

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA HEPATİT G VİRUSU ENFEKSİYON PREVALANSI

Ali Hafıa*, Fügen Yarkin**

ÖZET

Hepatit G virusu /GB virus C (HGV/GBV-C) yeni tanıyan bir hepatit virusu olup klinik önemi halen tam olarak aydınlatılmamıştır. HGV/GBV-C, parenteral yolla bulaşmakta ve genellikle HCV ile enfekte hastalardan izole edilmektedir. Bu çalışmanın amacı bölgemizde kronik hepatit C hastalarındaki HGV enfeksiyon prevalansını ve HGV enfeksiyonunun kronik hepatit C'nin klinik seyri üzerine etkisini tespit etmektir. Histolojik inceleme sonucu kronik hepatit tanısı konmuş toplam 90 kronik hepatit C hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların serum örneklerinde HGV RNA varlığı HGV genomunun NS3 / helikaz bölgesine ait primerlerin kullanıldığı nested reverse transcriptase-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) testi kullanılarak araştırılmıştır. HGV RNA kronik hepatit C'li 90 hastanın 10 (%11.1)'unda bulunmuştur. HGV ko-enfeksiyonu olan ve olmayan hastaların serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak, bu bulgular bölgemizde kronik hepatit C hastalarında HGV prevalansının %11.1 olduğunu ve HGV ko-enfeksiyonunun kronik hepatit C'nin klinik seyrini değiştirmediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kronik hepatit C, Hepatit G virusu / GB virus C enfeksiyonu

SUMMARY

PREVALENCE OF HEPATITIS G VIRUS INFECTION AMONG PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Hepatitis G virus/GB virus C (HGV/GBV-C) is a newly identified hepatitis virus of which the clinical significance is not fully clarified. HGV/GBV-C is parenterally transmitted virus and usually isolated from patients infected with HCV. The aim of the present study was to detect the prevalence of HGV infection among patients with chronic hepatitis C and the effect of HGV infection on the clinical course of chronic hepatitis C. A total of 90 patients with chronic hepatitis C of histologically proven chronic hepatitis were included in this study. The serum samples from patients were tested for HGV RNA by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers localized in the NS3/helicase region of the HGV genome. HGV RNA was detected in 10 (11.1%) of 90 patients with chronic hepatitis C. No significant differences were demonstrated in serum alanine aminotransferase (ALT) levels between patients with or those without HGV co-infection. In conclusion, these results show that the prevalence of HGV infection in patients with chronic hepatitis C in our area is 11.1% and HGV co-infection does not modify the course of chronic hepatitis C.

Key words: Chronic hepatitis C, Hepatitis G virus / GB virus C infection

Giriş

Yeni bulunan bir hepatit virusu olan Hepatit G virusu (HGV), Flaviviridae ailesinin üyesi olup ikozahedral simetrik, pozitif tek iplikli bir RNA virusudur. Yapılan sekans analizleri genomun yaklaşık 9.400 baz uzunluğunda ve 2.900 aminoasitten oluşan bir poliproteini kodladığı gösterilmiştir. Genom tek bir open reading frame (ORF) ile 5' ve 3' uçlarında translasyona olmayan bölgelerden meydana gelmektedir. Diğer taraftan yine Flaviviridae ailesinden olan GBV-A, GBV-B ve GBV-C virüsleri keşfedilmiştir. Yapılan sekans analizlerinde ise HGV ve GBV-C arasında nükleotit düzeyinde %85 oranında, aminoasit düzeyinde ise %95 oranında homoloji saptanmıştır. HGV ve GBV-C'nin helikaz bölgelerindeki aminoasit ve nükleotit dizilerinin karşılaştırılması sonucu bu iki virüsün HCV, GBV-A ve GBV-B'den farklı olarak aynı virüsün farklı iki izolatu ol-

duğu ortaya konmuştur (1,2).

HGV virusunun HCV'na benzer şekilde esas bulaşma yolunun kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu ve intravenöz ilaç kullanımı gibi parenteral yolla olduğu kabul edilmektedir. Perkutan yolla da geçiş bildirilmiştir (3). Bu risk faktörleri nedeniyle hepatit C virus enfeksiyonu olan hastalarda HCV ile koenfeksiyon riskinin bulunması açıktır. Sık transfüzyon yapılan hastalar, damar içi uyuşturucu bağımlıları, hemodiyaliz hastaları ve karaciğer nakli yapılan hastalar HGV için risk gruplarıdır (1,4).

Bu çalışmamızın amacı bölgemizde hepatit C virus etyolojili kronik parankimal karaciğer hastalarında GBV-C prevalansını ve GBV-C enfeksiyonunun kronik hepatit C'nin klinik seyri üzerine et-

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümü, Mersin

**Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Adana

kisini tespit etmektedir.

Gereç ve yöntem

Bu çalışmada HCV etyolojili kronik hepatit tanısı konmuş 90 hastaya ait serum örneklerinde HGV RNA'nın varlığı nested reverse transcriptase-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) testi ile araştırıldı. Kronik hepatitli hastalarda tanı perkutan karaciğer biyopsileri ile alınan doku örneklerinin histopatolojik tetkiklerine göre konuldu. Kronik hepatitli haastalarda anti-HCV antikorlarının tespiti için ELISA kiti (Murex) kullanıldı. HGV RNA'nın tespiti için yapılan nested RT-PCR için HGV genomunun NS3 / helikaz bölgesine ait primer G8 (sense, 5'-TATGGGCATGGHATHCCYCT-3', H; A, C ve T. Y; C ve T.), primer G9 (antisense, 5'-TCYTTGATGATDGAAGCTGTC-3', Y; T ve C. D; A, G ve T.), primer G10 (sense, 5'-CATTCAAGGGGAGTGYGA-3', V; A, C ve G.) ve primer G11 (antisense, 5'-TCYTTACCCCTRTAATAGGC-3', R; A ve G.) olmak üzere spesifik primerler kullanılmıştır (5). Serum örnekleri çalışılana kadar -70°C'de saklanmıştır.

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 karıştırıldı ve 60°C'de 1 saat ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Bu karışıma 500µl phenol:chloroform (1:1) ilave edilip vortekslenildikten 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, 50 pm primer G9, 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 ürünün üzerine 2.5U Taq polymerase, 50pm primer G8, 50pm primer G9, 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 35 siklus; her siklus 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 55°C'de 30 sn. annealing ve 72°C'de 60 sn. elongasyon olmak üzere inkübe edildi. Daha sonra 72°C'de 8 dk. son elongasyona tabi tutuldu. İkinci PCR için 5µl amplifikasyon ürünü, 1.5 mM MgCl2, 200µM dNTP, 2.5U Taq polymerase, 50pm primer G10, 50pm primer G11, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl ve 1.5 mM MgCl2'dan oluşan toplam 50µl'lik karışım 30 siklus, her siklus 94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn. ve 72°C'de 45 sn. 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. Birinci PCR ve ikinci PCR'da oluşması beklenen amplifikasyon ürünleri sırasıyla 158bp ve 83bp'lik fragmanlar idi. Agaroz jelde 83bp'lik ürünleri veren serum örnekleri GBV-C RNA pozitif olarak kabul edildi.

Çalışmamızın sonuçları ile ilgili işlemler SPSS for Windows(Ver.5.01) paket programında yapıldı. Veriler Student-t testi ile karşılaştırıldı. P değerinin 0.05'ten küçük değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 1. Kronik hepatit C hastalarında virolojik, biyokimyasal ve epidemiyolojik bulguların dağılımı

	HGV RNA pozitif	HGV RNA negatif	P
Hasta sayısı	10	80	
Kadın/Erkek	25/55	3/7	AD
Ortalama yaş	50.11±13.2	52.12±14	AD
ALT(ortalama, U/L)	79±24	62±37	AD
AST(ortalama, U/L)	84±41	76±44	AD
Risk faktörleri			
Kan transfüzyonu	3(%30)	20(%25)	AD
İğne batması	yok	2(%2.5)	AD

ALT : Alanin aminotransferaz

AST : Aspartat aminotransferaz

AD : anlamlı değil

Bulgular

Çalışmaya alınan kronik hepatit C'li hastaların 62 (%69)'si erkek ve 28 (%31)'i kadın olup ortalama yaşları 51.12 ± 14.4 yıl idi. Kronik hepatit C'li 90 hastanın 10(%11.1)'unda HGV RNA pozitifliği tespit edildi. Kronik hepatitli olguların tümünde ALT ve AST değerleri yüksek tespit edildi (Tablo-1)

Tartışma

HGV/GBV-C akut ve kronik hepatitle ilişkisi bildirilen, son zamanlarda tanımlanan bir flavivirustur. HGV/GBV-C enfeksiyonları bütün dünyada yaygın olarak görülmektedir. HGV enfeksiyonu hepatit C hastalarında sık rastlanmakta olup buna karşılık kronik karaciğer hastalığındaki patojenik önemi halen tam olarak bilinmemektedir (1,2,6). Yapılan çalışmalarda HGV/GBV-C ve HCV ko-enfeksiyon oranları %4.5 ve %26.5 arasında değişmekte ve ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir (3,7,8,9). Bir meta-analiz çalışmasında 66 yayın incelenmiş ve toplam 5.388 kronik hepatit C hastasının 941(%17.5)'inde HGV/GBV-C enfeksiyonu olduğu bildirilmiştir (3). Kronik hepatit C'li hastalarda HGV enfeksiyon prevalansının araştırdığı çalışmalarda Amerika'dan Slimane ve ark.(10) kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastaların % 9.7'sinde HGV RNA tespit ederken HGV enfeksiyonunun hastaların serum ALT düzeylerinde ve karaciğerin histolojik aktivitesinde herhangi bir değişiklik yapmadığı kaydedilmiştir. Yine Amerika'dan Brandhagen ve ark.(11) bu oranı %20 olarak bildirmişler ve HGV ile ko-enfeksiyonunun hepatit C'li hastalarda interferon tedavisine cevabı değiştirmedğini gözlemişlerdir. Japonya'dan Hayashi ve ark.(12) kronik hepatit C'li hastalarda HGV prevalansını %8.9, Oshita ve ark.(13) ise %11 oranında bulmuşlardır. Her iki çalışmada da HGV enfeksiyonu olan ve olmayan hastalar arasında yaş, cinsiyet, karaciğer fonksiyon testleri ve histolojik bulguları yönünden önemli farklılıklar tespit edilmemiştir. İspanyadan Quintero ve ark.(14) HGV ko-enfeksiyon prevalansını %12.2, Saiz ve ark.(15) ise %5.6 olarak bildirmişler ve ko-enfeksiyonu olan ve olmayan gruplar arasında klinik, karaciğerin biyokimyasal testleri ve histolojik incelemelerinde farklılık bulmamışlardır. İtalya'dan Fabris ve ark.(16) kronik hepatit C'li hastalarda HGV ko-enfeksiyon prevalansını %19, Cacopardo ve ark.(17) ise %22.5 olarak rapor etmişlerdir. Araştırmacılar karaciğer histolojisi ve biyokimyasal test sonuçlarını HGV enfeksiyonu olan ve olmayan hastalarda benzer bulmuşlardır.

Hepatit virus enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü bölgemizde kronik hepatit C hastalarında HGV enfeksiyon prevalansını belirlemek için yaptığımız bu çalışmada 90 kronik hepatit C'li hastanın 10(%11.1)'unda HGV RNA pozitif tespit edildi. HGV ve HCV ko-enfeksiyonu olan hastalar ile tek başına HCV enfeksiyonu olan hastalar arasında diğer çalışmaların sonuçlarına uyumlu olarak yaş, cinsiyet, serum ALT ve AST düzeyleri ile bulaşma yolları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Sonuç olarak, bölgemizde

kronik hepatit C hastalarında HGV enfeksiyon prevalansının % 11.1 olduğu ve HGV ko-enfeksiyonunun kronik hepatit C enfeksiyonunun klinik seyri üzerine önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kiyosawa K, Tanaka E et al: GB virus C/Hepatitis G virus. *Intervirology*, 1999, 42: 185-195.
2. Robaczewska M, Cova L, Podhajska AJ, et al:Hepatitis G virus: molecular organization, methods of detection, prevalence, and disease association. *Int J Infect Dis*, 1999, 3: 220-233.
3. El-Zayadi AR, Abe K, Selim O, et al:Prevalence of GBV-C/hepatitis G virus viraemia among blood donors, health care personnel, chronic non-B non-C hepatitis, chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Egypt. *J Virol Methods*, 1999; 80: 53-58.
4. Rambusch EG, Wedemeyer H, Tillmann HL,et al: Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C-a review of the literature. *Z Gastroenterol*, 1998, 36: 41-53.
5. Egawa K, Yukawa T, Arakawa S, et al: Infection with GB virus C in leprosy patients in Japan. *J Med Virol*, 1996, 49: 110-114.
6. Muller C .Pathogenicity of GBV-C/HGV infection. *J Viral Hepat* 1999, 1: 49-52.
7. Shibahara N, Moriyama M, Abe K, et al: Biochemical and virological response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C, co-infected with hepatitis G virus. *J Viral Hepat*, 2000, 7: 43-50.
8. Anastassopoulou CG, Paraskevis D, Tassopoulos NC, et al: Molecular epidemiology of GB virus C/hepatitis G virus in Athens, Greece. *J Med Virol*, 2000, 61: 319-326.
9. Lin R, Dutta U, Kaba S, et al: Effects of hepatitis G virus coinfection on severity of hepatitis C: relationship to risk factors and response to interferon treatment. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13: 773-780.
10. Slimane SB, Albrecht JK, Fang JW, et al:Clinical, virological and histological implications of GB virus-C/hepatitis G virus infection in patients with chronic hepatitis C virus infection: a multicentre study based on 671 patients. *J Viral Hepat*, 2000, 7: 51-55.
11. Brandhagen DJ, Gross JB Jr, Poterucha JJ, et al: The clinical significance of simultaneous infection with hepatitis G virus in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94: 1000-1005.
12. Hayashi J, Ueno K, Kawakami Y, et al: Clinical course of chronic hepatitis C virus infection is not influenced by concurrent hepatitis G virus infection. *Dig Dis Sci*, 1999, 44: 618-623.
13. Oshita M, Hayashi N, Mita E,et al:GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: its effect on clinical features and interferon therapy. *J Med Virol*, 1998, 55: 98-102.
14. Quintero D, Salmeron J, Palacios A, et al: Coinfection with hepatitis G virus in chronic hepatitis C. Response to treatment with interferon alpha. *Med Clin (Barc)*, 2000, 114: 726-729.

15. Saiz JC, Ampurdanes S, Olmedo E, et al: Hepatitis G virus infection in chronic hepatitis C: frequency, features and response to interferon therapy. *J Hepatol*, 1997, 26: 787-793.
16. Fabris P, Biasin MR, Infantolino D, et al: HGV/GBV-C in liver tissue and in sera from patients with chronic hepatitis C. *Infection*, 1998, 26: 283-287.
17. Cacopardo B, Berger A, Cosentino S, et al: Influence of hepatitis G virus coinfection on the clinical course of chronic hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998, 17: 709-714.