

İNFEKSİYON HASTALIKLARININ TEDAVİSİNİ İZLEMEDE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİNİN ÖNEMİ

Selda ERENŞOY

Nükleik asitlerin kantitatif analizinde moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılabilirliği ile birlikte, bu teknolojinin klinik mikrobiyolojideki yeri, getirdiği avantajlar ve anlamı tartışılmaya başlamıştır. Bu teknolojinin rutin kullanıma girdiği ilk alan hepatit B virus enfeksiyonudur(3,9). Doğrudan hibridizasyon yöntemi ile serumdaki serbest virus, özgül DNA'nın kantitatif analizi ile belirlenebilmektedir. Sıvı hibridizasyonu veya hibrid yakalama gibi prensiplerin kullanıldığı HBV DNA testlerinde bir ml serum/plazmada 1-10 pg HBV DNA saptanabilmektedir(12). Viremi düzeyinin daha düşük olduğu ve hibridizasyon testlerinin duyarlılığının yetersiz olduğu HIV ve HCV gibi enfeksiyonlarda ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi nükleik asit amplifikasyonu gerekmektedir. Kantitatif PCR gereksinimi ile önce hibridizasyon testlerindeki gibi standart dışı panellerle elde edilen eğrilerden viral nükleik asit miktarı belirlenmeye çalışılmıştır(6). Ancak her örnekteki PCR etkinliği değişebileceğinden, bu yöntemler başarılı olmamıştır. Bu amaçla her örnek içine doğal nükleik asit ile birlikte amplifiye edilen dizi farkı olan, kopya sayısı bilinen DNA/RNA katılarak yarışmalı PCR denenmiştir(15). Benzer prensipten yola çıkılarak iç kontrollerin kullanıldığı, koamplifikasyona dayalı daha standart ticari testler geliştirilmiştir (Amplikor Monitor; Roche Molecular Systems). PCR gibi hedef nükleik asitleri çoğaltan nükleik asit dizisine dayalı amplifikasyonda (NASBA; Organon Teknika) da iç kontrollerle kantifikasyon sağlanmakta, transkripsiyona dayalı amplifikasyonda (TMA; Gen Probe) ise standart panel kullanılmaktadır. Hedef nükleik asitleri çoğaltmayan ancak sinyal amplifikasyon yöntemi olan dallı DNA (Quantiplex; Chiron) ve prob amplifikasyonu olan Q-beta replikaz (Gene Trak) gibi testler ise daha stabildir ve standart paneller yeterli olmaktadır.

Virus yükünün ölçülebilmesi ile prognoz ve tedaviye yanıt öngörülebilmektedir. Moleküler yöntemlerin, tedavi endikasyonunun konulması, tedavi rejiminin seçilmesi ve etkinliğinin izlenmesinde yer alması için bu testlerin güvenilir, ulaşılabilir olması ve daha basit testlerin yetersizliği veya olmaması gerekmektedir. Doğrudan etkene yönelik olduklarından dinamik ve erken fikir veren testlerdir. Hastalık mekanizmaları iyi anlaşıldığında, laboratuvar testleri de hem klinik araştırmalar hem de hasta yönetiminde yararlıdır. Bu tanımlamalara en çok uyan ve bu testlerin yerini bulduğu, deneyiminin en çok biriktiği enfeksiyonlar HIV ve viral hepatitlerdir.

HIV enfeksiyonunda plazmadaki HIV RNA miktarının doğru ölçülebilmesi ile hem viral dinamikler ve patogenezin araştırılmasında, hem de daha etkili tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir araç olmuştur. HIV/AIDS'de viral yük (HIV RNA düzeyi) ölçümünün gerekliliği artık kabul edilmiştir. HIV enfeksiyonu tanısı konulduğunda baz değerler alınmalıdır. Enfeksiyonun erken döneminde, immun sistemin fonksiyonu henüz bozulmadan ve klinik progresyon riski düşükken antiretroviral tedaviye başlamak gerektiği bilinmektedir. CD4+ hücre sayısındaki düşüklük immun sistemde ortaya çıkmış hasarı gösterir. Klinik bulgu yokken, CD4+ hücre sayısı normal iken bile plazma HIV RNA düzeyi 30,000-50,000/ml'nin üzerinde ise tedavi önerilmektedir(2,14). 5000-10000/ml'nin üzerinde ise olguya göre tedavi düşünülmelidir. Tedavi başladıktan 3-4 hafta sonra viral yük ile tedavinin etkinliği araştırılmalı; en az 0.5 log düşüş yoksa tedavi değiştirilmelidir(14). Viral yükteki artma tedavi etkinliğinin yitirildiğini, diren-

cin ortaya çıktığını gösterir. Direnç ile ilişkili genetik diziler moleküler biyolojik yöntemlerle araştırılabilir(13). Özellikle dirençli kökenlerin artması ve bulaşması nedeniyle tedaviye başlarken direnç araştırılmasının yeri değerlendirilmektedir. Tedavi rejimlerinin lenforetiküler dokular, santral sinir sistemi ve genital yol gibi diğer kompartmanlarda benzer viral supresyonu sağlayıp sağlamadığını belirleyebilmek için bu bölgelerde kantitatif HIV RNA testleri üzerinde çalışılmaktadır.

HBV enfeksiyonunda, HBV DNA düzeyi viral replikasyonun iyi bir göstergesidir ve kronik hepatit B tedavisine başlamada ve etkinliğini değerlendirmede anlamlıdır(11). HBeAg de replikasyonla ilişkili olmakla birlikte, yeterli değildir; pre-core mutantlarda HBV replikasyonuna rağmen HBeAg oluşmaz. HBV DNA saptanması için çeşitli teknikler geliştirilmiştir; işaretli problemlarla yapılan hibridizasyon testleri ile kantitatif sonuçlar alınabilir. Duyarlılıkları düşüktür, 1 pg/ml'nin altını saptayamaz (3×10^5 virus partikülü)(17). HBV enfeksiyonunda genellikle bu duyarlılık yeterlidir. Amplifikasyon yöntemleri ise daha duyarlıdır, kronik B hepatitinde HBsAg ve anti-HBe olumlularda replikasyonu araştırmak için kullanılabilir. Klinik kullanımda kantitatif değerler gerekebilir. Karaciğer transplantasyonundan sonra greftin HBV enfeksiyonu riskini değerlendirmede kullanılır(12,17). Ayrıca antiviral tedavinin etkinliğinin 10 pg/ml düzeyinin altında izlenebilmesini sağlar. Ancak yalancı olumluluk/olumsuzluk ve PCR testlerinin standardizasyonundaki zorluk dikkate alınmalıdır. Çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda ciddi standardizasyon sorunları vardır. Bu nedenle PCR testinin yorumu dikkatle yapılmalıdır. Özel durumlar dışında hibridizasyon testleri yeterlidir. Dalı DNA hibridizasyon testinde duyarlılık 10^6 genom/ml'dir(17).

Hepatit C virus enfeksiyonunda, tedaviye yanıtı etkileyen çeşitli faktörler vardır; karaciğerdeki yangının derecesi ve fibrozis, HCV RNA düzeyleri, HCV genotipi, HCV genomundaki heterojenite önemli etkenlerdir(10,18). Kronik HCV enfeksiyonunda tedaviye uzun süreli yanıt oranının düşük olması nedeniyle başlamadan önce yanıtın öngörülebilmesi anlamlıdır. Tedavi sırasında etkinliğin değerlendirilebilmesi de, tedaviye devam etmek ya da değiştirmek için gereklidir. Serum veya plazmada HCV RNA araştırılması bu anlamda en değerli yöntemdir. Tedavi öncesi HCV düzeyi ve HCV genotipinin kalıcı yanıtla ilişkili başlıca ve birbirinden bağımsız faktörler olduğu gösterilmiştir(4,10). Karino ve arkadaşlarının(7) çalışmasında serum HCV düzeyleri 0.5 Meq/ml'den düşük hastaların %70'inde, 0.5 Meq/ml'nin üzerindeki ise % 9.5'inde kalıcı yanıt alınırken, 7 Meq/ml'nin üzerindeki hiçbirinde kalıcı yanıt olmadığı bildirilmektedir. Yamada ve arkadaşlarının(16) bildirdiği gibi bu çalışmada da IFN'a yanıtı öngörmeye en anlamlı faktör HCV RNA düzeyleridir. HCV RNA düzeylerinin araştırılması ile uygun hasta seçimi yapılabilecektir. Ancak tedavi sırasında uygun HCV RNA testi ile izlem de gereklidir; başlangıç HCV RNA düzeyleri düşük olmasına karşın bazı hastalar IFN'a yanıt vermemekte ya da tedavi kesildikten sonra nöksler olmaktadır. HCV genotip 1b'nin tedaviye yanıtının kötü olduğu, 2 ve 3'ün ise daha iyi yanıt verdiği bilinmektedir(7). Viral heterojenite ile ortaya çıkan türümsü çeşitliliğinin de karaciğer hastalığı ve IFN'a yanıtı ile ilişkili bağımsız bir faktör olduğu öne sürülmektedir(5,8).

HCV genomunun çok heterojen olmasının, hem virolojik hem de klinik etkileri vardır. Virus, dolaşımında düşük düzeylerde bulunmaktadır. Bu da HCV RNA'nın saptanması ve düzeyinin ölçülebilmesi için duyarlılığı yüksek testleri gerektirmektedir. HCV ile ilgili bilgiler hızla birikmiştir, ancak çelişkili verilerle tartışmalar da artmıştır. HCV genotiplerinin ve vireminin anlamı ve sonuçları iki önemli konudur. Kolay ulaşılabilir bir hayvan modelinin ve hücre kültür sisteminin olmaması nedeniyle moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması zorunludur. Bu yöntemlerin standardizas-

yon ve optimizasyonundaki zorluk altın standart geliştirmede sıkıntı yaratmaktadır. Genotiplemede en kesin yöntem HCV nükleotid dizisinin tam analizi, filogenetik ağaç yapısının ortaya çıkarılması ve karışık genotipleri de saptayabilmek için tüm popülasyonu temsil edecek şekilde çeşitli klonların çalışılmasıdır. Ancak bu yöntem kolay değildir ve klinik çalışmalar için uygun değildir. Özgül primerlerle PCR, özgül problarla hibridizasyon ve RFLP gibi yöntemler duyarlılık ve özgüllükle ilişkili sınırlılıkları olsa da daha pratiktir ve klinik uygulamada değerlidirler(10).

Serum veya plazmadaki HCV RNA düzeylerinin ölçülmesi HCV enfeksiyonunun yönetiminde en önemli araçtır. Hem viral replikasyon hızını hem de virusun temizlenmesini yansıtır. Bu amaçla en fazla kullanılan iki farklı yöntem vardır; kantitatif PCR gibi hedefin amplifikasyonu ve dallı DNA gibi sinyal amplifikasyon yöntemleri en yaygın kullanılanlardır. Çeşitli laboratuvarların kendilerinin düzenledikleri kantitatif PCR testleri tanımlanmış olsa da etkinlikleri değişkendir ve standardize edilememektedirler. Kit formatında olan Amplicor Monitor testinin dinamik aralığı 1000-10⁶ RNA kopyası/ml'dir. Bu testin önemli bir sınırlılığı, etkinliğinin HCV genotiplerine göre değişmesidir(5). Genotip 1'e göre 2'de % 11, 3'de ise % 8 değer vermektedir. Bu nedenle değerlendirme yapılırken genotip 2'de bulunan miktarın 9 katı, 3'de 12 katı hesaplanmalıdır. 2 ve 3 için fark bir log içindedir, ancak genotip 4'de farkın iki log olabileceği bildirilmiştir(5). Tüm genotipleri benzer etkinlikte saptayacak modifikasyon üzerinde çalışılmaktadır. Dallı DNA testinin (Quantiplex) duyarlılığı daha düşüktür; ikinci versiyonunda, ml'de 200,000 RNA genomu karşılığı saptanabilmektedir. Tedavi almamış hastaların % 90'ında HCV RNA düzeyi bunun üstünde olsa da, tedavi izleminde bu duyarlılık yetersizdir. Testteki modifikasyonla bu düzey 50 RNA kopyasına indirilmeye çalışılmaktadır. Genotipler arasında anlamlı bir etkinlik farkı yoktur. Bu testin birinci versiyonunda genotip 2 ve 3'deki etkinlik daha düşüktür ve bu testin kullanıldığı çalışmalar değerlendirilirken genotip 2, düzeltme faktörü 3 ile, 3 ise 2 ile çarpılmalıdır. Bu düzeltmeler yapıldığında, eskiden kabul edilenin aksine HCV genotipi ile RNA düzeyi arasında bir ilişki olmadığı anlaşılmıştır; genotipin prognoz ve IFN tedavisine yanıt üzerindeki etkisi farklı bir mekanizma ile olmalıdır(5).

IFN tedavisinin 4. haftasında serumda HCV RNA olumluluğu kalıcı yanıt aleyhindedir; IFN tedavisinin kesilerek başka bir tedaviye geçilmesi, tedavi rejiminin yoğunlaştırılması veya kombine edilmesi önerilmektedir. Daha erken dönemde, tedavinin birinci haftasında HCV RNA olumsuzluğunun kalıcı yanıt lehine daha üstün bir gösterge olduğu öne sürülmektedir(7). Karino ve arkadaşlarının(7) çalışmasında, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek modifiye Amplicor testi ile HCV RNA'sı 1. haftada kaybolanların % 75.9'unda, 2. haftada kaybolanların % 35.7'sinde, 4. haftada kaybolanların ise ancak % 12.5'inde kalıcı yanıt sağlandığı bildirilmektedir. Tedavi izleminde duyarlılığı yüksek bir HCV RNA testi kullanılmalıdır.

Sitomegalovirus enfeksiyonunda da gansiklovir tedavisinin duyarlı CMV DNA testi ile izlenebileceği, antijenemi testi ile uyumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir(1).

Moleküler biyolojik yöntemler, viral enfeksiyonların tedavisinde önemli bir dönem başlatmıştır. Tedaviye başlarken viral yükün yanı sıra, HCV'de olduğu gibi genotipin belirlenmesi ve HIV'de olduğu gibi dirençten sorumlu genetik dizilerin araştırılması tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli araçlardır. Ayrıca protokollerin saptanması ve yeni ilaçların geliştirilmesindeki yerleri de yadsınamaz. Kantitatif testlerle tedavinin etkinliğinin izlenmesi ve erken dönemde değişikliklerin yapılması olasıdır. Ancak sınırlılıkları hep göz önünde bulundurulmalıdır. Bunların aşılması için yapılan çalışmalar dikkatle izlenmeli ve değerlendirmeye alınmalıdır. HIV RNA için sadece plazma kullanılmakla birlikte HBV DNA ve HCV RNA gibi diğer testlerde şimdilik se-

rum veya plazma kullanılabilir. Ancak plazma ile duyarlılığın önemli ölçüde arttığı da bildirilmektedir. Ayrıca uygun antikoagulanın kullanılması gereklidir, örneğin PCR'da inhibitör olduğu için heparin kesinlikle kullanılmamalıdır. Bir hastanın izleminde hep aynı şekilde örnek alınmalı ve aynı test kullanılmalıdır. Testin duyarlılığı, dinamik aralığı dikkate alınmalıdır. Klinisyenle laboratuvar arasındaki ilişki ve işbirliğinden kesinlikle ödün verilmemelidir. Uygun örnek toplanması ve saklanması testin yorumuna kadar standardizasyonu sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- Caballero OL, Menezes CLP, Costa MCSL et al.: Highly sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients, *J Clin Microbiol* 35:3192 (1997).
- 2- Coffin JM: HIV viral dynamics, *AIDS* 10 (Suppl 3):S75 (1996).
- 3- Dusheiko G, Xu J, Zuckermann AJ: Clinical diagnosis of hepatitis B infection: application of polymerase chain reaction, "Becker Y, Darai G (eds): *Diagnosis of Human Viruses by Polymerase Chain Reaction Technology*" kitabında s.67, Springer Verlag, Berlin (1992).
- 4- Gretch DR: Diagnostic tests for hepatitis C, *Hepatology* 26 (Suppl 1):43S (1997).
- 5- Hawkins A, Davidson F, Simmonds P: Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1 and 2, and 3 by Quantiplex HCV RNA assay versions 1 and 2, Roche Monitor assay, and an in-house limiting dilution method, *J Clin Microbiol* 35:187 (1997).
- 6- Holodny M, Katzenstein DA, Sengupta S et al.: Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction, *J Infect Dis* 163:862 (1991).
- 7- Karino Y, Jouji T, Sugawara M et al.: Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C, *J Gastroenterol* 92:61 (1997).
- 8- Koizumi K, Enomoto N, Kurosaki M et al.: Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C infection and its significance in interferon treatment, *Hepatology* 22:30 (1995).
- 9- Krogsgaard K: Hepatitis B virus DNA in serum. Applied molecular biology in the evaluation of hepatitis B infection, *Liver* 8:257 (1988).
- 10- Ohno T, Lau JYN: The "gold standard", accuracy, and the current concepts: Hepatitis C virus genotype and viremia, *Hepatology* 24:1312 (1996).
- 11- Perrillo R, Mimms L, Schectman K, Robbins D, Campbell C: Monitoring of antiviral therapy with HBV DNA testing, *Hepatology* 18:1306 (1993).
- 12- Quint WGV, Heijtkink RA, Schirm J, Gerlich WH, Niesters HGM: Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection, *J Clin Microbiol* 33:225 (1995).
- 13- Richman DD: Drug resistance and its implications in the management of HIV infection, *Antiviral Therapy* 2 (Suppl 4):41 (1997).
- 14- Saag MS, Holodny M, Kuritzkes DR et al.: HIV viral load markers in clinical practice, *Nature Med* 2:425 (1996).
- 15- Scadden DT, Wang Z, Groopman JE: Quantification of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA by competitive polymerase chain reaction, *J Infect Dis* 165:1119 (1992).
- 16- Yamada G, Takatani M, Kishi F et al.: Efficacy of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C patients depends primarily on hepatitis C virus RNA level, *Hepatology* 22:1351 (1995).
- 17- Zaaijer HL, Borg FTER, Cuypers HTM, Hermus MCAH, Lelie PN: Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA, *J Clin Microbiol* 32:2088 (1994).
- 18- Zeuzem S, Franke A, Lee JH, Herrmann G, Ruster B, Roth WK: Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests and histology, *Hepatology* 24:1003 (1996).