

Serumda Hepatit C Virus RNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanmasının Anlamı

Salih Türkoğlu¹, Yamina Lazizi²

Özet: Hepatit C infeksiyonuna dirençli olduğu bilinen Rhesus cinsinden bir maymundaki infeksiyöz partiküllerin degradasyon ve HCV-RNA'nın serumdan kayboluşu incelendi. HCV-RNA-pozitif bulunan hastalardan hazırlanan bir serum havuzu hayvana intravenöz yoldan inoküle edildi ve serum, tükürük ve vaginal sekresyonlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile HCV-RNA arandı. Viral partiküllerin hızla degrade olduğu inokülasyonun dokuzuncu gününden "nested" PZR ile HCV-RNA araştırmasının negatif bulunması ile saptandı. HCV infeksiyonunda, HBV'de olduğunun aksine PZR ile alınan pozitif sonucun viral replikasyonun sürmesi ile bağlantılı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Hepatit C virusu infeksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu.

Summary: Importance of detection of hepatitis C virus sequences in serum by polymerase chain reaction. We studied the degradation of infectious particles and the clearance of HCV-RNA in a rhesus monkey, species known to be naturally resistant to HCV. After injection with a pool of infectious human sera, blood samples, saliva and vaginal secretions were investigated for HCV-RNA. We demonstrate that HCV particles were rapidly degraded and that 9 days after inoculation, HCV-RNA detected by nested PCR became negative. Unlike HBV-DNA carriage, this data prove that for HCV infection a positive result is always indicative of viral replication.

Key Words: Hepatitis C virus infection, polymerase chain reaction.

Giriş

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hepatit C virusu (HCV) infeksiyonu tanısında önemli bir testtir. Çünkü virusun kanda ve karaciğerde çok düşük miktarda bulunduğu bilinmektedir (1). HCV antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanması virusun eliminasyonunu göstermemektedir. İnfeksiyöz virus partikülleri ve bunlara karşı oluşan antikorlar hasta kişilerde aynı anda bulunabilmektedir (2). Ayrıca, antikorun saptanamadığı, ancak virusun varolabileceği durumlar da mevcuttur (3). Serumda ya da plazmada HCV-RNA'nın revers transkriptaz PZR (RT-PZR) ile saptanması gerek hastalığın tanısı, gerekse tedavinin etkinliğinin izlenmesi için çok önem taşımaktadır.

PZR'nin çok duyarlı bir teknik olması alınan sonuçların yorumlanmasında temkinli olunması gerekliliğini de beraberinde getirmektedir; zira, teorik olarak, bir mikroorganizmanın çoğalması sona ermesinden sonra da genomuna ait diziler, çeşitli muayene maddelerinde PZR ile saptanabilir (4). Bundan önce yaptığımız bir çalışmada, replikasyonun olmadığı koşullarda hepatit B virusu DNA'sının (HBV-DNA)'sının serumda "in vivo" kalış süresini belirlemiş ve PZR ile HBV-DNA'yı uzun bir süre saptamıştık (5).

HCV infeksiyonunda da viral RNA'nın RT-PZR ile saptanmasının anlamlılığını araştırmak için aynı deneyi, aynı Rhesus maymununda tekrarladık. İnfeksiyöz HCV partikülleri içeren bir serum havuzu oluşturularak hayvana inoküle ettik ve zaman içinde, virusun çeşitli vücut sıvılarına geçişi ve degradasyonunu belirledik.

Yöntemler

Deney hayvanı: Rhesus cinsinden dişi bir maymun (*Macaca mulata*), uygun bir ortamda korundu ve beslendi. RT-PZR ile HCV-RNA araştırması birkaç kez tekrarlanan deneylerde pozitif sonuç vermiş ve anti-HCV'si de pozitif olan kronik HCV infeksiyonu hastalarına ait serum örnekleri tek bir tüpte karıştırılarak bir serum havuzu oluşturuldu ve bunun 30 ml'si hayvana intravenöz

olarak verildi. İnokülasyon öncesi, inokülasyondan 1/2 saat sonra ve ilk hafta her gün, daha sonraki üç hafta boyunca iki günde bir ve daha sonraki iki ay boyunca da haftada bir, hayvandan steril tüplere kan alınarak serum örnekleri toplandı.

Aynı günlerde hayvandan vaginal ve tükürük örnekleri de alındı. Vaginal salgıların toplanması için vajina 2 ml steril fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkandı ve toplanan sıvı steril tüplere alındı. Tükürük örnekleri için "Omni SAL" tükürük toplama sistemi (Saliva Diagnostic Systems, Vancouver, USA) kullanıldı. Tüm örnekler derhal uygun miktarlarda steril tüplere bölünerek -70°C'de donduruldular.

RNA eldesi: Serum örneklerinden RNA eldesi için proteinaz-K içeren eritme tamponu ile inkübasyon sonrası fenol/kloroform ekstraksiyonu uygulandı (6). Sulandırılmış ve sulandırılmıy örneklerin 100 ml'sinden ekstraksiyon yapıldı. Tükürük ve vaginal sekresyonlar için ise guanidyum tiosiyanat yöntemini kullanan RNazol B kiti kullanıldı (7).

RT-PZR. HCV genomunun 5'-NC (non coding) bölgesinden seçilmiş ve daha önce Lazizi ve arkadaşları(8)'nin kullandıkları "nested" primerler ve uyguladıkları yöntemle göre yapıldı. PZR ürünleri % 2 oranında agaroz içeren Tris-borat-EDTA tamponu ile hazırlanan ve 0,5 mg/ml'de etidyum bromür ile boyanan jelde incelendi. Jelde uygun boyda saptanan bandların konfirmasyonu için ise jeldeki tüm nükleik asitler alkalın transfer metodu ile Hybond-N+ (Amersham) naylon membranlara geçirildiler. Radyoaktif P³² ile işaretlenmiş, yaklaşık 200 baz uzunluğundaki bir HCV probu ile hibridizasyona tabi tutuldular.

PZR reaksiyonunun duyarlılığının saptamak için Pasteur Enstitüsü'nden Dr. Wikowsky'den sağladığımız ve HCV genomunun 5'-NC bölgesinden itibaren 800 baz uzunluğunda bir parça içeren bir plazmidin seri sulandırılmaları kullanıldı.

Yanlış pozitif sonuçlara yol açmamak için daha önceden bildirilen kontaminasyona karşı alınması gereken önlemlerin tümü alındı (9).

Pozitif basınçlı temiz oda ve negatif basınçlı ekstraksiyon ve PZR sonrası inceleme odalarında çalışıldı. Örnek hazırlanması ve nükleik asid saflaştırılması aşamaları aynı laboratuvarında iki ayrı laminer akımlı kabin içerisinde yapıldı. PZR sonrası inceleme yine bir laminer akımlı kabin içerisinde yapıldı.

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul
(2) Hôpital Antoine Beclere, Service de Microbiologie, Unite de Virologie et d'Immunologie, Clamart, Paris, Fransa

Tablo 1. İnfeksiyöz Bir Serum Havuzu İnoküle Edilen Maymunda RT-PZR İle Saptanan HCV-RNA Düzeyleri

Süre	Serumda RT-PZR (Pozitif Bulunan Serum Sulandırımı)
İnokülasyon öncesi	-
İnokülasyondan 1/2 saat sonrası	10 ⁻³
1. Gün	10 ⁻²
2. Gün	10 ⁻²
3. Gün	10 ⁻²
4. Gün	10 ⁻²
7. Gün	10 ⁻²
9. Gün	10 ⁻¹
11. Gün	-
14. Gün	-
20. Gün	-

Sonuçlar

Öncelikle hayvana injekte edilen serum havuzundaki virus miktarını tahmin edebilmek için bu karışım bir seri sulandırma tabii tutuldu. "Nested"-PZR sonucu, % 2'lik agaroz jelde görünür band elde edilebilen serum sulandırımı 10⁻⁴ olarak saptandı. Deney iki kez tekrarlandı ve aynı sonuç alındı. İnokülasyondan önceki serum örneği negatif sonuç verdi. İnokülasyondan 1/2 saat sonra alınan serum örneği 10⁻³ sulandırımında pozitif sonuç verdi. İzleyen günlerdeki alınan serum örneklerindeki HCV-RNA pozitifliği tabloda görülmektedir. En son pozitiflik 9. günde elde edilebilmiştir.

Daha sonraki gün, 11. günde ve çeşitli kontrol günle 20. gün 37 ve 60. günde de (tabloda gösterilmemiştir) negatif sonuç alındı (Tablo 1). Aynı günlerde toplanan vaginal örnekler ve tükürüklerde pozitif sonuç elde edilmedi.

"Nested"-PCR ile sürekli olarak pozitiflik elde edilebilen plazmid sayısı 4 olarak belirlendi.

İrdeleme

Bu çalışmada PZR replikasyonun olmadığı in vivo deney koşullarında HCV-RNA dizilerinin hızla degrade olduğu ispatlanmıştır. HBV enfeksiyonuna da dirençli olduğu bilinen Rhesus türünden aynı maymunu kullanarak yaptığımız önceki çalışmamızda HBV-DNA, serumda üç ay boyunca saptanabilmiştir (5). Bu, enfeksiyon hastalıklarının tamsında PZR'in ne dereceye kadar yardımcı olabileceği konusunda tereddütlere yol açmıştır.

İnfeksiyöz olunmayan durumlarda, hatta tamamen iyileşmeden sonra, PZR ile uzun süre pozitif sonuç elde etmek mümkün olmaktadır (10).

HCV enfeksiyonu sıklıkla kronikleşmeye giden bir enfeksiyondur (11). Hem tamamen iyileşen, hem de kronikleşen hastalarda antikor yanıtı oluşmaktadır. Virüsün antijeninin saptanması şu an için mümkün olmadığı için viral RNA'nın PZR ile saptanması tanıda çok önemli hale gelmektedir. Bu çalışmamın da gösterdiği gibi HCV enfeksiyonunda PZR ile elde edilen pozitif sonuç viral replikasyonun sürdüğünün kanıtı olarak kabul edilmelidir.

HCV-RNA, maymunun tükürük ve vaginal sekresyonlarında saptanamadı. IgG düzeylerine bakarak plazmadan tükürüğe geçişteki sızmanın 10⁻³ düzeyinde olduğu varsayılarak (11) plazmadan mukozal sıvılara HCV pozitifliği sağlayabilecek bir geçiş olmadığı ve PZR ile negatif sonuç alındığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, PZR'nin, HCV çalışmalarında viremi ve enfeksiyöziteyi en iyi gösteren yöntem olarak yerini koruduğunu düşünmekteyiz. Yüksek duyarlılığı ve HCV-RNA'nın da in vivo ömrünün çok kısa olması, HCV enfeksiyonunun interferonla tedavisinin takibinde de PZR'yi çok önemli kılmaktadır.

Kaynaklar

- Bradley DW, Maynard JE. Etiology and natural history of post transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 56-66
- Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 1419-22
- Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH, the Copenhagen Dialysis HCV Study Group. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis* 1993; 168: 1343-8
- Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3513-5
- Lazizi Y, Pillot J. Delayed clearance of HBV DNA detected by PCR in the absence of viral replication. *J Med Virol* 1993; 39: 208-13
- Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis detection by polymerase chain reaction using multiple primers sets. *Hepatology* 1991; 14: 51-5
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 163: 156-9
- Lazizi Y, Elfassi E, Pillot J. Detection of hepatitis C virus sequences in sera with controversial serology by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 931-4
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 1989; 339: 237-8
- Mason A, Yoffe B, Nooman C, Mearns M, Campbell C, Kelley A, Perrillo RP. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B after HBsAg clearance. *Hepatology* 1992; 16: 36-41
- Brandtzaeg P. Human saliva. In: Tenovuo JO, ed. *Clinical Chemistry and Microbiology*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989: 1-54