

Çoklu HCV Genotiplerinin Tanımlanması

Determination of Mixed HCV Genotypes

İmre ALTUĞLU¹, Sami EREN¹, Rüçhan SERTÖZ¹, Selma GÖKAHMETOĞLU², Selda ERENŞOY¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Sayın Editör,

Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu kronik karaciğer hastalığının önemli bir nedenidir. Veri tabanlarında bulunan tam veya tama yakın kodlayan bölgelerin dizilerinin filogenetik analizi yedi genotip varlığını ortaya koymuştur^[1,2]. HCV genotipinin belirlenmesi, epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra tedavinin yönlendirilmesinde önemlidir. Direkt etkili antivirallerin (DEA) geliştirilmesi genotip 1 subtiplemeyi, özellikle 1a ve 1b ayrımını önemli hale getirmiştir^[3]. HCV'nin genomik değişkenliğinin yüksek olması nedeniyle genotip ve alt tiplerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerde hedeflenen bölgelere göre özgüllük ve duyarlılıkta farklılıklar bulunmaktadır. Genotiplemede yakın bir döneme kadar ticari kitler dahil en sık kullanılan bölge 5' UTR bölgesi idi. Ancak bu bölgenin hedeflenmesi birbiriyle yakından ilişkili subtiplerin ayırt edilebilmesi için yeterli değildir. Çalışmalarda daha kesin yöntemler ile karşılaştırıldığında (NS5B dizi analizi gibi) %20-30 oranında uyumsuzluk olduğu belirlenmiştir^[4].

HCV enfeksiyonunda, özellikle bazı özel hasta gruplarında, birden fazla genotiple enfeksiyon bildirilmiştir^[5,6]. Yeni anti-HCV ilaçlarının geliştirildiği bu dönemde çoklu HCV enfeksiyonlarının klinik önemi ve tanısının doğru bir şekilde konulabilmesi önemlidir. Çoklu genotiplerin oranlarının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, saptanma oranı %2.2 ile %7.1 arasında değişmektedir^[5,6]. Bu oran ülkemizde %1.3-5.5 olarak bildirilmiştir^[7,8]. Bu çalışmanın amacı, laboratuvarımızda rutin ola-

rak kullanılan ticari sistem ile, HCV çoklu genotip oranını belirlemek ve bu örneklerin ileri incelemesini yaparak farklı bir yöntemle sonucun doğrulanıp doğrulanmadığını araştırmaktır.

Ocak 2015-Eylül 2016 tarihleri arasında viroloji laboratuvarına yollanan 293 örneğin tümü Abbott m2000 Real-Time HCV Genotype II assay (Abbott Molecular Inc, IL, ABD) ile çalışıldı. Bu ticari sistem, 5'NCR ve NS5B'yi hedefleyen genotipe özgü floresan etiketli oligonükleotid problemlerinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PRC) temelli bir testtir. Genotip tayini yapılan 293 örnekten 15 (%5.1)'inde ticari sistem ile ikili genotip saptandı. Bu örneklerin birinde genotip 1a+4, üçünde 1b+3 ve 11'inde 1b+4 genotipleri bir aradaydı. Bu sistem ile çoklu genotip sonucu veren 15 örnekten 7'si farklı genotipleme yöntemi ile tekrar incelendi. Yedi örnekten 6 (genotip 1b+4)'sı, NS5B bölgesini hedefleyen primerler ile (8256-8644 nükleotidlere yönelik) daha önce tanımlandığı şekilde amplifiye edilerek, ABI Prism3500 (Applied Biosystems, ABD) genetik analiz sistemi ile dizilendi^[9]. Genotip 1a+4 saptanan bir diğer örnek ise HCV kor/E1 bölgesini hedefleyen primerler (843-1315. nükleotidleri arasındaki bölge) ile ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, ABD) cihazında dizilendi^[10]. Aynı örnek pirosekans yöntemi (PyroMark, Qiagen, Almanya) ile de çalışıldı. 1b+4 genotipleri saptanan altı örnek NS5B dizi analizi ile genotip 1b, 1a+4 genotipleri saptanan bir örnek kor/E1 dizi analizi ve pirosekans yöntemi ile genotip 1a olarak belirlendi.

Sonuç olarak, ticari kit ile %5.1 oranında çoklu HCV genotipi saptanmıştır. İkinci bir yöntem olarak uygulanan NS5B ve kor/E1 dizi analizi ile bu örneklerin çoklu genotip içerdiği doğrulanmamış ancak 1a/1b alt tip sonuçları doğrulanmıştır. Nükleik asit dizi analizi ile NS5B ve kor/E1 dizilerinin kullanılması genotip belirlemede referans kabul edilmektedir. Ancak, bu tip dizileme yöntemlerinin de virüs havuzundaki daha az orandaki tipleri saptamada duyarlılıklarının daha düşük olması gibi sınırlılıkları bulunmaktadır. Genellikle daha baskın olarak bulunan genotipi saptayabilmektedir. Elde edilen bu verilere göre, referans bölgelerin yeni nesil dizileme gibi duyarlılığı daha yüksek nükleik asit dizileme yöntemleri ile incelenmesi, gerçek çoklu direnç oranlarının saptanması açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014;59:318-27.
2. SCV. Available from: http://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/w/sg_flavi/35.table-1-confirmed-hcv-genotypessubtypes_genotypessubtypes.aspx
3. European Association for Study of Liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection*. *J Hepatol* 2014;60:392-420.
4. Chen Z, Weck K. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol* 2002;40:3127-34.
5. Gowin E, Bereszynska I, Adamek A, Kowala-Piaskowska A, Mozer-Lisewska I, Wysocki J, et al. The prevalence of mixed genotype infections in Polish patients with hepatitis C. *Int J Infect Dis* 2016;43:13-6.
6. Silva MB, Andrade TM, Silva LK, Rodart IF, Lopes GB, Carmo TM. Prevalence and genotypes of hepatitis C virus among injecting drug users from Salvador-BA. *Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:299-303.
7. Kayman T, Karakükçü Ç, Karaman A, Gözütok F. Kayseri Bölgesinde hepatit C virüs enfeksiyonunun genotip dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012;42:21-6.
8. Çizmeci Z. Kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda hepatit C virüs genotiplerinin dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2016;46:27-32.
9. Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirneman J, Gault E, Jeantils V, et al. Phylogenetic analysis confirm the high prevalence of hcv TYPE 4 in Seine- Saint- Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J General Virol* 2001;82:1001-2.
10. Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of Hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007;45:1102-12.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. İmre ALTUĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bornova, İzmir-Türkiye
E-posta: imre.altuglu@ege.edu.tr