

Ülkemizdeki hepatit D virus genotipi

Hepatitis D virus genotype in our country

Çetin KARACA¹, Mürüvvet BOZACI², Filiz AKYÜZ¹, Kadir DEMİR¹, Fatih BEŞİŞİK¹, Yılmaz ÇAKALOĞLU¹, Selim BADUR², Atilla ÖKTEN¹, Sabahattin KAYMAKOĞLU¹

Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı¹, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı², İstanbul

Bu çalışmanın amacı; hepatit D virusu ile infekte kronik hepatitli hastalarda genotip tayini yapmaktır. Çalışma kapsamına 25 hasta alınmıştır. HDV-RNA Boom metodu, hepatit D virusu genotip tayini ise RT-PCR ve RFLP metodu ile çalışılmıştır. 22 hastada genotip I saptanmıştır. 3 hastada genotip tayini yapılamamıştır. Sonuç olarak; ülkemizdeki hepatit D virusu, genotip I'dir.

Anahtar sözcükler: Hepatit D virusu, genotip

The aim of this study was to identify hepatitis D virus genotypes in our chronic hepatitis D patients. Twenty-five patients with hepatitis D virus infection were enrolled in this study. HDV-RNA was extracted from the serum by Boom methods. Hepatitis D virus genotype was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods. Genotype I was found in 22 patients, and could not be determined in the remaining 3 patients. In conclusion, genotype I is the dominant hepatitis D virus genotype in our country.

Key words: Hepatitis D virus, genotype

GİRİŞ

Hepatit D virusu (HDV), sadece hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu olan kişilerde hastalık yapabilen, tek başına patojen olmayan defektif bir RNA virusudur. HDV'nin RNA genomu, insan hepatit viruslarından en küçük genoma sahip olanıdır ve 1700 baz çifti içerir (1). HDV'nin yüzeyel proteinleri HBV'nin yüzey antijeni tarafından oluşturulmaktadır. Üç genotipi vardır: I, II ve III. Genotipler coğrafi bölgelere göre farklılık gösterir (2). Dünyada en yaygın olanı genotip I'dir. Bu çalışmadaki amaç; kendi vakalarımızdaki HDV genotiplerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Haziran 2000, Aralık 2001 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Kliniği'ne başvuran, serumunda hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), anti-HDV total ve HDV-RNA (PCR) 6 aydan beri pozitif olan, kronik D hepatitli hastalar alınmıştır. Hepatit C virus antikor (anti-HCV) ve/veya "Human Immunodeficiency Virus" antikor (anti-HIV) pozitif olan hastalar çalışma kapsamına dahil edilmemiştir.

HBsAg (Hepanostika HBsAg Uni-Form II, Organon Teknika, Netherlands), anti- delta antikorları

(HDV Ab Dia.Pro., Diagnostic Bioprobes Srl., Italy), hepatit B e antijeni (HBeAg) ve antikor (anti-HBe) (Sanofi Pasteur Diagnostics, USA), anti-HCV (UBI HCV EIA 4.0, Organon Teknika, Netherlands) ve anti-HIV (Vironostika HIV Uni-Form II plus O kit, Organon Teknika, Netherlands) kitleri kullanılarak çalışılmıştır. Her bir kitin çalışma yöntemi mikro ELISA yöntemine dayanmaktadır.

HDV RNA PCR'ı ve genotiplendirme PCR'ı için HDV RNA 100 µl serum örneği kullanılarak silika (Boom) yöntemi ile elde edilmiştir (3). Daha sonra ekstraksiyonun 10 µl'si alınmış, 100 ng random primer (Roche; 1 034 731), 0.4 mM dNTP, 20 U RNAz inhibitörü (Sigma; R2520), 5 U AMV reverstranskriptase (Roche; 1 495 062) ve 1X tamponu ile toplam 25 µl hacimde revers transkripsiyon yapılarak komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir.

Tanı amacıyla HDV RNA PCR'ı reverstranskripsiyon nested PCR (RT- nested PCR) yöntemi ile yapılmıştır (4). Birinci PCR aşamasında; 10 mM Tris HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM 5413(5' – GCC CAG GTC GGA CCG CGA GGA GGT) ve 8276 primeri (5'- ACA AGG AGA GGC AGG ATC ACC GAC), 2.5 ünite Taq DNA po-

limeraz enzimi (Sigma; D1806) içeren PCR karışımı üzerine 5 µl cDNA eklenmiştir (toplam 50 µl hacim). PCR, karışım 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk 35 döngüyü takiben 72°C'de 10 dk tutularak gerçekleştirilmiştir. İkinci PCR aşaması; 5 µl birinci PCR ürünü, 54 14 (5'-GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG) ve 5415 (5'-GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA) primerleri kullanılarak birinci PCR aşamasındaki reaktif ve döngü koşullarında oluşturulmuştur. PCR sonuçları %1,5'lük agaroz jelde yürütülerek değerlendirilmiştir.

HDV genotipi RT-PCR ve RFLP metodu ile çalışılmıştır (5). PCR aşaması; 10 mM Tris HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM 900s (5'-GCC GAC CCG AAG AGG AAA G) ve 1280as (5'-GAA GGA AGG CCC TSG AGA ACA AGA) primerleri, 2.5 ünite Taq DNA polymerase enzimi (Sigma; D1806) içeren karışım üzerine 10 µl cDNA konarak toplam 50 µl hacimde, 94°C'de 9 dakikayı takiben 94°C'de 45 sn, 58°C 30 sn, 72°C'de 45 sn 40 döngü ve 72°C'de 10 dakika tutularak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek 405 baz çiftlik bantın varlığı araştırılmıştır. RFLP için; PCR ürünün 5 µl'si alınarak, 5 U SmaI enzimi (Fermentas; ER0662) ve 1X tamponu ile (toplam 20 µl hacimde) 30 °C'de gece boyu tutularak kesilmiştir. Kesme ürünleri %4'lük agaroz jelde yürütülerek incelenmiştir. Restriksi-

yon ürünleri; genotip I için 227+178, genotip II için 405, genotip III için 301+104 baz çiftidir.

BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 16'sı erkek toplam 25 hastanın yaş ortalaması 36.8±12.8 yıl idi. HDV genotipi 22 hastada genotip I idi. 3 hastada genotip tayini yapılamadı. Bir hasta hariç vakaların tümünde HBeAg/HBV-DNA negatif ve anti-HBe pozitif idi.

TARTIŞMA

Kronik D hepatiti, hepatotrop virüslara bağlı kronik viral hepatitlerin en seyrek görülenidir. Ancak sonuçları itibarı ile kronik B ve kronik C hepatiti-ne göre daha ciddi seyir göstermektedir. Bugün için HDV'nin 3 farklı genotipi bilinmektedir (6). HDV'nin genotip dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Kronik D hepatitinin endemik olduğu Akdeniz, Ortadoğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde genotip I, Uzak Doğu'da genotip II, Güney Amerika'nın kuzeyinde ise genotip III daha sık görülür (7). Çalışmamızda genotip tayini yaptığımız vakaların tümünde genotip I saptanmıştır. Ülkemiz HDV genotipi açısından Akdeniz, Ortadoğu ve Kuzey Afrika ülkeleri ile benzerlik göstermektedir. Sonuç olarak, ülkemizdeki HDV genotipi, genotip I'dir.

KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (d/anti-d) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
2. M, Hoyer B, Purcell R, Gerin J. Hepatitis delta virus infection. In: Vyas G, Dienstag J, Hoofnagle J, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Grune & Stratton, 1984: 371-7.
3. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 18: 495-503.
4. Niro, G. A. A. Smedile, A. Andriulli, et al. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology*. 1997; 25: 728-34.
5. Ivaniushina V, Radjev N, Alexeeva M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol* 2001; 82: 2709-18.
6. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, et al. A genotype hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9016-9020.
7. Yurdaydin C. Kronik Delta Hepatiti ve Tedavisi. *Gastroentero Hepatoloji* 2001; 12: 106-9.