %3.9-12.5 arasında değişmekte olup, bu oran 2.5-6 milyon (ortalama 4 milyon) kişinin HBV taşı-

yıcısı olduğunu yansıtmaktadır (1, 2). Tüm dünyada 300 milyon HBV taşıyıcısı olup, bunların %25-30'u siroz ya da hepatosellüler karsinom nedeniyle kaybedilmektedir (2-4).

Günümüzde HBV ile ilgili laboratuvar çalışmalarında moleküler biyolojik teknikler kullanılarak HBV DNA'nın araştırılması gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle herhangi bir serolojik gösterge saptanmayan (seronegatif) kişilerden bulaşan posttrans-

İletişim: Sinem Akçali

e-posta sinemakcali@yahoo.com

füzyonel hepatit B olgularında ve HBV mutantları ile meydana gelen hepatit infeksiyonlarında, infeksiyonun tek göstergesinin HBV DNA olduğunun kanıtlanması bu çalışmaların hız kazanmasına yol açmıştır.

HBV DNA'nın gösterilmesi için birçok metot geliştirilmesine rağmen rutin olarak en sık prob hibridizasyon ve hedef çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır (5-7). Hibridizasyon yöntemlerinin duyarlılığı düşük ve özgüllüğü yüksek iken, çoğaltma yöntemlerinde durum bunun tam tersidir. Bu nedenle hangi yöntemlerin tanı ve tedavi takibinde kullanılabilirliği belirlenmelidir.

Bu çalışmada HBV DNA'nın saptanmasında kullanılan standart yöntem olarak kabul edilen sıvı hibridizasyon yöntemi ile yakın zamanda kullanıma giren real-time PCR yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum örnekleri. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Seroloji laboratuvarına rutin tarama amacıyla gönderilen ve hepatit B serolojik belirleyicileri (HBsAg, anti HBc total) mikro EIA (Organon Teknika) yöntemi ile pozitif olarak saptanan 55 serum örneği çalışmaya alınmıştır.

Sıvı hibridizasyon. Hibridizasyon yönteminde serum örnekleri, Digene Hybrid Capture System ile, kit prosedürüne uygun olarak çalışılmış ve sonuçlar luminometre ile okutulmuştur. Nükleik asit miktarları ölçülerek, mililitrede 5 pikogram ($1,4 \times 10^6$ kopya) ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Real-time PCR DNA ekstraksiyonu. Serum örneklerinden 200 µL alınarak Nucleospin Virus kit (Biogene, Kimbolton, UK) ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

DNA amplifikasyonu. Ekstrakte edilen örnekler Taq Man PCR Core reagents (Applied Biosystems) kullanılarak hazırlanan PCR miksi içerisinde ABI Prism 7700 sekans tarama cihazında (Applied Biosystems, Foster City, USA) amplifikasyona tabi tutulmuştur. Çalışmanın dinamik aralığı 10^3 - 10^7 kopya/ml olup (HBV DNA Viral Quality Control-VQC panele göre), prob ve primerler Applied Biosystems firmasından elde edilmiştir.

İstatistiksel analiz. İstatistiksel analizlerde Max Likelihood Chi-square yöntemi ve Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır.

BULGULAR

55 örneğin 29'u her iki yöntemle de pozitif olarak belirlenmiştir. Sıvı hibridizasyon yöntemiyle 55 örneğin 31'i (%56), real-time PCR yöntemiyle ise 50'si (%90) pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 1). Ancak hibridizasyon yöntemiyle negatif olarak saptanan, real-time PCR yöntemiyle pozitif olarak saptanan 21 örneğin 20'sinde HBV DNA düzeyleri, hibridizasyon yönteminin yakalama sınırı olan $1,4 \times 10^6$ kopyanın altında bulunmuştur. Buna karşılık real-time PCR ile negatif olarak saptanan 2 örnek, hibridizasyon yöntemiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Yapılan istatistiksel analizlerde iki yöntem arasındaki korelasyon 0,754 olarak hesaplanmış, sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$).

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan araştırmalar, HBV DNA saptanmasında PCR yöntemlerinin, klasik hibridizasyon yöntemlerine göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir. PCR ile yaklaşık olarak 10-50 genom/ml gibi eser miktardaki HBV DNA saptanabilmektedir. Böylece, HBV DNA hibridizasyon testi negatif olan birçok hastada, PCR ile pozitif sonuçlar elde edilmektedir. Çalışmamızda da hibridizasyon yöntemiyle negatif olarak saptanan 24 örneğin 21'i, real time PCR ile pozitif olarak tesbit edilmiştir. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalara baktığımızda, Eroğlu ve ark (8) hibridizasyon yöntemi ile negatif olarak saptanan 51 örneğin 3'ünü, Yetişkul ve ark ise (9) 19 örneğin 5'ini PCR ile pozitif olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmalarla kıyasladığımızda, bizim çalışmamızdaki PCR pozitiflik oranları diğer araştırmacılar tarafından belirgin olarak yüksektir. Bunun nedeninin, seçilen PCR yönteminden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer araştırmalar "in house" PCR ile yapılırken, bizim çalışmamızda real-time PCR yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 1. Sıvı hibridizasyon ve real time PCR yöntemlerinin karşılaştırmalı sonuçları.

	Real-time PCR		TOPLAM
	(+)	(-)	
Hibridizasyon (+)	29	2	31
Hibridizasyon (-)	21	3	24
TOPLAM	50	5	55

Real time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle template miktarını kısa sürede, kantitatif olarak saptayan spesifik, duyarlı bir PCR yöntemidir. PCR'in her döngüsünde, reaksiyon sırasında ki amplikon üretimini, floresan yayılımını indikatör olarak kullanarak görüntüler. Real time PCR kantitasyonu, "in house" PCR'da ürünü görüntülemek için uygulanan PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırır. Bu da daha duyarlı sonuçların elde edilmesine olanak sağlarken, aynı zamanda kontaminasyon riskini azaltır ve potansiyel hata kaynağı olan PCR sonrası işlemleri elimine eder. Diğer yandan real-time PCR, 10^8 - 10^1 gibi çok daha geniş bir dinamik aralığı saptamaktadır. Dinamik aralığın genişlemesi, kantitasyonun doğruluğunu daha da arttırmıştır. Tüm bu avantajlarını göz önüne alarak, çalışmamızda HBV DNA'nın saptanması ve kantitasyonunda real-time PCR yöntemini kullanmayı tercih ettik.

Çalışmamızda sıvı hibridizasyon yöntemiyle pozitif olarak saptanan 2 örnek, real-time PCR ile negatif olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu durumun ekstraksiyon sırasındaki teknik bir sorundan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız aynı zamanda ülkemizde real time PCR'ın sonuçlarının hibridizasyon yöntemi ile karşılaştırıldığı ilk çalışma olup, yurt dışında da bu konu üzerinde yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Zanella ve ark (10) araştırmalarında HBV DNA pozitif 108 örneğin, hibridizasyon yöntemi ile ancak 78 tanesini pozitif olarak belirlerlerken, real-time PCR ile örneklerin tümünü pozitif olarak saptamışlardır. Yine Pas ve ark (11) HBsAg pozitif 180 örneği, her iki yöntemle HBV DNA açısından araştırmışlar, PCR ile 114 örneği pozitif olarak tesbit ederlerken, hibridizasyon yöntemiyle ancak 47 örneği pozitif olarak saptayabilmişlerdir. Her iki çalışmada da, hibridizasyon ile negatif olup, PCR ile pozitif olarak tesbit edilen örneklerin virus miktarlarının, hibridizasyon testinin saptama sınırının altında olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda da real-time PCR yöntemiyle pozitif olarak saptanan 20 örneğin HBV DNA düzeyleri, hibridizasyon yönteminin yakalama sınırı olan $1,4 \times 10^6$ kopyanın altında bulunmuştur.

2003 yılında yayınlanan EASL (European Association for the Study of the Liver) raporunda kronik hepatitlerde antiviral tedaviye başlama kriterleri olarak viral yükün 10^5 genom/ml'nin üstünde saptanması ve 3-6 aylık izlemlerden sonra aminotransferazların persistan yüksekliğinin devam etmesi kabul edilmektedir (12). Hibridizasyon yöntemlerinde saptama sınırının 10^6 genom/ml olması, bu yöntemin Hepatit B virus enfeksiyonu tanı ve iz-

lemlerinde yerini real-time PCR'a bırakması gerektiği görüşünü desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada her iki yöntemle de pozitif olarak saptanan sonuçlar, yapılan istatistiksel analizlerle birbiriyle korele olarak tesbit edilmiştir. Real time PCR'ın geniş bir dinamik aralığa sahip olması ve hibridizasyon yönteminin saptayamadığı miktarları tesbit edebilme avantajları göz önüne alınarak, HBV DNA'nın kantitasyonunda duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1. Çakaloğlu Y, Ökten A, Yalçın Ş:** Türkiye'de hepatit B virus enfeksiyonu seroepidemiolojisi. Gastroenteroloji Dergisi 1:49 (1990).
- 2. Taşyaran MA:** HBV enfeksiyonu epidemiolojisi. "K. Kılıçturgay (ed): Viral Hepatit' 98", p94, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul (2000).
- 3. Kurt H:** HBV enfeksiyonunun klinik bulguları. "K. Kılıçturgay (ed): Viral Hepatit' 98", p101, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul (2000).
- 4. Robinson WS:** Hepatit B virus and hepatit C virus. "GL Mandell, JE Bennett, R. Dolin (eds): Principles and Practise of Infectious Disease", p1652, Churchill Livingstone, New York (2000).
- 5. Koneko S, Feinstone SM, Miller RH:** Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polimerase chain reaction technique. J Clin Microbiol 27:1930 (1989).
- 6. Thon EV:** Evaluation of SHARP Signa-i System for enzymatic detection amplified hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol 33:477 (1995).
- 7. 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 37:2461 (1999).
- 8. Eroğlu C, Pekbay A, Esen Ş, Havuz S, Sünbül M, Günaydın M, Leblebicioğlu H:** Hepatit B virus DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hibrit yakalama sistemi ile belirlenmesi. Viral Hepatit Derg 3:390 (2001).
- 9. Tuncay Yetişkul S, Aydın F, Çubukçu K, Özgümüş OB, Yazıcı Y, Kılıç AO:** Hepatit B virus DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hibridizasyon yöntemleri ile araştırılması. Viral Hepatit Derg 1:441 (2002).

- 10. Zanella I, Rossini A, Domenighini D, Albertini A, Cariani E:** Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-time amplification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:22 (2002).
- 11. Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus AD, Niesters HG:** Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B Virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol* 38:2897 (2000).
- 12. Valla D:** Easl international consensus conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 38:533 (2003).