

HIV – 1 PROVİRAL DNA'NIN PCR YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

DETECTION OF HIV – 1 PROVİRAL DNA BY PCR

Gülden YILMAZ*, Salih TÜRKÖĞLU*, Selim BADUR*
Nilgün İŞİK*, Mürüvet BOZACI*, Derya YÜKSEL*

Özet: Human immunodeficiency virus tip 1 (HIV-1) enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, rutin olarak serumda spesifik antikorların saptanmasından yararlanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksek olduğu için, özellikle perinatal enfeksiyonun erken ve doğru tanısında, kuşkulu Western blot (WB) sonucu elde edilenlerin ve riskli davranışta bulunan seronegatif kişilerin serokonversiyon öncesi incelemesinde, HIV-1 ve HIV-2'nin birlikte etken oldukları mikst enfeksiyonların tanısında, hastalığın ilerleyişini ve antiviral tedavinin etkisini izlemede önerilmektedir. Bu çalışmada çeşitli gruplardan toplam 57 kişide PCR yöntemi ile HIV-1 proviral DNA varlığı araştırılmış ve bulgular, incelenen grupta PCR yönteminin yeri ile birlikte tartışılmıştır.

Summary: Infection by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is routinely diagnosed by the detection of specific antibodies in serum. Particularly, because of its great sensitivity and specificity, polymerase chain reaction (PCR) is recommended for early and accurate diagnosis of perinatal infection, for investigation of people with indeterminate results, seronegative people with high risk behaviors prior to seroconversion, for detection of mixed infection by HIV-1 and HIV-2, for following the progression of the disease and the effect of antiviral therapy. In this study, 57 samples from various groups were investigated for HIV-1 proviral DNA by PCR and results and the importance of diagnosis by PCR in each group were discussed.

G İ R İ Ş

Human immunodeficiency virus tip 1 (HIV-1) ile enfeksiyonun laboratuvar tanısında kullanılan yöntemleri başlıca dört grupta incelemek mümkündür. Bunlar, spesifik HIV antikorlarının tayini, HIV antijeninin saptanması, hücre kültüründe virus izolasyonu ve virus genlerinin çoğaltılarak gösterilmesidir (1). Özellikle erişkinlerde ve onbeş aydan

* İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmütnoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

büyük çocuklarda HIV-1 enfeksiyonunun laboratuvar tanısında rutin olarak en sık kullanılan yöntem serumda HIV antikor tayinidir. Bu amaçla en sık uygulanan ilk aşama testi ELISA, tamamlayıcı (doğrulama) test ise Western blot (WB)'dur (2, 3). HIV-1 antikor testlerinin duyarlılığı ve özgüllüklerinin mükemmelliği pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Ancak bazı durumlarda serolojik yöntemlerle kesin sonuç alınmamakta ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-polymerase chain reaction) gibi viral genlerin çoğaltılmasında kullanılan moleküler yöntemler, zaman alıcı ve uygulanması güç kültür yöntemlerine gereksinim kalmaksızın bizi tanıya götürmektedir (4). HIV ile enfekte anneden doğan 15 aylıktan küçük bebeklerin ve HIV enfeksiyonu için riskli davranışta bulunmuş seronegatif kişilerin durumlarının aydınlatılmasında HIV-1 ve HIV-2'nin birlikte etken olduğu miks enfeksiyonların tanısında, kuşku Western blot (WB) sonucu elde edilenlerde, prognozu saptamada ve tedaviyi izlemede PCR tekniği tercih edilen yöntemdir (3, 5). Bu çalışmada farklı gruplarda HIV-1 proviral DNA'nın PCR ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 26 seropozitif olgunun yanısıra enfekte anneden doğmuş iki bebek, sekiz seropozitif eşi, dokuz kuşku WB sonuçlu, üç şüpheli temasta bulunmuş kişi ve doğrulama testi için gönderilen dokuz kişide olmak üzere toplam 57 kişide PCR yöntemi ile HIV-1 Proviral DNA'sı araştırılmıştır. Bu amaçla Amplificor™ HIV-1 test (Roche Diagnostic System, N.J.) kullanılmıştır.

İncelenecek kişilerin kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmış, proviral DNA tayini tam kandan izole edilen lökositlerden yapılmıştır. Lökositler Roche tarafından geliştirilen tam kanın lizisi yöntemi ile elde edilmiş ve ekstraksiyon aşamasına kadar -70 °C'de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu % 1 deterjan, % 0.01'den düşük konsantrasyonda Proteinase K içeren kit solüsyonu ile 60 °C'de 30 dakika tutularak yapılmıştır. Bu inkübasyonu takiben 100 °C'de 30 dakika daha tutularak örnekler amplifikasyon aşaması için hazırlanmıştır. Amplifikasyon biyotinle işaretli gag primer çifti (SK 462/431) kullanılarak termal amplifikatörde (Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600, Roche), 1 siklus 2 dakika 50 °C'de, 5 siklus 10 saniye 95 °C, 10 saniye 55 °C ve 10 saniye 72 °C'de ve 29 siklus 10 saniye 90 °C, 10 saniye 60 °C ve 10 saniye 72 °C'de tutularak yapılmıştır. 142 baz çifti uzunluğunda olan biyotinli PCR ürününün 100 µl'si üzerine 100 µl denatürasyon çözeltisi konarak 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Bunun 25 µl'si 100 µl hibridizasyon çözeltisine eklenerek, karışım kaptır-yakalama probu (SK 102) ile kaplı mikroçukurlara konmuş ve 1 saat 37 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda yıkama bir otomatik ELISA plak yıkayıcısında gerçekleştirilmiş ve avidin-horseradish peroksidazlı konjugattan 100 µl çukurlara konmuş, 15 dakika 37 °C'de bekletilmiş, son yıkama yapılmıştır. 100 µl tetrametilbenzidin-H₂O₂ çözeltisinin substrat olarak kullanıldığı deney, 10 dakika 20-25 °C'de inkübasyondan sonra durdurma çözeltisi ile durdurulmuş ve derhal 450 nm dalga boyunda filtre ile ölçüm yapan otomatik ELISA plak okuyucusu ile okunmuştur. Optik dansitesi 0.350'nin üzerinde okunan değerler pozitif kabul edilmiştir.

B U L G U L A R

İncelemeye alınan 26 seropozitif olgudan 23'ünde PCR testi pozitif sonuç vermiş, proviral DNA saptanamayan üç olgudan ise, tekrar kan örneği alınarak, yeniden ekstraksiyon yapılmış ve ikinci PCR çalışmaları pozitif sonuç vermiştir. Benzer şekilde seropozitif olguların eşlerine ait örneklerden, anti-HIV varlığı belirlenen üçünün PCR'ları pozitif sonuç vermiştir. Buna karşılık yine seropozitif eşi olup, anti-HIV araştırması negatif sonuç veren beş olgu; kuşkulu WB profili gösteren dokuz olgu; şüpheli temas sonrası izlenen üç olgu ve doğrulama testi için laboratuvarımıza gönderilen dokuz olguda PCR çalışması negatif sonuç vermiştir (Tablo 1).

Tablo 1
İncelemeye Alınan 57 Kişinin PCR Sonuçları

Grup	Sayı	P C R	
		(+)	(-)
1. HIV seropozitif	26	23	3*
2. Enfekte anneden doğan bebek ELISA (+), WB (+)	2	-	2
3. ELISA seropozitif eşi			
a) ELISA (+), WB (+)	3	3	-
b) ELISA (-), WB (-)	5	-	5
4. Kuşkulu WB sonuçlu, ELISA (+)	9	-	9
5. Şüpheli temas ELISA (-)	3	-	3
6. Doğrulama için gönderilen			
a) ELISA (+), WB (-)	4	-	4
b) ELISA (-)	5	-	5
Toplam	57	26	31

* Deney yinelenmesinde pozitif sonuç elde edilmiştir.

T A R T I Ş M A

Bir RNA virusu olan HIV konak hücrenin enfeksiyonunu takiben revers transkriptaz enzimini kullanarak RNA'sından DNA kopyasını oluşturur. Oluşan bu DNA konak hücre DNA'sına integre olarak proviral DNA adını alır (1). HIV enfeksiyonu tanısında PCR yöntemi iki şekilde uygulanabilir. Proviral DNA ya da HIV RNA'sı in vitro şartlarda cDNA'ya çevrilerek çoğaltılabilmektedir. PCR ile HIV-1 RNA'sının cDNA'ya çevrilerek çoğaltıldığı çalışmalar sınırlı sayıda ve çocuklarda tanıda DNA PCR'ına göre daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ancak PCR ile HIV-1 RNA tayininin klinik hastalığa hangi çocuğun hızla yakalanacağı konusunda daha kesin ipucu verdiğini gösteren çalışmalar vardır (5, 6). Erişkinlerde HIV DNA'sını tayinde PCR'in duyarlılığı % 97 - % 100 olarak bildirilmiştir (1). Neonatal ve pediatrik olgularda HIV DNA'sını saptamada PCR tam amacı ile kullanıldığında, her yaş grubunda özgüllüğün duyarlılıktan daha iyi olduğu,

duyarlılığın yaş ilerledikçe artarak 6 aydan sonra % 100'e ulaştığı ve üç aydan küçük çocuklarda ise bu konuda verilerin henüz az olduğu bildirilmiştir (3, 4). Bu çalışmada PCR yöntemi ile HIV proviral DNA'sı çoğaltılmıştır. Yöntemin duyarlılığını tayin için 26 seropozitif kişi incelenmiş ve 23 kişide PCR yöntemi ile reaktif sonuç elde edilmiştir (% 90). Negatif sonuç elde edilen üç kişinin ikinci kez yinelenen PCR'ı pozitif sonuç vermiştir. HIV PCR'ı duyarlılığını artırmak için bir örnekte birden fazla PCR uygulamasını önerenler de vardır (3). Bu durumda bizim serimizde yer alan 26 örnekten 26'sında pozitif sonuç elde edilerek duyarlılık % 100'e ulaşmaktadır.

HIV ile enfekte anneden doğan bebeklerin erken tanısı önem taşımaktadır; çünkü enfekte bebeklerin genellikle neonatal dönemde tanıya götürücü klinik ve biyolojik belirtileri yoktur ve tanı konduğu takdirde spesifik anti-viral tedaviye başlanabilmektedir (7). Maternal antikörlerin transplasental transferi, 15. aya kadar HIV enfeksiyonunun serolojik tanısını güçleştirmektedir. Bu durumda gerçekten enfekte olmuş bir olgunun belirlenmesinde PCR, kültür ve antijen tayinine göre daha duyarlıdır. Spesifik IgM cinsi antikörlerin duyarlılığı azdır. Yenidoğan döneminde spesifik IgA tayini ve periferik kan mononükleer hücrelerinden in vitro antikör üretimi ümit vericidir. Ancak ek çalışmalara gereksinim vardır (5, 7). Bu çalışmada HIV ile enfekte annelerden doğmuş Türkiye'deki bilinen iki bebeğin çeşitli aylarda alınan kanları incelenmiştir (8). İki aylık iken kanı alınan ilk bebeğin ve 3 ve 5.5 aylık iken kanı alınan ikinci bebeğin periferik mononükleer hücrelerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre bebeklerin enfekte olmadığı, ELISA ve WB ile saptanan spesifik antikörlerin maternal kökenli olduğu düşünülmüştür. Ancak maternal enfeksiyonun gestasyonun 8. haftası gibi çok erken dönemde olabileceği gibi doğum sırasında da olabileceği bilinmektedir (5). Bu durumda yenidoğanda yalancı negatiflik elde edilebileceğinden ve ilk üç ay için PCR'ın duyarlılığı ile ilgili veriler yetersiz olduğu için bebekler takibe alınmıştır. 15. aya kadar mümkün olursa takip edileceklerdir.

HIV için riskli davranışlarda bulunan seronegatif kişilerde, serolojik yöntemlerle PCR kullanımını karşılaştıran çalışmalar devam etmekte ve ilk verilere göre serolojik bulguların genelde PCR sonuçları ile uygunluk içinde olduğu bildirilmekte, HIV seronegatif olanlarda PCR pozitifliği varsa bile bu durumun çok nadir olabileceği belirtilmektedir (3). Bu amaçla çalışmamızda 8 seropozitif eşi ve şüpheli temasta bulunan 3 kişi incelenmiş ve PCR sonuçları serolojik bulgularla uygun sonuç vermiştir.

Çeşitli çalışmalarda ELISA ile pozitif sonuç elde edilen örneklerin % 3.2 - % 58 gibi değişik oranlarında kuşku WB sonucu elde edildiği bildirilmiştir (9). Bu tür kuşku WB sonucu elde edilen risk grubundan kişiler takip edildiklerinde % 4.5 gibi düşük oranda serokonversiyon oluşmuştur. Özellikle WB ile P24 bandı elde edilenlerde serokonversiyon oranı yüksektir. O halde risk grubundan kişilerde WB yöntemi ile kuşku sonuç elde edildiğinde özellikle P24 bandı söz konusu ise, serumun henüz antikörlerin tam oluşmadığı serokonversiyon dönemine ait olma olasılığının yüksek olduğu düşünülmelidir. Ancak ELISA ve PCR ile negatif kişilerin % 20 - % 30'unda kuşku WB sonucu elde edilebileceği bildirilmiştir. Bu nonspesifik bandlar hasta

serumunda bulunan ve HIV antijenine bağılı olmayan antikorlardan kaynaklanabilir. Kişilerin serumunda ELISA pozitifliğinin yanında kuşkulu WB sonucu elde edildiğinde kişiler takibe alınır. Bir ay sonra WB sonucunda band artışı olmaz ise ve kişi risk grubundan değilse HIV açısından daha fazla izlenmez. Kişi risk gruplarında ise, antikor tayini dışındaki diğer üç yöntem gereksinim vardır. Bunlar arasında PCR ile genomun belirli segmentlerinin çoğaltılarak saptanması en duyarlı ve uygulanması kolay yöntemdir (9, 10, 11). Bu çalışmada kuşkulu WB sonuçlu 9 kişide, gerek serolojik olarak bir ay sonra tekrar inceleyerek ve gerekse PCR yöntemi ile HIV enfeksiyonunun söz konusu olmadığı saptanmıştır.

PCR için kullanılan örnek genelde periferik kan mononükleer hücreleridir ve EDTA'lı kandan Ficoll-Hypaque ayırma yöntemi ile elde edilir. Ayrıca idrar, süt, plazma, servikal örnek, taze ya da formalinle fikse doku ve beyin-omurilik sıvısından PCR çalışmaları yapılmaktadır (5, 6). Çalışmamızda tam kandan izole edilen lökositlerden DNA ekstraksiyonu organik eritici kullanılmadan yapılmıştır. Porfirin Taq polimerase inhibitörü olduğu için hücre izolasyonu aşamasında eritrositler, tamamen eritilip uzaklaştırılmıştır (6).

Belirtilen tüm olumlu özelliklerine karşın, PCR'in henüz standardizasyonu tam olarak gerçekleştirilememiştir.

PCR'nın İki Potansiyel Problemi Vardır :

1. Yalancı Negatiflik : PCR çok duyarlı bir yöntem olmasına rağmen çoğaltılacak hedef DNA miktarı özellikle HIV tanısında sınırlayıcı bir faktördür. Çünkü HIV ile enfeksiyon sırasında enfeksiyonun evresine göre değişmekle birlikte periferik hücrelerin çok azı enfektedir. Ancak kantitatif PCR çalışmalarının uygulanmasıyla HIV ile enfeksiyon sırasında gerçekten enfekte hücre sayısının her zaman sanıldığı kadar düşük olmadığı anlaşılmıştır. Önceleri hibridizasyon bulgularına göre periferik lökositlerden 10^4 - 10^5 den birinin enfekte olduğu sanılırken kantitatif PCR uygulamaları sonucu asemptomatik kişilerde 1000 periferik mononükleer hücreden birinin, semptomatik kişilerde ise 10 hücreden birinin enfekte olabileceği gösterilmiştir. Ancak bu sayı daha da düşük olabilmektedir. Ayrıca HIV genomu değişkenlik gösterebilmektedir. İşte bu nedenle bir örnekten birden fazla PCR önerenler vardır. Ayrıca primer seçimi önem taşımaktadır. Diğer Retroviruslar ile homolojiye rağmen en az değişken bölge seçilmelidir. Bu nedenle Gag ve Pol dizileri hedef alınmaktadır. Duyarlılığı artırmak için iki, hatta üç primer çifti önerenler vardır (3, 6, 12). Bu çalışmada biyotinle işaretli pag primerleri (SK 462/431) kullanılmıştır.

2. Yalancı Pozitiflik : PCR'ı çok önemli kılan aşırı duyarlılık özelliği, yalancı pozitiflik olasılığını artırmaktadır. Yalancı pozitifliğe yol açabilecek en önemli kontaminasyon nedeni bir önceki amplifikasyon ürünleridir. Bu çalışmada kullanılan ticari kitle, oluşan ürünlerin doğal DNA'dakinden farklı olarak deoksiuridine triphosphate (DUTP) içermesi sağlanarak ve bir önceki ürünlerin N-glycosylase ile eliminasyonu kullanılarak bu tür oluşacak yalancı pozitiflik önlenmiştir (6, 13).

HIV enfeksiyonu tanısında PCR, kültür ve antijen için veriler değerlendirildiğinde, tüm yaş gruplarında kültürün en spesifik yöntem olduğu, p24 antijen tayinin ve PCR'in nadir de olsa yalancı pozitiflik verebileceği; en duyarlı yöntemin PCR olduğu, üç yöntemin de duyarlılığının ilk üç ayda az olduğu; 6 ayın üzerinde üç yöntemin de duyarlılığının artarak % 90 - % 100'e ulaştığı bildirilmektedir (5).

Son yıllarda PCR tekniği, HIV enfeksiyonu patogenezinin anlaşılmasına büyük katkıda bulunmuş ve tanıya yukarıda belirtilen durumlarda yardımcı olmuştur. Ancak deneyimsiz ellerde PCR'in henüz güvenilir bir tanı aracı olmadığı unutulmamalıdır. Bu nedenle Amerika Birleşik Devletleri'nde PCR uygulanan laboratuvarlar kalite kontrol programlarına alınmakta ve çalışmaları denetlenmektedir. Bu çalışmalarda mutlaka ticari standardize edilmiş iki PCR kitinden biri de (Roche Amplicor assay ya da Perkin-Elmer ve Gen-Probe assay) kullanılmaktadır (1, 4).

Çalışma kapsamına alınan 57 kişiden enfekte oldukları serolojik olarak kanıtlanmış 26 seropozitif kişide standardize edilmiş ticari PCR kiti kullanılarak Roche Diagnostic System, N.J. kitinin duyarlılığı araştırılmış ve duyarlılığı literatüre uygun şekilde ilk uygulamada % 90 ve negatif sonuç elde edilenlerde işlem en başından tekrar edildiğinde % 100 bulunmuştur. Ayrıca serolojik bulguların tanıda yeterli olmadığı enfekte anneden doğan iki bebekte, serolojik bulgular pozitif sonuç verdiği halde PCR ile negatif sonuç elde edilmiştir. Bu durumda PCR'in gerçek durumu yansıttığı düşünülmüş, seropozitiflik maternal antikorlara bağlanmış fakat bebekler 15. aya kadar takibe alınmıştır. Yine HIV tanısında sadece serolojinin yeterli olmadığı 8 HIV seropozitif eşi ve 9 kuşkulu WB sonuçlu kişi incelemeye tabi tutulmuş ve PCR verilerinin serolojik verileri desteklediği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Proffitt MR, Yen-Lieberman B: Laboratory diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Infect Dis Clin North America*, 1993, 7: 203-219.
2. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM: Supplemental tests for HIV-1 infection. p. 59-87. In: *Retroviral Testing Essentials for Quality Control and Laboratory Diagnosis*, 1992, CRS Press, Florida.
3. Albert J, Fenyö EM: Diagnosis of human immunodeficiency virus infection by polymerase chain reaction. p. 3-23. In: Becker Y, Darai G (eds), *Diagnosis of Human Viruses by Polymerase Chain Reaction Technology*, 1992, Springer-Verlag, Berlin.
4. Jackson JB, Drew J, Lin HJ, Otto P, Bremer JW, Hollinger FB, Wolinsky SM: Establishment of a quality assurance program for human immunodeficiency virus type I DNA polymerase chain reaction assays by the AIDS clinical trials group. *J Clin Microbiol*, 1993, 91: 3123-3128.
5. Sison AV, Campos JM: Laboratory methods for early detection of human immunodeficiency virus type I in newborns and infants. *Clin Microbiol Rev*, 1992, 5: 238-247.
6. Jung M, Candotti D, Huraux JM, Agut H: Polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus diagnosis: Principles, parameters, application and pitfalls. *Bull Inst Pasteur*, 1992, 90: 31-43.
7. Garbarg-Chenon A, Segondy M, Conge AM, et al: Virus isolation, polymerase chain reaction and in vitro antibody production for the diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection. *J Virol Method*, 1993, 42: 117-126.

HIV-1 PROVİRAL DNA

8. Türkođlu S, Yılmaz G, Çiđdem A, Aydın UN, Yılmaz N, Badur S: HIV-1 ile infekte aneden doğan bebekte, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile proviral DNA'nın varlığının araştırılması. İ.Ü. 17. Kurultayı Özet Kitabı, s. 251, 1993.
9. Provolotsky J, Jonathan WMG, Nancy C, Baron P, Armstrong D: Differences in HIV-1 anti-p24 reactivities in serum of HIV-1 infected and uninfected subjects: Analysis of indeterminate Western blot reactions. *J Infect Dis*, 1991, 163: 247-251.
10. Schleupner CJ: Detection of HIV-1 infection, p. 1092-1102. In Mandell GL, Douglas RG, Benett J (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1990, Churchill Livingstone, New York.
11. Kleinman S: The significance of HIV-1 indeterminate Western blot results in blood donor populations. *Arch Pathol Lab Med*, 1990, 114: 283-303.
12. Levy JA: Pathogenesis of HIV infection. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 183-189.
13. Rys PN, Persing DH: Preventing false positives. Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 2356-2360.