

# E Hepatiti: Deneysel Hayvanına Bulaştırma ve Virusun Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanması

Salih Türkoğlu<sup>1</sup>, Pascal Dubreuil<sup>2</sup>

**Özet:** *Cynomolgus* türünden bir maymunun hepatit E virusunun (HEV) bir suşu (SAR-55) ile infekte edildi. Enfeksiyon, serumda virusa özgü antikorlar, alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi ve viral RNA'nın revers transkriptaz PZR (RT-PZR) ile serum ve dışkıda gösterilmesi ile izlendi. Enfeksiyon bugüne dek tanımlanan paternlere benzer bir seyir gösterdi. Viral RNA'nın dışkıdan eldesinde guanidyum tiyosiyanat ve asid fenol yöntemi ile klasik fenol/kloroform ekstraksiyonu ve bunun iki modifikasyonu duyarlılığı artırmak yönünden karşılaştırıldı. Klasik fenol/kloroform ekstraksiyonu en duyarlı bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** HEV, PZR, hepatit, bulaştırma.

**Summary:** *Hepatitis E: animal transmission and detection of the virus by the polymerase chain reaction. A cynomolgus macaque was inoculated intravenously with a strain (SAR-55) of the hepatitis E virus (HEV). The course of the infection was monitored by assessing serum levels of anti-HEV and alanine aminotransferase and detecting viral RNA in samples of sera and feces by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Guanidine thiocyanate-acid phenol, classical phenol-chloroform methods and two of the latter's modifications were compared in the extraction of RNA from feces for the purpose of increasing sensitivity. Phenolchloroform method was found to be the most sensitive.*

**Key Words:** HEV, PCR, hepatitis, transmission.

## Giriş

Hepatit E virusu (HEV) gelişmekte olan ülkelerde başta gelen bir hepatit etkenidir. Kalsiviruslara benzeyen virus, hastalığın akut fazında sıklıkla dışkıdan saptanabilmektedir. Virusun hastalığın etkeni olduğunun 1983 yılında belirlenmiş olmasına karşın (1), tanımlanabilecek serolojik testlerin geliştirilmesi HEV genomunun moleküler klonlanması ve bu yolla viral proteinlerin elde edilmesi ile mümkün olabilmektedir (2,3). Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) tekniği de serum ve dışkı gibi çeşitli örneklerde HEV genomlarının gösterilmesini sağlamıştır (4). Henüz kültürlü yapılamayan bu virüsle, *Cynomolgus*, *Tamarin*, *Rhesus* gibi maymunlar ve şempanzeler infekte edilebilmiş ve deney hayvanında hastalığın patogenezi araştırılmaya başlanmıştır (5-8). Bu amaçla deney hayvanları, serum alanin aminotransferaz (ALT), izositrat dehidrogenaz (ICD), gamma-glutamil transferaz (GGT) gibi çeşitli biyokimyasal parametreler, virusa özgü antijen ve antikorun karaciğer ve serumda gösterilmesi ve RT-PZR ile viral genomun saptanması ve dokuların histopatolojik incelenmesi ile izlenmektedir. Bu yöntemlerden, uygun koşullarda yapıldığında en özgül olanlarından bir tanesi RT-PZR'dir. Ancak dışkıdan yapılan PZR'lerde RNA eldesi ve bazı reaksiyon inhibitörlerinin yanlış negatif sonuçlara yol açması sıklıkla karşılaşılan durumlardandır (9). Öte yandan, deney hayvanında infeksiyon her zaman aynı profili çizmemektedir.

Bu çalışmada duyarlılığı artırılmış bir RT-PZR tekniği kullanarak prototip bir HEV suşu (SAR-55) ile (10) *cynomolgus macaque* (*Macaca fascicularis*) türünden bir maymundan infeksiyonun seyrininin izlenmesi amaçlandı.

## Yöntemler

**Deneysel hayvan:** *Cynomolgus* maymunu uygun bir ortamda korundu ve beslendi. HEV'in Pakistan'da bir epidemisi sırasında bir hastadan elde edilen ve Robert H. Purcell tarafından bize gönderilen standard bir inokulumu (SAR-55) hayvana intravenöz olarak

(0.5 ml) inoküle edildi. Hayvanın inokülasyon öncesi ve sonrasında iki günde bir dışkısı ve belli bir miktar kanı toplandı. Serum örneklerinde ALT aktivitesine bakıldı.

**ELISA:** Anti-HEV antikorları iki rekombinant antijen içeren (SG-3 ve 8-5) Abbott Laboratuvarlarının kiti ile araştırıldı. IgG sınıfı antikorların saptandığı bu kitle sonuçlarının değerlendirilmesi kiti önerdiği prosedüre göre yapıldı.

**Dışkı süspansiyonu:** -80°C'de dondurularak saklanan dışkıları 1/10 (ağırlık/hacim) oranında PBS ile sulandırıldı. 2500 g'de 20 dakika santrifüje edildi. Üstteki berrak faz alınarak 0.45 mm'lik membrandan süzülme ve küçük miktarlara (0.5 ml) bölünerek saklandı ya da ekstraksiyona geçildi.

**RT-PZR için viral RNA'nın hazırlanması:** Klasik fenol/kloroform ekstraksiyonu ve bunun iki modifikasyonu uygulandı. Guanidyum tiyosiyanat ve asid fenol yöntemine (11) göre hazırlanmış RNAzol B kiti de karşılaştırmalı olarak kullanıldı. Dört yöntem A,B,C ve D olarak isimlendirildi. Tüm yöntemlerde 0.5 ml dışkı süspansiyonu ile nükleik asid eldesi yapıldı. Klasik, fenol/kloroform/izoamil alkol ekstraksiyonu öncesi (yöntem A) örnekler Tris HCl (0.1 M), EDTA (12.5 mM), NaCl (0.15 M), SDS (% 10) ve 400 gr/ml proteinaz K içeren eritme tamponunda bir saat 37°C'de inkübe edildiler. Daha sonra fenol/kloroform ekstraksiyonuna geçildi. Son aşamadan sonra elde edilen berrak faz 1.5 hacim soğuk (-20°C) saf etil alkol ve 1/10 hacim sodyum asetat (3M) ve tüp başına 2 ml glikojen (Appligene) ile karıştırıldı ve bir gece -20°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, 14 000 g'de 15 dakika santrifüje edildikten sonra oluşan çökelti % 70'lik etil alkol ile yıkandı ve tekrar 10 dakika santrifüje edildi. Çökelti kurulduktan sonra 25 ml distile suda çözüldü.

Yöntem B'de dışkı süspansiyonu NaCl (son konsantrasyon 0.5M) ve polietilen glikol (PEG 6000, son konsantrasyon % 12) ile karıştırıldı ve bir saat buz içerisinde bekletildi. 10 000 g'de 15 dakika santrifüje edildikten sonra viral partikülleri de içeren çökelti yöntem A'daki eritme tamponu içerisinde çözüldü ve fenol/kloroform ekstraksiyonu aynen uygulandı (Resim 1).

Yöntem C'de dışkı süspansiyonu anti-HEV antikorlu yüksek titrede pozitif çıkmış bir serum ile 1/10 oranında karıştırıldı ve bir saat +4°C'de bekletildi. Daha sonra PEG 6000 (son konsantras-

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul

(2) Hôpital Antoine Beclère, Service de Microbiologie, Unité de Virologie et d'Immunologie, Clamart, Paris, Fransa



ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen RNA süspansiyonları aynı koşullarda revers transkripsiyona ve PZR'ye tabi tutuldu. Yöntem A (klasik fenol/kloroform) 1/10 000'deki pozitifliği saptarken, yöntem C'de 1/1000, yöntem B ve D'de 1/100'de pozitiflik saptanabildi. Deneyler bir kez daha tekrarlandı ve aynı sonuç elde edildi.

### İrdeleme

Birçok primat HEV ile deneysel olarak infekte edilebilmiştir (5-8,13). Maymunlarda özellikle de cynomolgus maymunlarında HEV infeksiyonu, insandakine kıyasla daha hafif seyretse de, deneysel infeksiyon için tekrarlanabilirliği olan bir model oluşturduğu söylenebilir (6,7,15). Böyle bir model hastalığın daha iyi tanımlanması ve epidemiyolojisinin aydınlatılması ve immünoprofilaksi çalışmaları için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Maymunda deneysel infeksiyon oluşturulabilmesinden bugüne dek hastalığın patogenezini birçok araştırmacı tarafından tanımlanmaya çalışılmıştır (13).

Virusun çeşitli vücut sıvıları ve çıkartılarında saptanmasında önceleri elektron mikroskopi (EM) ve immünelektron mikroskopi (İEM) kullanılmış, daha sonra genomun ayrıntılı analizinin yapılması ile PZR ile viral RNA'nın gösterilmesi sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (4,5,8,10). Biz bu çalışmada, infeksiyon ile ilgili üç parametre ile (karaciğer enzim aktivitesi, serum ve dışkıda viral genomun ortaya çıkışı ve anti-HEV antikorları) maymunda infeksiyonu izledik.

Deney hayvanında infeksiyonun, birçok çalışmada ortaya çıkan profiline bakılırsa ilk göze çarpan hemen her çalışmada virusun ilk olarak dışkıda PZR ile saptanmasıdır (5,6,7,8,13). Bu, ilk haftada ya da üçüncü haftanın başında olmaktadır. Bu çalışmada RT-PZR ile dışkıda viral RNA'nın ortaya çıkışı birinci haftanın sonunda olmuştur. Virusun serumda belirmesi (viremi) genellikle bundan birkaç gün sonra olmaktadır. Bu çalışmada viral RNA dışkı ve serumda aynı anda, inokülasyonun 7. gününde saptanmıştır. Bu paterni bildiren araştırmacılar vardır. Tsarev ve arkadaşları (8)'nin aynı inokulumu (SAR-55) kullandıkları ve beş cynomolgus maymunu ile deneysel HEV infeksiyonunu araştırdıkları çalışmalarında hayvanların birinde viral RNA dışkı ve serumda aynı anda saptanmıştır. Viremi maymunların 4'ünde 10 gün kadar, birinde ise üç hafta boyunca sürmüştür. Bu çalışmada da virüs serumda üç hafta boyunca saptanabilmiştir.

Virusun öncelikle dışkıda saptanması ilk olarak karaciğerin tutulması olarak yorumlanmaktadır. Karaciğerde replike olmaya başlayan virüs buradan safra yolu ile barsağa geçmekte ve dışkı ile çıkarılmaktadır. Bu sırada viremi de olmakta ve karaciğer hasarı-enzimlerin yükselmesi ve serokonversiyon-öncesi virüs kanıda saptanabilmektedir (5). Daha sonra gelişen bağışık yanıtla birlikte virüs kan ve karaciğerden temizlenmektedir (Şekil 1). Bu çalışmada da antikor yanıtının saptanmaya başladığı günde virusun önce kandan, birkaç gün sonra da dışkıdan (karaciğerden) elimine olduğu gözlenmektedir. Bağışık yanıt karaciğer hasarını artırmamakta ve hastalık tam iyileşme ile sonuçlanmaktadır.

Viral RNA'nın dışkıdan elde edilmesinde bugüne dek çok çeşitli yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerde sıklıkla guanidyum tiosüyanat kullanılmıştır (5,8,10,15). Çeşitli araştırmacılar buna bazı modifikasyonlar getirmişlerse de esas olarak Chomczynski ve Sacchi (11)'nin yöntemi kullanılmıştır. Biz de bu yöntemde göre hazırladığımız ve örneğin hepatit C virusunun serumdan eldesinde de başarı ile kullandığımız ve kullanılan (14) RNAzol B'yi proteinaz K-fenol/kloroform yöntemine göre daha az duyarlı bulduk. Yine çeşitli araştırmacıların viral partikülleri çöktürerek du-

yarılığını artırmak için kullandıkları PEG de bizim deneylerimizde proteinaz-K-fenol/kloroform yöntemine göre daha az duyarlı kaldı. Üstelik PEG konsantrasyonunun deneydeki miktarının artması ölçüsünde deneyin duyarlılığında azalma saptadık. Tsarev ve arkadaşları (15)'nin bir çalışmasında bizim de bu çalışmada kullandığımız inokulumun 1/100 000 dilüsyonunda RT-PZR ile pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Bizim elimizdeki inokulumun tamamını inokülasyon için kullanıldığından bu karşılaştırmayı yapma imkanı olmadı. Ancak biz de elimizdeki dışkı süspansiyonunda 1/10 000 dilüsyonda pozitif sonuç elde edebildik. Bu da deneyimizin duyarlılığının yeterli olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, standard bir inokulum kullanarak yaptığımız bu çalışmada deneysel infeksiyonun genel olarak saptanmış paternine oldukça uyan bir tablo elde ettik. Ayrıca, HEV ile ilgili genom analizi ve farklı suşların karakterizasyonu çalışmaları ve HEV infeksiyonunun kesin tanısında kullanılacak çok duyarlı bir nükleik asid eldesi ve RT-PZR yöntemi de optimize edildi.

### Kaynaklar

- Balayan MS, Andjaparidac AG, Savinskays, *et al.* Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20: 23-31
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JK, *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1337-9
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, *et al.* Hepatitis E virus (HEV). Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 185: 120-31
- Ray R, Aggarwal R, Salunke PN, *et al.* Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. *Lancet* 1991; 338: 783
- Jameel S, Durgapal H, Habibullah CM, Khuroo MS, Panda SK. Enteric non-A, non-B hepatitis. Epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 263-70
- Ticehurst J, Rhodes Jr. LL, Krawczynski K, *et al.* Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis* 1992; 165: 835-45
- Loger CF, Denny SL, Caudill JD, *et al.* Experimental hepatitis E. Pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Infect Dis* 1993; 168: 602-9
- Tsarev SA, Emerson SU, Tsareva TS, *et al.* Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis* 1993; 167: 1302-6
- McCausland KA, Bi S, Purdy MA, Bradley DW. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; 35: 331-42
- Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 559-63
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 1989; 339: 237-8
- Fields HA, Favorow MO, Margolis HS. The hepatitis E virus. A review. *J Clin Immunoassay* 1993; 16: 215-23
- Nolte FS, Thurmond C, Mitchell PS. Isolation of hepatitis C virus RNA from serum for reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 519-20
- Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, *et al.* Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys *J Med Virol* 1994; 43: 135-42