

KRONİK HEPATİT C ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDA HEPATİT C VİRÜS (HCV) GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

Fügen YARKIN*, Ali HAFTA **

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Adana

** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümü, Mersin

Özet

Kronik hepatit C hastalarında hepatit C virüs (HCV) genotiplerinin dağılımını belirlemek amacıyla kronik HCV enfeksiyonu olan 72 hasta çalışmaya dahil edildi. HCV genotipleri I/1a, II/1b, III/2a ve IV/2b'nin tespiti için Okamoto'nun önerdiği tip spesifik primerlerle yapılan nested reverse transcriptase- polimerase chain reaction (RT-PCR) testi kullanıldı. Anti-HCV antikoru pozitif 74 hastanın 62(83.7)'sinde HCV RNA bulundu. HCV RNA pozitif 62 hastada HCV genotiplerinin prevalansı genotip 1b %82.2, genotip 1a %14.5 ve genotip 2a %3.3 olarak tespit edildi. Sonuç olarak, bölgemizde kronik hepatit C hastalarında HCV genotip II/1b'nin % 82.2 oranla en yaygın genotip olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: Hepatit C virüs (HCV) genotipleri, kronik hepatit C

Summary

THE DISTRIBUTION OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) GENOTYPES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C INFECTION

To investigate the distribution of HCV genotypes among patients with chronic hepatitis C, 72 patients with chronic HCV infection were included in this study. HCV genotypes I/1a, II/1b, III/2a and IV/2b were determined by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with genotype specific primers described by Okamoto. Of 72 patients positive for anti-HCV antibody, 62(83.7) were found to have HCV RNA. Among HCV RNA positive 62 patients, the prevalence of HCV genotypes were detected as 82.2% for genotype 1b, %14.5 for genotype 1a and %3.3 for 2a. In conclusion, genotype II/1b with a rate of 88.2% was identified the most common genotype among patients with chronic hepatitis C in our area.

Key words: Hepatitis C virus (HCV) genotypes, chronic hepatitis C

Giriş

Hepatit C virüs (HCV) bütün dünyada hepatit, siroz ve hepatosellüler karaciğer karsinomunun en önemli etkenidir (1,2). HCV, zarflı, tek iplikli, pozitif RNA virüsü olup Flaviviridae ailesinde yer alır. HCV genomu 9400 baz uzunluğundadır, 5' ve 3' uçlarında çok iyi korunan non-coding region'lar (NCR) bulunur. HCV, diğer RNA virüsleri gibi çok kolay genomik değişikliğe uğrar. En yüksek mutasyon oranı HCV genomunun E2 bölgesinin amino-terminal ucundaki hypervariable region 1 (HVR1)'de gözlenmiştir. Nükleik asit dizi analizine göre HCV'un altı majör genotipi ve 100'den fazla subtipi tanınmıştır. Farklı genotipler arasında yaklaşık %35 varyasyon bulunur (3,4). Genotip tayininde Okamoto ve Simmonds'un önerdiği sınıflandırmalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Okamoto sınıflandırması HCV'un core bölgesine göre yapılmış olup genotip I-V olmak üzere beş genotip tanımlanmıştır. Bu genotipler HCV'un NS5 bölgesine göre yapılan Simmonds sınıflandırmasındaki sırasıyla 1a, 1b, 2a, 2b ve 3a genotiplerine karşılık gelmektedir (5,6,7,8). HCV

genotiplerinin tanısı için HCV'un subgenomik bölgelerinin (5' NCR, core, E1, NS5) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu ve dizi analizi, restriction fragment length polymorfizm (RFLP), reverse hibridizasyon line prob assay (LIPA), genotip spesifik primerlerle yapılan PCR ve serolojik genotipleme gibi birçok testler kullanılmaktadır (7,9,10,11). HCV'nin genotiplerinin coğrafi bölgelere göre dağılımında belirgin farklılıklar vardır. Avrupa, Amerika ve Japonya'da genotip 1 ve tip 2 en yaygın tiplerdir. Genotip 3 Güneydoğu Asya'da, tip 4 Ortadoğu, Mısır ve Orta Afrika'da, tip 5 Güney Afrika ve tip 6 Asya'da en sık rastlanan genotiplerdir. Akdeniz ülkelerinde en prevalan genotip 1b olarak bildirilmektedir (4, 8,12,13). Bazı araştırmacılar HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda siroz ve hepatosellüler karsinoma gelişme riskinin yüksek olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca, birçok çalışmada HCV genotip 1b diğer genotiplerle kıyaslandığında antiviral tedaviye daha dirençli bulunmuştur (14,15,16,17).

Bu çalışma bölgemizde kronik hepatit C hastalarında HCV genotiplerinin dağılımını belirlemek amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada histolojik olarak kronik hepatit tanısı konmuş toplam 74 hastaya ait serum örneklerinde anti-HCV antikorları ELISA kiti (Murex) ile, HCV RNA varlığı ise nested reverse transcriptase-polimerarase chain reaction (RT-PCR) testi ile araştırıldı. HCV genotipleri I/1a, II/1b, III/2a ve IV/2b'nin tespiti için Okamoto'nun önerdiği genotip spesifik primerler kullanıldı (18,19). Serum örneklerinden RNA'nın ekstraksiyonu için 400µl lizis tamponu (4M guanidinium isothiocyanate, 25Mm Na-Citrate, %0.5 sarcosyl ve 0.1 M mercaptoethanol) 100µl hasta serumu ile karıştırılıp 60°C'de 1 saat ve bir gece 370C'de inkübe edildi. Bu karışıma 500µl phenol: chloroform (1:1) ilave edilip vortekslendikten sonra 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Phenol: chloroform ile ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandı. RNA'nın presipitasyonu için yeni tüpe aktarılan üst faza eşit miktarda soğuk izopropil alkol ilave edildi ve 14.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelti 1 ml %70'lik soğuk etanolde süspanse edildi ve 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra çökelti 50µl TE buffer ile çözüldü.

Viral RNA'nın cDNA'ya transkripsiyonu için 5µl RNA örneği, 200µM dNTP, 50pm primer 256, 20U reverse transcriptase (Promega), 20U ribonükleaz inhibitör (Promega) ve 1xRT buffer (Promega)'dan oluşan 20µl reaksiyon karışımı hazırlandı ve 43°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra karışımdaki reverse transcriptase enziminin inaktivasyonu için örnekler 99°C'de 5 dakika inkübe edildi ve sonra +4°C'ye soğutuldu. cDNA'nın amplifikasyonu için nested PCR yapıldı. Birinci PCR için cDNA ürünü üzerine 2.5U Taq polymerase, 50pm primer 186, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl ve 1.5 mM MgCl₂ ilave edilerek son volüm 50µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı, M.J. Research PTC-150 tipi bir thermal cycler'da 40 siklus; her siklus 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika annealing ve 72°C'de 1 dakika elongasyon olmak üzere inkübe edildi. Daha sonra 72°C de 8 dk. son elongasyona tabi tutuldu. İkinci PCR için 5µl amplifikasyon ürünü, 200µM dNTP, 2.5U Taq polymerase, 50pm sense primer 104, her genotip spesifik primer'den 50pm, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl ve 1.5 mM MgCl₂'dan oluşan toplam 50µl'lik karışım 35 siklus, her siklus 94°C'de 1 dakika , 60°C'de 1 dakika ve 72°C de 1.5 dakika olmak üzere amplifiye edildi ve daha sonra 72°C de 8 dk'da. son elongasyon yapıldı. Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelinde yapılan elektroforez ile analiz edildi.

Sonuçlarla ilgili istatistik işlemleri SPSS for Windows paket programında yapıldı. Veriler student-t testi ile karşılaştırıldı. P değerinin 0.05'ten küçük değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen toplam 74 kronik hepatit C hastasının 53 (%72)'ü erkek ve 21'i (%28) kadın idi. Anti-HCV antikorları pozitif olan 74 hastanın 62 (%83.7)'sinde HCV RNA varlığı tespit edildi. HCV RNA pozitif bulunan 62 hastanın 51'inde (%82.2) HCV genotip 1b, 9'unda (%14.5) genotip 1a ve 2'sinde (%3.3) genotip 2a tespit edildi (Tablo 1).

HCV genotip 1b ile enfekte olan ve olmayan vakaların yaş ortalaması, cinsiyet dağılımı, ALT ve AST ortalamaları arasında fark bulunmadı (p < 0.05).

Tartışma

HCV, viral hepatitin majör sebebidir. HCV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik seyreder, ancak vakaların yaklaşık %85'inde kronik hepatit gelişir ve bu hastaların da yaklaşık %20'sinde siroz görülür. Sirozlu hastalarda hepatosellüler karsinoma gelişme riski her yıl için %1.5 olarak bildirilmektedir (1,2,20). HCV ile enfekte hastalarda kronik enfeksiyon gelişmesinde rol alan konak ve viral faktörler olarak hastanın yaşı, hastalığın süresi, alkol kullanımı, karaciğerin histolojik özelliği, diğer hepatit virüsleri ile ko-enfeksiyon, virüsün bulaşma yolu ve viral yük yanı sıra HCV'un genetik değişkenliği de hastalığın progresyonunu etkiler gözükmemektedir (21,22). HCV'un hümmoral ve sellüler immün cevaba yönelik proteinleri kodlayan gen bölgelerinin mutasyona uğraması immün sistemden kaçmasına sebep olabilir (2). Buna karşılık HCV genotiplerinin klinik önemi halen tartışmalıdır (23,24). Diğer taraftan, HCV genotipi interferon tedavisine cevabın bağımsız prediktörü olarak kabul edilmektedir (25,26). İnterferon ile interferon ve ribavirin kombinasyon tedavisinin farklı HCV genotipleri ile ilişkisini araştıran çalışmalar HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda diğer genotiplerle enfekte olanlara göre anti-viral tedaviye kalıcı cevap oranının daha düşük olduğunu göstermiştir (26,27,28). Genotip 1b enfeksiyonu olan hastalarda uzun süreli (12 ay) ve yüksek dozda uygulanan tedavi ile daha yüksek oranda kalıcı cevap elde edilmektedir (28,29). Ayrıca kombinasyon tedavisinde kalıcı cevap oranı tek başına interferon tedavisine göre daha yüksektir (26). Bu sebeple HCV genotip tayini tedaviye cevabın değerlendirilmesinde ve tedavi rejimini belirlemede faydalı olabilir (26,27,30,31,32). Ülkemizde HCV genotiplerinin prevalansı ile ilgili çalışmalardan Ankara'dan Tuncer ve ark. (33) HCV enfeksiyonu olan toplam 58 hastanın %72'sinin genotip 1b, %21'inin tip 1a, %5'inin tip 2 ve %2'sinin tip 4 ile enfekte olduğunu bildirirken, Uzunlifoğlu ve ark. (34) ise 39 hastanın %87'sinde genotip 1b, %5'inde tip 1a ve %8'inde tip 4 bulmuşlardır. Yine Ankara'dan Hızal ve ark. (35) HCV ile enfekte 24 hastada HCV genotiplerinin dağılımını hastaların %70.5'inde genotip 1b, %8.4'ünde tip 1a, %8'inde 4c/4d, %4.3'ünde 1b/4a, %4.3'ünde 1b/4c/4d ve %4.3'ünde tip 3a olarak tespit etmişlerdir. İstanbul'dan Türkoğlu ve ark.(36)'nın çalışmasında toplam 239 hepatit C hastasında genotip 1b %70, tip 1a %5.8, tip 2a %3.7, tip 3a %4, tip 4 %2.5 ve karışık enfeksiyon %5 oranlarında tespit edilirken hastaların %9'unda HCV genotipi sınıflandırılmamıştır. İzmir'den Abacioğlu ve ark. (37) yaptıkları çalışmada 26 hepatit C hastasının %85'inde tip 1b, %12'sinde tip 1a ve %3'ünde tip 4 olduğunu bildirmişlerdir. Diyarbakır'dan Yalçın ve ark. (38) toplam 50 kronik hepatit C hastasının 28'inde HCV RNA pozitif bulmuşlar ve bu hastaların da tamamının (%100) HCV genotip 1b ile enfekte olduğu bildirmişlerdir. Bu bulgular ülkemizde çeşitli bölgelerdeki hepatit C hastalarında görülen baskın HCV genotipinin 1b olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kronik HCV enfeksiyonu olan toplam 62 hastanın 51 (%82.2)'inde HCV genotip 1b, 9(%14.5)'unda genotip 1a ve 2 (%3.3)'inde genotip 2a pozitifliği bulundu. Bu bulgu ülkemizdeki diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur. Avrupa'da yapılan benzer çalışmalardan Almanya'dan Ross ve ark. (39) toplam 395 kronik hepatit C hastasının %44.5'inin genotip 1b ve %36.2'sinin genotip 1a ile enfekte olduğunu, İtalya'dan Giannini ve ark. (40) ise hepatit C enfeksiyonu olan 213 hastada en çok görülen genotipin %54 oranla tip 1b olduğunu bildirmektedir.

Çalışmamızda hastaların yaş, cinsiyet, serum ALT ve AST düzeyleri HCV genotip 1b ve diğer genotiplerle enfekte olan gruplar arasında karşılaştırıldığında önemli bir farklılık göstermediği tespit edildi (Tablo 1).

Sonuç olarak bölgemizde hepatit C hastalarında HCV genotip II/1b'nin %82.2 oranla en yaygın genotip olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Cheney C, Chopra S, Graham C: Hepatitis C. Infect Dis Clin North Am, 2000, 14:633-667.
2. Boyer N, Marcellin P: Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis

- C. *J Hepatol*, 2000, 32:98-112.
3. Davis GL: Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med*, 1999, 107:21-26.
 4. Forns X, Bukh J: The molecular biology of hepatitis C virus, genotypes and quasispecies. *Clinics in Liver Disease*, 1999, 3:693-716.
 5. Simmonds P: Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol*, 1999, 31 Suppl 1:54-60.
 6. Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M et al: Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol*, 1993, 74: 2385-2390.
 7. Okamoto H, Kobata S, Tokita H, et al: A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and anti-sense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods*, 1996, 57:31-45.
 8. Fang JWS, Chow V, Lau JYN: Virology of hepatitis C virus. *Clinics in Liver Disease*, 1997, 1:493-514.
 9. Pawlotsky JM: Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol*, 1999, 31 Suppl 1:71-79.
 10. Ohno T, Mizokami M, Wu RR, et al: New hepatitis C virus genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a and 6a. *J Clin Microbiol*, 1997, 35:201-207.
 11. Schroter M, Feucht HH, Schafer P et al: Serological determination of hepatitis C virus subtypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, and 4a by a recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:2576-2580.
 12. Naoumov NV: Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol*, 1999, 31 Suppl 1:84-87.
 13. Trepo C, Pradat P: Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J Hepatol*, 1999, 31 Suppl 1:80-83.
 14. Zein NN, Persing DH. Hepatitis C genotypes: Current trends and future implications. *Mayo Clin Proc*, 1996, 71:458-462.
 15. Hino K, Sainokami S, Shimoda K et al: Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 1994, 42:299-305.
 16. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL et al: Hepatitis C virus genotypes in the United States: Epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med*, 1996, 125:634-639.
 17. Pistello M, Maggi F, Vatteroni L et al: Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:232-234.
 18. Ichimura H, Tamura I, Kurimura O et al: Hepatitis C virus genotypes, reactivity to recombinant immunoblot assay 2 antigens and liver disease. *J Med Virol*, 1994, 43:212-215.
 19. Okamoto H, Mishiro S: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology* 1994, 37:68-76.
 20. Reid AE, Koziel MJ, Aiza I et al: Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94:1619-1626.
 21. Hollinger FB: Factors contributing to the evolution and outcome of cirrhosis in hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, 1999, 3:741-755.
 22. Ramalho F, Costa A, Pires A et al: Correlation of genotypes and route of transmission with histologic activity and disease stage in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2000, 45:182-187.
 23. Zeuzem S, Franke A, Lee JH et al: Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology*, 1996, 24:1003-1009.

24. Yamada M, Kakumu S, Yoshioka K et al: Hepatitis C virus genotypes are not responsible for development of serious liver disease. *Dig Dis Sci*, 1994, 39:234-239.
25. Trepo C: Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2000, 7:250-257.
26. Barnes E, Webster G, Whalley S: Predictors of a favorable response to alpha interferon therapy for hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, 1999, 3:775-791.
27. Fried MW: Clinical application of hepatitis C virus genotyping and quantitation. *Clinics in Liver disease*, 1997, 1:631-646.
28. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, 1998, 339:1485-1492.
29. Ideo G, Bellobuono A, Mondazzi L, et al: Alpha interferon treatment in chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol*, 1995, 13 (Suppl13P):167-173.
30. Morishima C, Gretch DR: Clinical use of hepatitis C virus tests for diagnosis and monitoring during therapy. *Clinics in Liver Disease*, 1999, 3:717-740.
31. Mondelli MU, Silini E: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol*, 1999, 31 Suppl 1:65-70.
32. Zein NN, Persing DH: Hepatitis C genotypes: Current trends and future implications. *Mayo Clin Proc*, 1996, 71:458-462.
33. Tuncer S, Özkuyumcu C, Arıkan S ve ark: PCR ve hepatit C virüs genotipi ile serolojik reaktivite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg*, 1996, 1:10-18.
34. Uzunalımoğlu Ö, Mayumi M, Çetinkaya H ve ark: Türkiye’de hepatit C virüs genotipleri. I. Ulusal Hepatoloji Kongresi Kitabı, s 7, 1995, İstanbul.
35. Hızal N, Boyacıoğlu S, Tunçbilek S ve ark: Hemodiyaliz hastaları ve diğer hastalarda hepatit C virüs genotipleri. II. Ulusal Hepatoloji Kongresi Kitabı, s 6, 1997, İstanbul.
36. Türkoğlu S, Bozacı M, Çakaloğlu Y ve ark: İkinci kuşak “core genotipleme” ile hepatit C virüsü genotiplerinin araştırılması. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi kitabı, s 41, 1999, İstanbul.
37. Abacıoğlu H, Akbaylar H, Tankurt E ve ark: Hepatit C virüs genotipleri. I. Ulusal Hepatoloji Kongresi Kitabı, s 8, 1995, İstanbul.
38. Yalçın K, Değertekin, Akkız H: Güneydoğu Anadolu’da HCV’ye bağlı kronik hepatitlerde HCV genotipleri. *Turk J Gastroenterol*, 1999, 10:249-252.
39. Ross RS, Viazov S, Renzing-Kohler K et al: Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: Shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J Med Virol*, 2000, 60:122-125.
40. Giannini C, Giannelli F, Monti M et al: Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Lab Clin Med*, 1999, 134:68-73.