
Hepatit C Virüsü (HCV) ile İnfekte 59 Hastada HCV Genotiplerinin Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma

Emine SÖNMEZ*, Mehmet A. TAŞYARAN**, Nedim KIZILKAYA***, Hilal KORKUT****, Zeki TOMBUL*****, Zeynep C. AKÇAM*****, Şerafettin YILMAZ**, Fatih KÖKSAL****, Hakan LEBLEBİCİOĞLU*****, Hamdi EKİCİ*****

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, MALATYA
** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ERZURUM
*** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, MALATYA
**** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA
***** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, ERZURUM
***** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, SAMSUN
***** Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Bu çalışmayı Türkiye'nin bazı bölgelerindeki hepatit C virüsü (HCV) genotiplerini tespit etmek, moleküler epidemiyolojik çalışmalara ışık tutmak, bunların sonucunda tanı ve tedavi ile ilgili yaklaşımları daha doğru planlamak amacıyla gerçekleştirdik.

Bu çalışmada Malatya, Erzurum, Samsun ve Konya yörelerine ait anti-HCV pozitif 80 serum örneğinde reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile HCV-RNA bakıldı; bunların 59'unda (%73.3) HCV-RNA pozitif bulundu. HCV-RNA pozitif olan serumlarda tip spesifik primerler ile genotiplendirme yapıldı. HCV-RNA tespit edilen 59 örneğin 41'inde (%69.5) genotip II (tib I b) tespit edildi. Üç örnekte (%5.1) genotip II + (tip I b + I a) tespit edilirken 15 örnek (%25.4) tiplendirilemedi.

Sonuç olarak HCV genotip II Türkiye'de yaygındır; bu tipin prognozu kötü ve interferon tedavisine yanıtı azdır. Bu nedenle risk faktörlerini azaltmak üzere koruyucu önlemler geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler : HCV genotipleri, HCV-RNA, Türkiye.

SUMMARY

The Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes in 59 HCV Infected Patients: A Multicenter Study

Eighty anti-HCV positive serum samples were collected at university centers in Malatya, Erzurum, Samsun and Konya. HCV-RNA sequences were detected in 59 (73.3%) of these samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers from the 5' non-coding region. HCV-RNA positive samples were subsequently genotyped using type-specific primers from the core region of the virus.

Type II (I b) infection was detected in 41 samples (69.5%), while a mix type I (I a) and II (I b) infection were found in another 3 samples (5.1%). The remaining 15 samples (25.4%) could have not been typed. These results together with the results of previous studies suggest the predominance of genotype II infection in Turkish patients which is known to have poorer prognosis and lower response to interferon treatment.

Key Words : HCV Genotypes, HCV-RNA, Turkey.

HCV-RNA (hepatit C virüs-RNA) tespiti için RT-PCR (reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu) yönteminin yaygın olarak kullanılmaya başlamasından sonra, değişik coğrafi bölgelerde farklı HCV genotipleri belirlenmiş, bu farklılıkları göstermek amacıyla çok sayıda değişik sınıflandırma önerileri olmuştur. Bu sınıflandırmalar HCV genomunun değişik strüktürel veya nonstrüktürel bölgelerinden birine ait sekanslar kullanılarak yapılmıştır. Bu sınıflandırma önerileri arasında en fazla kabul görenler Simmonds ve arkadaşları ile, Okamoto ve arkadaşları tarafından yapılan sınıflandırma önerileri olmuştur (1-3). Simmonds ve arkadaşları NS5 (nonstrüktürel-5) bölgesi sekansına göre yaptıkları sınıflandırmada en az 6 majör genotip ve çok sayıda subtip tanımlamıştır (4,7,8,17,18). Okamoto ve arkadaşları tarafından yapılan sınıflandırma ise, kor (C) bölgesi sekansına göre yapılmış olup, romen rakamları ile belirtilen beş tip önerilmiştir. Okamoto ve arkadaşlarının tanımladığı I, II, III, IV ve V genotipleri, Simmonds ve arkadaşları tarafından tanımlanan 1a, 1b, 2a, 2b ve 3a tiplerine sırasıyla karşılık gelmektedir (4).

HCV genotiplerinin yaygın olarak belirlenmesi, farklı coğrafi bölgelerde farklı HCV tiplerinin daha sık olarak görüldüğünü ortaya koymuştur. ABD'de tip I (tip 1a) en sık görülen tip olarak bildirilirken, Macaristan, Yunanistan, İtalya, Fransa, Almanya gibi Avrupa ülkelerinde, Çin, Japonya, Tayland, Tayvan gibi uzak doğu ülkelerinde ve Rusya'da tip II (tip 1b) en sık görülen HCV tipi olarak bildirilmektedir (5-12). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kronik karaciğer hastalığının şiddetinin ve interferon tedavisine cevabın derecesinin, farklı HCV tipleri ile infekte hastalarda farklılıklar gösterdiğinin belirlenmesi, HCV tip tayininin önemini arttırmıştır (5,6,9,10). Ayrıca günümüzde yaygın olarak kullanılan anti-HCV antikor testlerinin hemen tümünde yer alan antijenler, Choo ve arkadaşları tarafından ilk olarak klonlanmış prototip HCV klonundan (USA tipi, Chiron klonu, genotip 1a) türetilmekte ve bu nedenle bu testler genotip I dışındaki diğer HCV genotipleri ile oluşan infeksiyonlarda daha az duyarlı sonuç vermektedir (5,6,13).

Bu çalışma, ülkemizde en sık görülen HCV genotiplerinin belirlenmesi, moleküler epidemiyolojik çalışmalara ışık tutması, tanı ve tedavi ile ilgili yaklaşımlarımızda yol gösterici olması amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Malatya, Samsun, Konya ve Erzurum yörelerinde yaşayan 20'şer hastaya ait serum örnekleri (toplam 80 adet) çalışma için kullanıldı. Tüm serum örnekleri, anti-HCV pozitif (II. kuşak ELISA) olup ALT değerleri normalden yüksek (> 45 IU/L) idi. Hastalar, yaşları 14 ile 66 arasında (ortalama 43) değişen, 43 erkek, 37 kadın hastadan oluşmakta olup büyük kısmı (56 hasta) sürekli hemodiyaliz tedavisi görmekteydi. Diğer 24 hastanın 9'u kronik karaciğer hastalığı, 15'i ise kronik HCV infeksiyonu tanısıyla polikliniklerde izlenen hastalardan oluşmaktaydı.

Seçilen tüm serum örneklerinde; RT-PCR yöntemi ile HCV-RNA varlığı araştırıldı. Bu amaçla HCV genomunun ileri derecede korunmuş bölgesi olan 5'NC (5' noncoding) bölgesinden seçilmiş primerler kullanıldı. Genotiplemede kullanılan nested PCR yönteminde öncelikle kor bölgesinde "üniversal" bir bölge çoğaltıldı, bunun için (Primer 256: 5'-CGC-GCG-ACT-AGG-AAG-ACT-TC-3', Primer 186: 5'-ATG-TAC-CCC-ATG-AGG-TCG-GC-3') kullanıldı. Tip spesifik primerler ile bu PCR ürünleri tekrar çoğaltıldı. Bu tip spesifik primerler 132 tip 1a, 133 tip 1b, 134 tip 2a ve 135 tip 2b için kullanıldı ve "antisens" dirler; bunların ortak sens primeri 104 no'lu primerdir. Yöntemde kısaca; 100 µl serum örneğinde kuantidin/fenol/kloroform yöntemi kullanılarak RNA ekstrakte edildi (16). Ekstrakte edilen RNA'dan RNase inhibitör (Stratagene), dNTP mix (Stratagene La Jolla, Ca, ABD), avian myeloblastosis virüs revers transkriptaz (Stratagene) kullanılarak DNA kopyası (cDNA) elde edildi. Daha sonra "panozym" kullanılarak amplifiye edildi. Birinci PCR amplifikasyonunda 40 siklus (94°C'de 30 sn, 59°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk.); ikinci olarak nested PCR amplifikasyonunda 35 siklus (94°C'de 1 dk., 60°C'de 1 dk., 72°C'de 1.5 dk.) uygulandı. Amplifiye ürünler etidium bromid ile boyalı %2 aga-

roz jelde elektroforez ile yürütülerek, ultraviyole ışık altında değerlendirildi. HCV-RNA pozitif bulunan örneklerde Okamoto sınıflandırmasına göre tip spesifik primerler –Primer 132: 5'- GGG-GAT-AGG-CTG-AC-3', Primer 133: 5'-GAG-CCA-TCC-TGC-CCA-CCC-CA-3', Primer 134: 5'-CCA-AGA-GGG-ACG-GGA-ACC-TC-3', Primer 135: 5'-ACC-CTC-GTT-TCC-GTA-CAG-AG-3' antisens olarak ve 104: 5'-AGG-AAG-ACT TCC-GAG-CGG-TC-3-' sens olarak kullanıldı, tekrar amplifiye edildi ve jel elektroforezinde yürütülerek tip tayini yapıldı (17).

SONUÇLAR

Çalışmaya alınan 80 serum örneğinden 59 (%73.7)'unda HCV-RNA pozitif bulundu. Malatya Yöresinde 19 (%95), Samsun Yöresinde 18 (%90), Konya Yöresinde 16 (%80), Erzurum Yöresinde 6 (%30) hastada HCV-RNA pozitif bulundu (Tablo 1). HCV-RNA pozitif bulunan 59 serum örneğinin 41 (%69.5)'inde HCV genotip II (Simmonds sınıflamasına göre tip 1b) tespit edildi. Üç (%5.1) serum örneğinde genotip I ve genotip II ile mikst enfeksiyon tespit edilirken, diğer 15 (%25.4) örnekte tiplendirme yapılamadı. Malatya ve Erzurum yöresi hastalarına ait, tiplendirme yapılabilen serum örneklerinde sadece genotip II tespit edilirken, Samsun yöresine ait 2, Erzurum Yöresine ait 1 serum örneğinde genotip I ve genotip II ile mikst enfeksiyon tespit edildi.

TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, serum örneklerinin alındığı tüm yörelerde egemen HCV genotipinin, tip II olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da en sık görülen HCV genotipi olarak tip II bildirilmektedir (5,14,18,19). Akkız ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HCV-RNA pozitif 64 hastaya ait serum örneklerinin 63 (%98.4)'ünde HCV genotip II tespit ederken, sadece bir (%1.6) serum örneğinde genotip I tespit ettiklerini bildir-

mişlerdir (14). Bizim çalışmamızda tip tayini yapılabilen 44 serum örneğinin tümünde HCV genotip II enfeksiyonu saptanmıştır. Ancak bunların 3 (%5.1)'ünde genotip II ile birlikte genotip I enfeksiyonu da bulunmaktaydı. Tip II ve tip I HCV genotipleri haricinde tip görülmemişse de, 15 (%25.4) hastaya ait serum örneğinde tiplendirme yapılamamış olması, kullanılan tip spesifik primerler ile tespit edilemeyen başka HCV genotiplerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda anti-HCV pozitif serumlardan Malatya kaynaklı olanlarda % 95, Samsun, Konya, Erzurum kaynaklı olanlarda sırasıyla %90, %80, %30 oranlarında HCV-RNA tespit edilmiştir. Erzurum örneklerindeki düşük oran, bu serumların daha önceden bir kaç kez başka çalışmalar için dondurulup çözülürük kullanılmaları ve transport sırasındaki uygunsuz koşullardan kaynaklanıyor olabilir.

Birden fazla HCV genotipi ile (mikst) enfeksiyon sıklığı %2 ile %9.7 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (10-12,15). Çalışmamızda bulunan %5.1 oranı bu bildirimlerle uyusmaktadır. Nousbaum ve arkadaşları 220 Fransız ve İtalyan hastasını kapsayan çalışmalarında 12 (%5.4) hastada mikst enfeksiyon saptarken, 26 (%11.8) hastada tiplendirme yapılamadığını bildirmişlerdir (10). Ravaggi ve arkadaşları ise %9.7 oranında mikst ve %8.3 oranında tiplendirme yapılamayan HCV enfeksiyonu bildirmişlerdir (11). Her iki çalışmada da Okamoto sınıflandırmasına göre tip tayini yapılmıştır. Bizim çalışmamızda tiplendirme yapılamayan hastaların oranını (%25.4), bildirilen bu oranlara göre oldukça yüksektir.

Yapılan araştırmalarda HCV genotip II ile enfekte hastalarda hastalık seyrinin daha kötü, viremi miktarının daha fazla, siroz ve hepatosellüler karsinom görülme riskinin daha yüksek, histopatolojik bulguların daha ağır ve interferon tedavisine cevabın diğer tiplere göre en az olduğu bildirilmektedir

Tablo 1. Yörelere Göre HCV-RNA Pozitifliği ve HCV Genotipleri.

Yöre	Hasta sayısı	HCV-RNA pozitif	Tip II	Tip I + II	Tip III/IV	Tiplendirilemeyen
Malatya	20	19	14	0	0	5
Samsun	20	18	10	2	0	6
Konya	20	16	11	1	0	4
Erzurum	20	6	6	0	0	0
Toplam	80	59	41	3	0	15

(6,9,10,15). Bu nedenlerle, ülkemizde HCV genotip II ile infeksiyonun sık görülmesi hastalarımız açısından önemli olup, takip ve tedavileri esnasında göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca HCV infeksiyonunun yayılımının önlenmesi için kan bankalarında anti-HCV testinin zorunlu hale getirilmesi, hemodiyaliz merkezlerinde anti-HCV pozitif hastalar için ayrı makine kullanılması gibi önlemlerin alınması gerekir.

Sonuç olarak, araştırma yapılan yörelerimizde HCV genotip II'nin en sık görülen HCV genotipi olduğu, genotip I'in daha nadir olsa da mikst infeksiyon şeklinde görüldüğü, Okamoto sınıflandırmasına göre HCV genomunun kor bölgesinden seçilmiş primerlerle %25 kadar yüksek oranda örneğin tiplendirilemediği görüldü. Araştırmamızın farklı dört yöremizden sağlanan serum örnekleri ile yapılması dolayısıyla ülkemiz genelini kısmen yansıtabileceği, sözkonusu yörelerde hakim genotipin HCV tip II olduğu söylenebilir. Bu tipin prognozunun diğerlerine göre daha kötü seyretmesi, interferon tedavisine yanıtın daha az alınması nedeniyle HCV infeksiyon bulaşma risklerini tespit ederek en aza indirmek, korunmayı ön plana çıkarmak hedeflenmelidir diyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9.
2. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73:673-9.
3. Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, et al. Characterisation of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* 1993;74:2385-90.
4. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4.
5. Yenen Ş. Hepatit C virüsü (HCV) molekül özellikleri ve serolojik tanı: Kılıçturgay K (ed). *Viral Hepatit '94*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 1994:133-90.
6. Lemon SM, Brown EA. Hepatitis C virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth edition, Newyork: Churchill Livingstone, 1995:1474-86.
7. Mc Omish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994;32:884-92.
8. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. In: Car-

lo HT, Joel MA (eds). *American Association for the study of liver diseases. Viral hepatitis A to F: an update*. Chicago 1994:301-5.

9. Martin P. Hepatitis C genotypes: The key to pathogenicity? *Ann Intern Med* 1995;122:227-8.
10. Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, et al. Hepatitis C virus type 1b (III) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995;122:161-8.
11. Ravaggi A, Zonaro A, Marin MG, Puoti M, Albertini A, Cariani E. Distribution of viral genotypes in Italy determined by hepatitis C virus typing by DNA immunoassay. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2280-4.
12. Wu JS, Lee HF, Hsiao HL, et al. Genotype distribution of hepatitis C virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 1994;44:74-9.
13. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62.
14. Akkız H, Çolakoğlu S, Köksal F, Korkut H, Hafta A. Çukurova bölgesinde hepatit C virus genotipleri. XII. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi ve II. Türk-Japon Gastroenteroloji Günleri, 25-30 Eylül İzmir, Kongre Özet Kitabı 1995;97.
15. Çakaloğlu Y. Hepatit C virusu infeksiyonu (C hepatiti) epidemiyoloji-patogenez-klinik-tedavi: Kılıçturgay K (ed). *Viral Hepatit '94*, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 1994:191-235.
16. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162: 156-9.
17. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73: 673-679.
18. Dusheiko G, Schmilovitz-Weisse H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S et al. Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19:13-18.
19. Viazov S, Zibert A, Widell A, Cavicchini A. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. *J Virol Methods* 1994;48:81-92.

YAZIŞMA ADRESİ:

Yard. Doç. Dr. Emine SÖNMEZ

Zafer Mahallesi 14. Sok.

Sancak-1 Apt. No:16

MALATYA

Makalenin geliş tarihi: 15.02.1996, kabul tarihi: 29.03.1996