

## KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONLU HASTALARDA KANTİTATİF HYBRİD CAPTURE YÖNTEMİ İLE HBV DNA TAYİNİ VE KLİNİK ÖNEMİ

Özay TOĞRAL<sup>1</sup>, Gülsevım SAYDAM<sup>1</sup>, Mevhibe BALK<sup>1</sup>, Güray TOĞRAL<sup>2</sup>, Doğan CENGİZ<sup>1</sup>

### HBV DNA DETECTION IN CHRONIC HEPATITIS B INFECTED PATIENTS BY QUANTITATIVE HYBRID CAPTURE METHOD AND ITS CLINICAL IMPORTANCE

**Summary:** HBV is one of the causative agents of viral hepatitis. It is an important public health problem worldwide by causing acute and chronic infections. HBV DNA, is an important marker additional to the other serologic markers and gives idea about viral replication. While PCR technique detects HBV DNA qualitatively, Hybrid Capture technique detects it quantitatively. In this study, our aim was to compare PCR technique with hybridization method which gave quantitative results and the correlation of HBV DNA levels with ALT and AST levels. In 29 of 57 patients (%51) whom all were positive by PCR technique HBV DNA levels were found > 5pg/ml by quantitative Hybrid Capture technique. In 28 patients (%49) HBV DNA was found negative by quantitative Hybrid Capture technique. HBV DNA was not detected by quantitative Hybrid Capture technique in patients whose HBV DNA was found negative by PCR technique. A weak correlation was found between the serum levels of quantitative Hybrid Capture HBV DNA and serum ALT and AST levels ( $r=0,22$ ,  $p=0,12$ ;  $r=0,24$ ,  $p=0,07$  respectively). In conclusion, in patients with positive HBV DNA by PCR, the analytical sensitivity of quantitative Hybrid Capture HBV DNA technique was lower than that of PCR according to the results of detection of HBV DNA by quantitative Hybrid Capture technique. But quantitative Hybrid Capture technique was an appropriate way of detecting HBV DNA quantitatively. It was concluded that there is a statistically weak correlation between quantitative HBV DNA levels and serum ALT, AST levels. With these characteristics quantitative Hybrid Capture HBV DNA method is useful for the selection of antiviral therapy and for the monitoring of the response to therapy in patients with chronic B hepatitis.

**Key Words:** Quantitative HBV DNA, Hybrid Capture, PCR, Chronic Hepatitis, ALT and AST.

**Özet:** Hepatit B Virüsü (HBV), viral hepatite neden olan ajanlardan biridir. Akut ve kronik enfeksiyon tablosu oluşturması nedeniyle bütün dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir. HBV DNA HBV enfeksiyonu tanısında diğer serolojik markrlara ilaveten saptanan önemli bir belirleyicidir ve viral replikasyon hakkında bilgi vermektedir. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) HBV DNA'yı kalitatif olarak saptarken, hibridizasyonu temel alan Hybrid Capture yöntemi ise HBV DNA'yı kantitatif olarak saptar. Bu çalışmada kantitatif sonuç veren hibridizasyon yönteminin PCR tekniği ile uyumunu ve aynı zamanda HBV DNA düzeyleri ile ALT (alanin aminotransferaz) ve AST (aspartat aminotransferaz) düzeyleri arasındaki ilişkinin saptanmasını amaçladık. PCR tekniği ile HBV DNA'sı pozitif bulunan 57 hastanın 29'unda (%51) kantitatif Hybrid Capture yöntemiyle HBV DNA>5 pg/ml bulundu. Hastaların 28'inde (%49) ise kantitatif Hybrid Capture yöntemiyle HBV DNA negatif bulundu. HBV DNA'sı PCR tekniği ile negatif bulunan hastaların hiçbirisinde kantitatif Hybrid Capture yöntemiyle HBV DNA belirlenemedi. Kantitatif Hybrid Capture HBV DNA düzeyleriyle serum ALT ve AST düzeyleri arasında zayıf bir ilişki saptandı (Sırasıyla  $r=0,22$ ,  $p=0,12$ ;  $r=0,24$ ,  $p=0,07$ ). Sonuç olarak; PCR tekniği ile HBV DNA'sı pozitif bulunan hastalarda, kantitatif Hybrid Capture yöntemiyle yaptığımız HBV DNA tayininde elde ettiğimiz bulgularla kantitatif Hybrid Capture HBV DNA yönteminin analitik duyarlılığının PCR tekniğine göre daha düşük olduğu ancak HBV DNA'yı kantitatif olarak belirlemede uygun bir yöntem olduğu ve kantitatif HBV DNA düzeyleri ile serum ALT ve AST düzeyleri arasında istatistiksel olarak zayıf bir ilişki bulunduğu sonucuna varıldı. Kantitatif Hybrid Capture HBV DNA tayin yöntemi,

<sup>1</sup> Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

<sup>2</sup> Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı



bu özellikleri ile kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda antiviral tedavinin seçimi ve verilen tedavinin sonuçlarını gözleme açısından yararlı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Kantitatif HBV DNA, HBV DNA, Hybrid Capture, PCR, Kronik Hepatit, ALT ve AST.*

## GİRİŞ

HBV, viral hepatite neden olan ajanlardan birisidir (1). Akut ve kronik HBV enfeksiyonlarının rutin tanısında çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. HBsAg, HBV enfeksiyonlarının en yaygın olarak kullanılan bir belirleyicisidir. HBcAg ise aktif HBV replikasyonu ve bununla birlikte olabilecek karaciğer hasarının belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Fakat bu testler hastadaki enfeksiyon ya da enfeksiyon riskini net olarak gösteremeyebilirler. Bundan dolayı da bu testler kronik hastalıkların izlenmelerinde sınırlı bir imkan sağlarlar. Son yıllarda, akut ve kronik HBV enfeksiyonlarının tanısında moleküler biyoloji ve monoklonal antikor tekniklerinden yararlanılarak oldukça iyi sonuçlar alınmıştır (2).

HBV'ne bağlı karaciğer hastalığı olan kişilerde serum HBV DNA'sının saptanması viral replikasyon açısından önemlidir (3). Kronik taşıyıcı olan hastaların serumlarında HBV DNA varlığının belirlenmesi viral replikasyonu doğrulamaktadır. HBV DNA'nın enfeksiyonun takibinde ve antiviral tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde en önemli ve en güvenilir bir belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (4,5).

PCR yöntemi ilk kez 1985'de kullanıma girmiş ve HBV DNA'yı saptayan en duyarlı yöntem olmuştur. PCR ile kalitatif olarak 10-3pg/ml düzeyindeki HBV DNA saptanabilmektedir (5,6,7).

Son yıllarda geliştirilen kantitatif hibridizasyon yöntemleride oldukça önem kazanmıştır. Bu yöntemlerden Hybrid Capture HBV DNA tayin yöntemi izotopik olmayan bir immunassay yöntemidir ve aktif viral replikasyon ve enfektivite hakkında bilgi verebilmektedir (8). Özellikle seronegatif kişilerden bulaşan hepatit B enfeksiyonlarında tek göstergenin HBV DNA

olduğunun kanıtlanması bu belirtecin önemini daha da arttırmıştır (9).

Bu çalışmada, PCR yöntemi ile HBV DNA'sı pozitif bulunan hasta grubunda, Hybrid Capture yöntemi ile HBV DNA düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi ve ALT, AST düzeyleri ile olan ilişkisinin saptanması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran, PCR tekniği ile HBV DNA düzeyleri pozitif bulunmuş ve kronik hepatit B enfeksiyonu tanısı konmuş olan yaşları 10-71 arasında değişen 54'ü erkek ve 18'i kadın olan toplam 72 kişilik hasta grubunda yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan kan örnekleri 12 saatlik açlığı takiben sabah, ön kol veninden, antikoagulan içermeyen Vacutainer tüplere alındı; 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve 500 µl'lik Eppendorf tüplere alınarak, çalışma gününe kadar -20 C°'de muhafaza edildi.

### *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi :*

Serum örneklerinden DNA izole edildikten sonra Nested PCR yöntemi ile HBV genomunda bulunan yüzey ve core bölgeleri için özel olarak sentezlenmiş oligonükleotid primerler kullanılarak HBV DNA amplifiye edildi. Amplifikasyon için Techne marka Progene model Thermal Cycler cihazı kullanıldı. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde elektroforez yöntemi ile ayrıldı, ethidium bromid ile boyandı ve Polaroid film kullanılarak fotoğrafları çekildi.

DNA izolasyonunda Bioventures marka Gene Releaser reçine solüsyonu kullanıldı. PCR için, Promega Buffer 10x ( 100mM Tris HCl, 500mM KCl, %1 Triton x ), MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), Taq DNA polymerase 5U/µl (Promega), UNG 1 U/µl (Fermentas), Primer B1-B4 herbirinden 100 pmol/µl

(Synthetic genetics), dATP, dCTP, dGTP, dTTP herbirinden 10 mM (Promega), 100 bp DNA Ladder (Promega), HBV DNA pozitif kontrol (Accurun), HBV DNA negatif kontrol ( Accurun), Agarose %2 ( Sea Kem LE) kullanıldı.

*Primer Dizilimleri :*

B1 : 5' ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC 3'

B2 : 5' CAT CCT GCT GCT ATG CCT CA 3'

B3 : 5' TGA GGC CCA CTC CCA TAG G 3'

B4 : 5' TGG CAC TAG TAA ACT GAG CCA  
3'

PCR ürün uzunluğu: 248 bp

*Digene Hybrid Capture Deneyi (Kemiluminesan Moleküler Hibridizasyon Deneyi):*

Hybride Capture HBV DNA sistemi kemiluminesan deteksiyon sistemini kullanan bir sandviç moleküler hibridizasyon yöntemidir. İlk önce hedef DNA'yı içerdiği düşünülen 50 µl serum örneğindeki DNA denatüre edildi ve diziyeye özel bir genomik HBV RNA probu ile hibridize edildi. Elde edilen RNA:DNA hibridleri, alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş olan antihibrid antikoru ile kaplanmış tüplerin iç yüzeyi üzerinde tutuldu ve ortama kemilüminesan substrat ilave edildi. Substrat alkalen fosfataz tarafından parçalandıkça yayılan ışık Luminometreden ( Gen- Probe Leader TM ) relatif ışık birimi ( RLU ) olarak ölçüldü. Yayılan ışığın şiddeti, örnekteki hedef DNA miktarı ile orantılıdır. Pozitif HBV DNA standartları ( 10 pg/ml, 200 pg/ml, 2 ng/ml ) ile çizilen kalibrasyon eğrisinde herbir numunenin RLU değeri standartların RLU değeri ile karşılaştırılarak HBV DNA düzeyleri kantitatif olarak belirlendi.

ALT ve AST enzim düzeyleri ise Randox marka enzimatik kinetik test kiti ile Hitachi 911 analizöründe çalışıldı.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "SPSS

for Windows" istatistik programı kullanıldı. Grup karşılaştırmaları, Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Kantitatif HBV-DNA düzeyleri ile ALT ve AST enzim değerleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için Spearman korelasyon analizi kullanıldı.

## BULGULAR

PCR ile HBV DNA'sı pozitif bulunan 57 hastanın 29'unda (%51) kantitatif olarak HBV DNA 5 pg/ml üzerinde saptanırken hastaların 28'inde ise (%49) kantitatif olarak HBV DNA tespit edilemedi. Yine PCR ile HBV DNA negatif bulunan 15 hastada kantitatif Hybrid Capture yöntemiyle HBV DNA saptanamadı.

Çalışmamızda, kronik hepatit B enfeksiyonu olan ve PCR ile HBV-DNA'sı pozitif bulunmuş, kantitatif HBV DNA'sı >5pg/ml olan 29 hastanın ALT düzeyleri (114,63±138,37U/L) ile kantitatif HBV DNA'sı <5pg/ml olan 28 hastanın ALT düzeyleri (98,72±124,81 U/L) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05). Yine kantitatif HBV DNA'sı > 5pg/ml olan 29 hastanın AST düzeyleri (75,44±78,44 U/L) ve kantitatif HBV DNA'sı < 5pg/ml olan 28 hastanın AST düzeyleri (67,72±71,65 U/L) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

Kantitatif HBV DNA'sı >5pg/ml olan 29 hastanın %69'unda ALT ve %66'sında da AST yüksek bulundu. Yine bu hastaların %59'unda ALT ve AST birlikte yüksek bulunurken %41'inde de normal değerlerde bulundu.

PCR ile HBV DNA'sı pozitif bulunan 57 hastanın kantitatif HBV DNA değerleri ile serum ALT ve AST düzeyleri tablo 1'de verilmiştir.

Kantitatif Hybrid Capture HBV DNA değerlerinin serum ALT, AST enzim düzeyleri ile arasındaki korelasyona bakıldığında kantitatif Hybrid Capture HBV DNA sonuçlarıyla ALT (r=0,22 ; p=0,12) ve AST (r=0,24 ; p=0,07) düzeyleri arasında istatistiksel olarak zayıf bir ilişki belirlendi. Buna karşın serum



ALT ve AST düzeyleri arasında güçlü bir ilişki saptandı ( $r=0,90$ ,  $p=0,00$ ).

Tablo 1. PCR ile HBV DNA'sı pozitif bulunan hastalarda kantitatif HBV DNA, serum ALT ve AST düzeyleri.

PCR ile HBV DNA (+) n=57		
Kantitatif HBV DNA (pg/ml) X±SD	ALT(U/L) X±SD	AST (U/L) X±SD
989,61±1994,11	115,92±147,30	65,59±71,49

### TARTIŞMA

Kronik Hepatit B enfeksiyonu dünya nüfusunun yaklaşık %5'inde görülmektedir (10). Kronik HBV enfeksiyonu asemptomatik kalabildiği gibi enfekte bireylerin önemli bir kısmında da siroz ve hepatosellüler karsinomaya neden olabilmektedir (11).

Serum HBV-DNA'sının saptanması akut ve kronik hepatitlerde önemli ve güvenilir bir belirleyici olarak kabul edilmektedir (2). HBV DNA'sı, ayrıca HBV enfeksiyonunun takibinde ve antiviral tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde de büyük önem taşımaktadır (8).

Son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerle amplifikasyona dayalı sistemler (PCR) geliştirilmiştir. Ancak bu sistemler kalitatif olması nedeni ile viral yükün (viremi düzeyi) tespitinde kullanılamamaktadır. Bunun yanısıra bu tür sistemlerin sağlıklı bir şekilde uygulanması için, özel laboratuvar koşullarına ve ekipmana (ayrı odalar, thermal cycler cihazı, steril ortam, steril malzemeler vb.) ihtiyaç vardır.

Günümüzde kronik aktif hepatit tanısı konulan hastalara interferon tedavisi uygulanmaktadır. Bu sınıfa giren hastalar için, tedavi öncesi ve süresince viral yükün saptanması tedaviye verilen yanıt açısından önem kazanmaktadır (5). Bu amaçla, geliştirilen nükleikasit hibridizasyon yöntemleri, HBV DNA'nın kantitatif olarak saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (12). Bunlardan,

Hybrid Capture sistemi, serumda HBV DNA düzeylerini belirlemek için kullanılan oldukça hassas, hızlı ve nonizotopik basit bir immuonassaydir. Hybrid Capture yöntemi, 5-2000 pg/ml arasında lineer olup, HBV DNA'yı analitik olarak saptayabilmektedir.

Bu çalışmada, PCR ile HBV DNA'sı pozitif bulunan 57 hastanın 29'unda kantitatif olarak HBV DNA düzeyi 5 pg/ml'nin üzerinde saptanırken, hastaların 28'inde kantitatif olarak HBV DNA tespit edilemedi. Yine PCR ile HBV DNA'sı negatif bulunan 15 hastada kantitatif Hybrid Capture yöntemi ile HBV DNA saptanamadı.

PCR, kalitatif olmakla birlikte diğer yöntemlere göre daha duyarlıdır. Mahoney, PCR ile 10-3 pg/ml düzeyindeki HBV DNA'yı saptayarak, yöntemin hibridizasyon yöntemlerine göre oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir (10). Buna karşın V. Barlet ve arkadaşları PCR yöntemi ile de primerlerin bağlanamadığı, genomik değişkenliğin bulunduğu, DNA izolasyonunun yetersiz olduğu ve özellikle serumda inhibisyon faktörlerinin varlığı gibi durumlarda yanlış negatif sonuçlar alınabileceğini belirtmişlerdir(7).

Bu çalışmada, PCR yönteminin duyarlılığı HBV DNA serum pozitif örnekler (WHO, IEQAS) ile 10-3 pg/ml olarak saptandı.

Serum ALT, AST enzim düzeyleri hepatosellüler hücre hasarının en iyi göstergeleri olarak bilinmektedir. Hepatositlerde ALT, sitozolde sınırlı kalırken, AST, %80 oranında mitokondri ve %20 oranında sitozolde bulunmaktadır. Viral hepatitlerde, enflamatuvar yanıtın plazma membranına yönelik olmasından dolayı ALT düzeyleri, AST düzeylerinden daha yüksek düzeyde bulunmaktadır(13).

Hoofnagle ve arkadaşları, serum ALT ve AST düzeylerinin hastalığın şiddetini daima tam olarak yansıtmadığını bildirmişler ve kronik hepatit B gelişimini de kronik viral replikasyon ve integral

viral ürünlere karşı oluşan immun cevaplar arasındaki bir etkileşim olarak tanımlanmışlardır(3,14).

Burrel ve arkadaşları, HBeAg, DNA polimeraz aktivitesi ya da HBV DNA düzeyleri ile belirlenen HBV replikasyonu ile hastalığın şiddeti arasında tam bir ilişki bulunmayabileceğini ileri sürmüşlerdir (15).

Bu çalışmada, kantitatif HBV DNA'sı >5pg/ml olan 29 hastanın %69'unda ALT ve %66'sında AST yüksek bulundu. Bu sonuçlara göre bu hastaların ALT ve AST düzeylerinin % dağılımları arasında benzerlik olduğu görülürken, yine bu hastalarda ALT ve AST düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde %59'unda ALT ve AST birlikte yüksek ve %41'inde de birlikte normal değerlerde bulundu.

Kronik hepatit B enfeksiyonu, statik bir hastalık olmamasından dolayı, hastalığın aktivitesi ve HBV replikasyonunun altında yatan nedenlerle zaman içinde değişiklik gösterebilmektedir. HBV enfeksiyonuna bağlı karaciğer hasarından virüsün direkt sitopatik etki göstermediği düşünülmektedir. HBV enfeksiyonlarında kompleks bir humoral ve hücrel yanıtın mevcut olduğu bilinmektedir. Sonuçlarımız, çeşitli viral proteinlere karşı gelişen hücrel yanıt, enfeksiyonun şiddeti ve viral klirens ilişkisiyle açıklanabilir.

Bu çalışmada, Hybrid Capture HBV DNA yönteminin duyarlılığının PCR yöntemine göre daha düşük olmasına rağmen analitik spesifikliğin yüksek olması açısından HBV DNA'nın kantitatif olarak belirlenmesi için uygun bir yöntem olduğu ve kantitatif HBV DNA düzeyleri ile serum ALT ve AST düzeyleri arasında istatistiksel olarak zayıf bir ilişkinin bulunduğu sonucuna varıldı.

Duyarlılığının yüksek olmasına rağmen, PCR yöntemi replikasyon aktivitesini göstermediği için kullanım alanı sınırlıdır. Son yıllarda geliştirilen, kantitatif yöntemler, hem viral yükün saptanması hem de interferon tedavisinin maliyetini azaltması açısından önem kazanmışlardır. Kantitatif Hybrid

Capture sistemi kit şeklinde mevcut olması bakımından rutin laboratuvarlarda kullanıma oldukça uygun basit bir immunoassaydir. Kantitatif hibridizasyon yöntemleri ile viral yükün saptanmasının, özellikle antiviral tedaviye verilen yanıtın izlenmesi açısından oldukça yararlı olacağı kanısındayız.

### KAYNAKLAR

1. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-495.
2. Hoofnagle JH. Alfa-interferon therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990;11:5100-5107.
3. Hoofnagle JH, Shafritz DA And Popper H. Chronic Type B Hepatitis and the Healthy HBsAg Carrier State. *Hepatology* 1997;7:758-763.
4. Pawlotsky JM, Bastie A, Lonjon I, Rémiré J, Darthuy F, Soussy CJ, Dhumeaux D. What technique should be used for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples?. *J Virol Meth* 1997;65:245-253.
5. Aspinall S, Steele AD, Peenze I, Mphahlele JM. Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA: Comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. *Journal of Viral Hepatitis* 1995;2:107-111.
6. Akar N. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş Kitabı*. Antıp A.Ş Ankara, 1995; 95-130.
7. Barlet V, Zorski JP, Thelv MA and Seigneurin JM. Advantage of PCR for detecting low amounts of HBV DNA in patients' sera. *Res Virol* 1991;142:373-379.
8. Garcia M, Lazar J, Impraim C, Challberg S, Dibisceglie A and Lörncz A. Hybrid Capture™ HBV DNA Assay: A Fast and Sensitive Chemiluminescent Test for Quantitation of Hepatitis B Virus Deoxyribonucleic Acid in Human Serum. 5th National Forum on AIDS, Hepatitis, and Other Blood-Borne Diseases, March, 1992. American Society for Microbiology. 92nd General Meeting, May, 1992.



9. Lai ME, Farci P, Figus A, Balestrieri A, Arnone M, Vyas GN. Hepatitis B virus DNA in the sera of Sardinian blood donors negative for the hepatitis B surface antigen, *Blood* 1989;73:17.
10. Mahoney FJ. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of HBV Infection. *Clin Mic (Reviews)* 1999;12:351-366.
11. Kejian G and Bowden DS. Digoxigenin-Labeled Probes for the Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum. *J Clin Mic* 1991;29: 506-509.
12. Khuns MC, McNamara AL, Perrillo RP, Capal CM and Campbell CR. Quantitation of hepatitis B viral DNA by solution hybridization: comparison with DNA polymerase and hepatitis B e antigen during antiviral therapy. *J Med Virol* 1989;27:274-281.
13. Yenen OŞ. Viral Hepatitler. In : Wilke TA, Söyletir G, Doğanay M (eds.). *İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996: 641-700.*
14. Editorials. Chronic Type B Hepatitis. *Gastroenterology* 1983;84:422-424.
15. Burrell CJ, Gowans EJ, Rowland R, et al. Correlation between liver histology and markers of hepatitis B virus replication in infected patients: a study by in situ hybridization. *Hepatology* 1984;4:20-24.