

MANİSA BÖLGESİNDE HEPATİT C VİRUS GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

DISTRIBUTION OF HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES IN MANISA REGION, TURKEY

Tamer ŞANLIDAĞ¹, Sinem AKÇALI¹, Beril ÖZBAKKALOĞLU¹, Deniz ERTEKİN², Elçin AKDUMAN³

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa. (drelcin@yahoo.com)

² Makro Sağlık AŞ, İzmir.

³ Tatvan Devlet Hastanesi, Tatvan, Bitlis.

ÖZET

Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun süresi ve standart tedaviye verilen yanıt HCV genotipleri ile yakından ilişkilidir. Bunun yanı sıra HCV genotiplerinin coğrafi dağılımlarının bilinmesi, epidemiyolojik çalışmalar ve muhtemel risk grupları açısından önem taşımaktadır. Bu retrospektif çalışmada, Manisa bölgesindeki HCV genotip ve alt tiplerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 2002-2005 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran, anti-HCV (mikropartikül EIA; Abbott Laboratories, ABD) ve HCV-RNA (gerçek zamanlı RT-PCR; Applied Biosystems, ABD) testleri pozitif olan 100 hasta (53 kadın, 47 erkek; yaş ortalaması: 44.4 ± 10.4 yıl) dahil edilmiştir. Hastaların kantitatif HCV-RNA düzeyleri 10^4 - 10^8 kopya/ml arasında değişmektedir. Genotiplendirmede "Invitek RTP DNA/RNA Virus Mini Kit" ile izole edilen HCV-RNA'larından elde edilen cDNA kullanılmış ve seçilmiş primerlerle [ilk PCR için primer 11 (5'-AGG TCT CTG AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC-3') ve primer 13 (5'-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3'); ikinci PCR için primer 12 (5'-ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG TG-3') ve primer 14 (5'-CAC GCA GAA AGC GTC TAG-3')] uygulanan RT-PCR ile elde edilen ürünler "Invisorb Spin PCRapid Kit" ile saflaştırılarak "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" ile dizi analizi (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) yapılmıştır. Buna göre hastaların %92'sinde genotip 1, %7'sinde ise diğer genotipler (genotip 2 ve 4) saptanmış, bir hastada (%1) HCV genotipi belirlenememiştir. Genotiplerin alt tip dağılımına bakıldığında; hastaların 90 (%90)'ının genotip 1b, 5 (%5)'inin genotip 4a, 2 (%2)'sinin genotip 1a ve 2 (%2)'sinin genotip 2a olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak; bölgemizde saptanan en yaygın genotipin, ülkemiz verileri ile uyumlu olarak genotip 1b olduğu, genotip 4a'nın ise onu izlediği belirlenmiş, bu durumun hastaların izleminde ve tedavinin planlanmasında dikkate değer bir bulgu olarak yorumlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Hepatit C virusu, HCV genotipleri, anti-HCV, HCV-RNA, Manisa, Türkiye.

ABSTRACT

The duration of hepatitis C virus (HCV) infection and the response to the standard therapy is strongly related to the HCV genotypes. In addition, the geographical distribution of HCV genotypes is important for the epidemiological studies in terms of distribution and possible risk groups. The aim of this retrospective study was to investigate the distribution of HCV genotypes in Manisa region (located at the Aegean part of Turkey). A total of 100 anti-HCV (microparticle EIA; Abbott Laboratories, USA) and HCV-RNA (real time RT-PCR; Applied Biosystems, USA) positive patients (53 female, 47 male; mean age: 44.4 ± 10.4 years), who were admitted to Celal Bayar University Medical School Hospital between 2002-2005, were included to the study. Quantitative HCV-RNA levels of the patients were between 10⁴-10⁸ copies/ml. Complementary DNAs obtained from HCV-RNAs isolated by Invitex RTP DNA/RNA Virus Mini Kit were used for genotyping with selected primers [primer 11 (5'-AGG TCT CTG AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC-3') and primer 13 (5'-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3') for the first PCR; primer 12 (5'-ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG TG-3') and primer 14 (5'-CAC GCA GAA AGC GTC TAG-3') for the second PCR]. The RT-PCR products were purified with Invisorb Spin PCRapid Kit and sequenced by BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Genotype 1 was found in 92% of the patients (92%) and genotypes 2 and 4 were found in 7% of the patients, while HCV genotype could not be identified in one patient (1%). When evaluating the subtypes, genotype 1b was determined in 90 patients (90%), genotype 4a in five patients (5%), genotype 1a in two patients (2%) and genotype 2a in two patients (2%). In conclusion, 1b was found to be the most common HCV genotype in Manisa region in concordance with the previous data obtained in Turkey, followed by genotype 4a, although a rare one. The data of this study is noteworthy especially for the arrangement of treatment and follow-up of HCV infected patients.

Key words: Hepatitis C virus, HCV genotypes, anti-HCV, HCV-RNA, Manisa, Turkey.

GİRİŞ

Dünya çapında 170 milyon insanı enfekte eden hepatit C virusu (HCV), en büyük sağlık problemlerinden biridir¹. HCV'nin her biri çeşitli alt tiplere ayrılan 6 genotipi ve 100'den fazla da alt tipi vardır². Hastalığın süresi ve standart tedaviye verilen yanıt, güçlü bir şekilde HCV genotipleri ile ilişkilidir^{2,3}. HCV genotiplerinin coğrafi dağılımları, epidemiyolojik çalışmalar ve muhtemel risk grupları açısından önemlidir. Tüm dünyada bulunan genotip 1, 2 ve 3, özellikle Japonya, Batı ve Doğu Avrupa ve Kuzey Amerika'da ana genotiptir. Genotip 4 çoğunlukla Orta ve Kuzey Afrika ve Mısır'da; genotip 5 Güney Afrika'da ve genotip 6 Güneydoğu Asya ve Hong Kong'da tespit edilen tiplerdir^{2,4,5}. HCV'nin genotiplendirilmesi, genotip 1 ve 4'ün, genotip 2 ve 3'e oranla interferon (IFN) tedavisine daha az yanıt verdiğinin belirlenmesinden bu yana klinik olarak daha fazla önem kazanmıştır^{5,6}. Ayrıca, HCV genotip 1 (özellikle 1b) enfeksiyonlarında kronik aktif hepatit ve siroz gelişim riskinin diğer genotiplere oranla daha yüksek olduğu vurgulanmıştır⁷. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da genotip 1b'nin ana genotip olduğu belirtilmektedir⁸⁻¹³. Bu çalışmada, Manisa bölgesindeki HCV genotip ve alt tiplerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu retrospektif çalışmaya, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Seroloji Laboratuvarına 2002-2005 yılları arasında anti-HCV testi için başvuran 1500 kişiden, anti-

HCV ve HCV-RNA sonuçları pozitif olan 100 hasta dahil edildi. Rutin anti-HCV testi mikropartikül EIA (Abbott Laboratories, ABD), HCV-RNA ise gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR; Applied Biosystems, ABD) ile çalışıldı. Hastaların kantitatif HCV-RNA düzeyleri 10^4 - 10^8 kopya/ml arasında değişmekteydi. Anti-HCV ve HCV-RNA pozitif hastaların serum örnekleri genotiplendirme yapıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

HCV genotiplendirmesi için HCV-RNA pozitif örneklerle seçilmiş primerlerle tekrar RT-PCR uygulandı. Bu amaçla, ilk PCR için primer 11 (5'-AGG TCT CTG AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC-3') ve primer 13 (5'-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3'); ikinci PCR için primer 12 (5'-ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG TG-3') ve primer 14 (5'-CAC GCA GAA AGC GTC TAG-3') kullanıldı¹⁴.

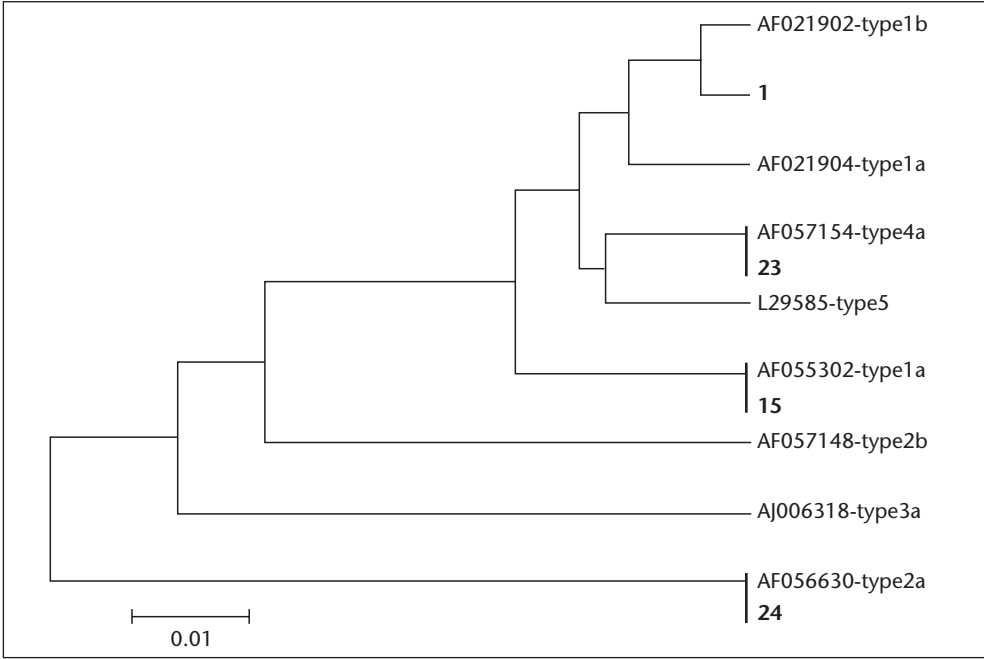
Genotiplendirmede, "Invitek RTP DNA/RNA Virus Mini Kit" ile izole edilmiş olan HCV-RNA'larından elde edilen cDNA kullanıldı. Bunun için 10 µL RNA, 5 µL TaqMan RT tamponu, 5 µL MgCl_2 , 2.5 µL 10mM dNTP'ler, 2.5 µL primer 1, 3 µL Rnase inhibitör, 1.25 µL "Multiscribe Enzyme (Applied Biosystems)" ile karıştırıldı ve 15.75 µL distile su eklendi. GeneAmp PCR System 9700 cihazında, 25°C 'de 10 dakika, 48°C 'de 60 dakika tutularak cDNA elde edildi.

Birinci PCR'de 5 µL cDNA ürünü ile 5 µL Applied Biosystems 10x PCR tamponu, 25 mM MgCl_2 , 2 mM dNTP, primer 11 ve primer 13'ün her birinden 10 pmol, 0.5 µL AmpliTaq DNA polimeraz ve 28.75 µL distile su ile karıştırılarak termal döngü cihazına kondu. Termal döngü koşulları, denatürasyon için 94°C 'de 5 dakika, bağlanma için 35 döngü 94°C 'de 1 dakika, 52°C 'de 1 dakika, 72°C 'de 2 dakika ve uzama için 72°C 'de 7 dakika idi. İkinci PCR, aynı şekilde ancak primer 12 ve primer 14 kullanılarak gerçekleştirildi. Çıkan ürünler, %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar ultraviyole altında incelendi.

Dizi analizi için, PCR sonucu elde edilen ürünler "Invisorb Spin PCRapid Kit" ile saflaştırıldı ve "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" ile dizi PCR'si (sequence PCR) yapıldı. Bu amaçla 8 µL BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100, 0.5 µL primer 14, distile su ve ikinci PCR ürünü son hacim 20 µL olacak şekilde hazırlanıp, 96°C 'de 10 saniye, 50°C 'de 5 saniye ve 60°C 'de 4 dakika tutuldu. Çıkan ürünler, NaAc ve ETOH ile saflaştırılıp liyofilize hale getirildi. Her örnek üzerine 20 µL formomid eklenerek ABI Prism 310 Genetic Analyzer'a yüklendi. Oluşan nükleotid dizilimlerinin Mega2 programı ile analizleri ve tiplendirilmeleri yapıldı.

BULGULAR

Çalışma grubunun 53'ü kadın, 47'si erkek olup, yaş ortalamaları 44.4 ± 10.4 yıldır. Çalışmada hastaların 92 (%92)'sinde genotip 1, 2 (%2)'sinde genotip 2 ve 5 (%5)'inde genotip 4 saptanmış, bir hastada (%1) ise HCV suşu tiplendirilememiştir. Alt tiplendirmede hastaların 90 (%90)'ında genotip 1b, 5 (%5)'inde genotip 4a, 2 (%2)'sinde genotip 1a ve 2 (%2)'sinde genotip 2a belirlenmiştir. Örnek olarak her genotipe ait birer izolatin filogeni ağacındaki yerleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. HCV genotiplerinin (suş no 1, 15, 23, 24) filogeni ağacında gösterilmesi.

TARTIŞMA

Değişik ülkelerden elde edilen HCV suşları arasında genomun değişik bölgelerinde nükleotid ve aminoasit dizileri bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklara bağlı olarak birçok genotip ve alt tip tanımlanmış ve değişik şekillerde adlandırılmışlardır. Bunlar arasında Simmonds adlandırması en yaygın olarak kullanılanı olup, günümüzde 9 genotip ve 24 alt tip varlığı söz konusudur¹⁰.

Farklı HCV tiplerinin patogenezinin, enfektivitesinin ve IFN tedavisine yanıtının farklılıklar gösterdiğine ilişkin veriler nedeniyle bu tiplerin coğrafi dağılımları yoğun araştırmalara konu olmuştur. Genel olarak 1b tipi en yaygın bulunan alt tiptir ve "wild" tip olarak isimlendirilmesi önerilmektedir. Ülkemizde tiplendirmeye ilişkin yapılan çalışmalarda da 1b alt tipinin baskın olduğu belirlenmiştir⁸⁻¹³. Ancak bu araştırmalar, DNA'yı restriksiyon enzimleri ile keserek farklı parçalar oluşturmaya dayalı RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemiyle yapılmıştır. RFLP yönteminin en önemli dezavantajları, polimorfik bölge ile elde edilmek istenen gen arasında rekombinasyon olasılığının olması ve bazı HCV genotiplerini saptayamaması olarak belirtilmiştir.

Hepatit C virusunun farklı genotipleri arasında bulunan antijenik farklar, enfeksiyonun serolojik tanısında sorun yaratabilir⁷. Hastalığın süresi ve IFN ile olduğu gibi standart tedaviye verilen yanıt da HCV genotipleri ile ilişkili bulunmuştur³. Ayrıca, bazı HCV geno-

tiplerinin oluşturduğu enfeksiyonların kronik aktif hepatit ve siroz gelişim riskinin diğer genotiplere oranla daha yüksek olduğu bilinmektedir⁷. Tüm bunların yanında, HCV genotiplerinin yayılımının coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir^{4,5}. HCV genotiplendirmesinde bugün kullanılan ve en kesin sonuçlar veren yöntem, bizim de araştırmamızda kullandığımız, genomun C, E1 ya da NS5b bölgelerinin PCR yöntemi ile çoğaltılarak dizi analizinin yapılmasıdır. Ancak geniş seriler söz konusu olduğunda bu yöntem pratik olmamaktadır. Bu yüzden daha basit yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar; genotipe özgü primerlerle, kor ya da NS5 bölgeleri hedef alınarak yapılan PCR ile genotiplendirme, 5' UTR bölgesinin PCR ile çoğaltılması daha sonra restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile yapılan RFLP ile genotiplendirme, yine 5' UTR, C, E1, NS3 ya da NS5b genleri hedef alınarak ve tipe özgü problemlerle PCR sonrası ters hibridizasyonla yapılan genotiplendirme ve C, E1 ya da NS4 bölgesi peptitleri ile yapılan genotiplendirmedir^{3,6,15-17}. Bugün HCV'nin genotiplerinin saptanmasında en çok kullanılan yöntem, ters dot-blot hibridizasyon prensibine dayalı olan "line prob assay"dir. Bu amaçla geliştirilmiş kit, yönetimin standart olmasını sağlamakla birlikte kolayca saptama imkanı tanırken, maliyet olarak yüksek kalmaktadır. Tüm HCV genotiplerini saptayamaması gibi bir dezavantajı olmasına rağmen en basit, kolay uygulanan ve ucuz genotipleme yöntemi 5' UTR bölgesinde yapılan RFLP yöntemidir.

Araştırmamızda, HCV genotiplendirmesinde en pahalı yöntem olmasına rağmen, sonucun güvenilirliği ve tüm genotiplerin gösterilebilmesi açısından DNA dizi analizi kullanılmıştır. Bulgularımız, Manisa bölgesindeki HCV genotip dağılımının sıklık sırasıyla 1b (%90), 4a (%5), 1a (%2) ve 2a (%2) şeklinde olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın gerçekleştirildiği PCR laboratuvarı, Manisa bölgesinde moleküler mikrobiyoloji alanında çalışan tek merkezdir. Gerek Üniversite Hastanemizde, gerekse diğer hastanelerde ve diyaliz merkezlerinde kronik HCV tanısı alan, takip ve tedavi edilen tüm hastaların HCV-RNA testleri laboratuvarımızda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle araştırmamızda elde edilen verilerin, Manisa bölgesindeki HCV genotip dağılımını yansıttığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, HCV genotip 1b'nin en yaygın genotip olarak belirlenmesi, hem ülkemiz hem de dünya literatürüyle uyumlu bir bulgudur^{1,2,10-13}. İkinci sırada yer alan genotip 4a ise, genellikle Orta ve Kuzey Afrika ve Mısır gibi ülkelerde saptanmaktadır. Ülkemizde yapılan bazı araştırmalarda bu tipin saptanamamasının¹¹ ya da daha düşük oranlarda (%0.6-1) saptanmasının^{10,13} nedeni, araştırmacıların kullandığı yöntem farklılıklarından ya da bölgesel farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Genotip 4a'nın da 1b gibi ilaçlara dirençli olması, bu tipin önemini vurgulamaktadır. Bu iki tip (1b ve 4a) birlikte dikkate alındığında, hastalarımızın %95'inin dirençli tiplerle enfekte olduğu ve bölgemizdeki HCV hastalarının ciddi bir sorunla karşı karşıya olduğu ifade edilebilir. Sonuç olarak; gerek bölgemiz, gerekse ülkemizdeki geniş kapsamlı HCV dizi analizi çalışmalarından olan bu araştırmamızın verilerinin, bölgemizdeki HCV hastalarının izlemi ve tedavi başlangıcı açısından klinisyenlere yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Higuchi M, Tanaka E, Kiyosawa K. Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 69-77.
2. Lee CM, Hung CH, Lu SN, Changchien CS. Hepatitis C virus genotypes: clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med J* 2008; 31: 16-25.
3. Schröter M, Zöllner B, Schäfer P, et al. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3 and 4 by one-step LigthCycler method using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2046-50.
4. Krekulova L, Rehak V, Wakil AE, Haris E, Riley LW. Nested restriction site-specific PCR to detect and type hepatitis C virus (HCV): A rapid method to distinguish HCV subtype 1b from other genotypes. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1774-80.
5. Martial J, Morice Y, Abel S, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in the Caribbean island of Martinique: Evidence for a large radiation of HCV-2 and for a recent introduction from Europe of HCV-4. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 784-91.
6. Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1, 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* 1997; 35: 187-92.
7. Abacıoğlu H. Hepatit C virusu, s. 881-93. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1997, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara.
8. Zeytinoglu A, Erensoy S, Abacıoglu H, et al. Nosocomial hepatitis C virus infection in a renal transplantation center. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 741-4.
9. Şanlıdağ T, Akçalı S, Özbakkaloğlu B. Hemodiyaliz hastalarında HCV genotip dağılımı. *Moleküler Tanı Derg* 2003; 1: 38-41.
10. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004; 149: 2115-29.
11. Altindis M, Yılmaz S, Dikengil T, Acemoglu H, Hosoglu S. Seroprevalence and genotyping of hepatitis B, hepatitis C and HIV among healthy population and Turkish soldiers in Northern Cyprus. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6792-6.
12. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, et al. Distribution of HCV genotypes in patients with end-stage renal disease according to type of dialysis treatment. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1420-5.
13. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 239-44.
14. Bozdayı AM, Uzunalimoglu O, Aslan N, et al. Influence of viral load and alanine aminotransferase on viral genetic heterogeneity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Intervirology* 2000; 43: 61-6.
15. Otogiri H, Fukuda Y, Nakano I, et al. Evaluation of a new assay for hepatitis C virus genotyping and viral load determination in patients with chronic hepatitis C. *J Virol Methods* 2002; 103: 137-43.
16. Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003; 109: 187-93.
17. Schröter M, Feucht HH, Zöllner B, Schäfer P, Rainer L. Multiple infections with different HCV genotypes: Prevalence and clinical impact. *J Clin Virol* 2003; 27: 200-4.