

## C-hepatiidi viirus ja tema genotüübid Eestis

Eva Žusinaite<sup>1</sup>, Kai Jõers<sup>2</sup>, Riina Salupere<sup>3</sup> – <sup>1</sup>TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituut, <sup>2</sup>Quattromed OÜ, <sup>3</sup>TÜ sisekliinik, TÜ Kliinikumi sisekliinik

### C-hepatiidi viirus, genoomne organisatsioon, genotüübid

**Krooniline C-viirushepatiit on tõsine tervishoiuprobleem üle maailma. Seni Eesti ajakirjanduses ilmunud artiklid on käsitlenud põhiliselt kroonilise C-hepatiidi levikut Eestis, selle kliinilisi avaldumisvorme ja raviküsimusi. Käesolevas artiklis on antud ülevaade kroonilise C-hepatiidi tekitajast, selle genoomi struktuurist ja genotüüpide levimusest Eestis. Et välja selgitada HCV genotüüpide levimusmustrit Eestis, määrati viiruse genotüübid C-hepatiidi patsientide seerumitest kahel ajaperioodil. Selgus, et HCV genotüüpide jaotumus aastate jooksul ei olnud oluliselt muutunud. Mõlemal uuringuperioodil oli enam levinud HCV alltüüp 1b, vähem esines alltüüpe 3a, 2a ja 1a. Statistiliselt oluliselt oli suurenenud HCV reinfektsioonide arv.**

C-hepatiidi viirusest (HCV) põhjustatud kroonilist hepatiiti peetakse üheks põhiliseks kroonilise maksakahjustuse põhjustajaks arenenud riikides. Kuna HCV-infektsioon kulgeb aeglaselt ja sümptomivaeselt, siis on raske adekvaatselt hinnata haiguse tõelist kliinilist tähtsust. Infektsiooni ulatusliku leviku järgi viimastel aastakümnetel võib ennustada kroonilise hepatiidi tüsistuste (maksatsirroos, maksavähk) suurenemist üle maailma. HCV-infektsiooni leviku ja loomuliku kulu iseärasuste teadmine on oluline haiguse võimalikult varajaseks diagnoosimiseks ning adekvaatse ravi planeerimiseks.

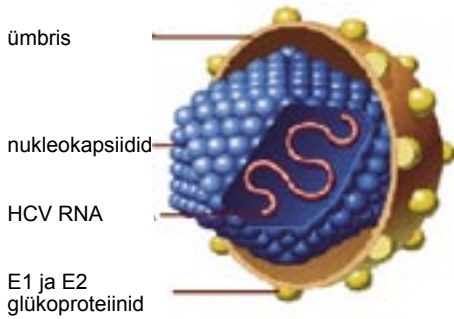
HCV-positiivsed patsiendid tuvastatakse tavaliselt doonorivere rutiinsel uuringul või ägeda hepatiidi esinemise korral. Eestis alustati HCV-vastaste antikehade määramist doonoriveres 1993. aastal. Aastail 1995–1996 tehtud uuringu järgi esinesid HCV-vastased antikehad ligikaudu 1%-l Tartu Verekeskuse ja Põhja-Eesti Verekeskuse veredonoritel (1). Samas on teada, et veredonoritel on C-hepatiidi viiruse antikehade levimus alati väiksem kui üldrahvastikus. Ägeda hepatiidi juhtumid registreeritakse, kuid arvestama peab sellega, et enamasti on need vaid kliiniliselt avalduvad juhud (2). Kroonilise C-viirushepatiidi diagnoosimise aluseks on HCV RNA kindlakstegemine vereseerumis ning üle 6 kuu kestnud püsiva maksakahjustuse ole-

masolu (3). Kroonilise C-hepatiidi levikut on raske hinnata, kuna kindlasti esineb C-hepatiiti rohkem, kui seda diagnoositakse. Eesti meditsiinikirjanduses on käsitletud HCV-infektsiooni levikut, haiguse loomulikku kulgu, selle immunopatoloogiat, maksaväliseid manifestatsioone ning kroonilise C-hepatiidi ravi (4–6). Samas on vähe kirjeldatud viirust ennast, kuigi viiruse molekulaarbioloogiliste iseärasuste teadmisel põhineb infektsiooni diagnostika, replikatsioonimehhanismide tundmine ning uute ravimite väljatöötamine.

Käesoleva artikli **eesmärgiks** on anda ülevaade C-hepatiidi viirusest, tema genoomsest struktuurist ja HCV genotüüpide levimusest Eestis.

### HCV genoomne organisatsioon

C-hepatiidi viirus (*Hepatitis C virus*) kuulub sugukonnast *Flaviviridae* perekonda *Hepacivirus*. C-hepatiidi viirust kirjeldati esimest korda alles 15 aastat tagasi, 1989. aastal firma Chiron teadlaste poolt (7). Nüüdseks on teada, et HCV on üheahelalise lineaarse RNA genoomiga viirus, tema virion on kerajas ja lipiidümbrisega. Lisaks HCV-le kuuluvad *Flaviviridae* sugukonda ka kollapalaviku viirus ja puukentsefaliidi viirus. HCV genoom on ligikaudu 10 000 nukleotiidi suurune, millelt transleeritakse ühte umbes 3000 aminohappega polüproteiini. Sünteesi järel lõigatakse polüproteiin



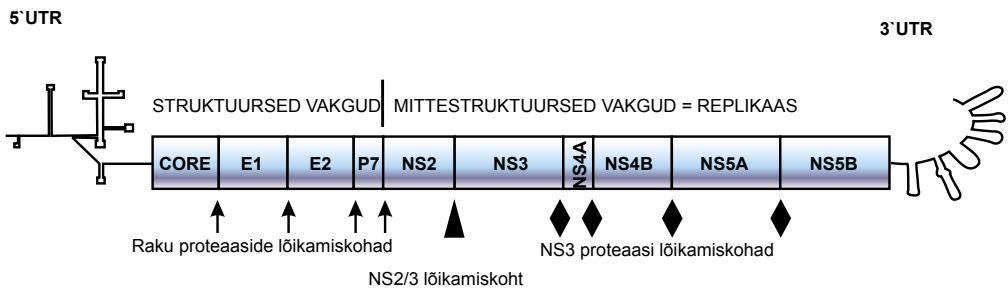
Joonis 1. HCV virion ([www.rit.edu/~japfaa/infectious.html](http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html)).

nii viiruse enda kui ka peremeesraku proteaaside abiga üksikuteks funktsionaalseteks valkudeks. Neist kolm on olulised struktuurvalgud ja ülejäänud on mittestruktuurvalgud, mis osalevad viiruse replikatsioonil.

Viiruse struktuurvalgud – *core* (C), *envelope* 1 (E1) ja *envelope* 2 (E2) – kodeeritakse genoomi alguses (5' otsas). E1 ja E2 on virioni ümbrise (*envelope*) valgud. E1 ja E2 valke kodeerivates geenides on kõige suurem mutatsioonide tekkimise sagedus HCV genoomis; seda seletatakse sellega, et virioni ümbrisel asuvad valgud on inimorganismi humoraalse immuunvastuse esmasteks märklaudadeks, olles seega n-ö pideva selektsiooni all. Samas ei lase selline virioni ümbrise valkude aminohappelise koostise varieerumine välja kujuneda immuunvastusel, mis võibki olla üks kroonilise C-hepatiidi tekke põhjus. Virioni ümbrise all asub nukleokapsiid, mille moodustab kapsiidivalgu C (*core*) abiga kompaktselt pakitud viiruseline RNA (vt jn 1).

Peale struktuurvalkude transleeritakse HCV genoomilt ka mittestruktuurseid, viiruse replikatsiooniks vajalikke valke: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ja NS5B (vt jn 2). Valk NS2 ja osa valgust NS3 on proteaase aktiivsusega, proteaasi funktsiooniks on HCV genoomilt transleeritava polüproteiini mittestruktuurse osa lõikamine funktsioneerivateks valkudeks. NS3 valgu C-terminus on helikaasse aktiivsusega. Valk NS4A on NS3 proteaasi kofaktor. Valkude NS4B ja NS5A funktsioon on teadmata, samas seostatakse mutatsioone NS5A geenis interferoonravi resistentsuse olemasoluga. NS5B – replikatsioonikompleksi "võti" – on RNAst sõltuv RNA-polümeraas, mis koostöös teiste viirusvalkudega sünteesib uusi viiruselise RNA koopiaid (8).

C-hepatiidi viiruse genoomse RNA 5' ja 3' otsad on mittetransleeritava järjestusega (*untranslated region*, 5'UTR ja 3'UTR). 5'UTR on HCV genoomi kõige konserveerunud osa, selle homoloogia erinevate HCV tüüpide vahel on 92%. 5'UTR ots peab olema konserveerunud, kuna ta osaleb viiruse replikatsioonis, mutatsioonid selles genoomi osas pärsiksid viiruse paljunemist. Erinevalt peremeesrakust ja enamikust teistest viirustest kasutab HCV RNA ribosoomi sisenemiseks mitte 5' „cap“ mehhanismi, vaid omapärast struktuuri – ribosoomi sisenemissaiti (*internal ribosome entry site*, IRES). IRESe moodustavad viiruse genoomi 5'UTR sekundaarstruktuurid ehk RNA "juuksenõela"- ja "silmuse"-sarnased moodustised. See lubab viirusel transleerida oma valke peremeesraku ribosoomidel 5' „cap“ sõltumatult, mis loob eelise viirusvalkude sünteesiks. Genoomse RNA 3'UTR ots moo-



Joonis 2. HCV genoomse organisatsioon. Polüproteiini lõikamiskohad on näidatud nooltega (8).

dustab samuti keerulise sekundaarstruktuuri, mis omab tähtsust viiruse RNA äratundmisel NS5B polümeraasi poolt (vt jn 2).

## HCV genotüübid

C-hepatiidi viiruse üheks iseloomulikuks jooneks (nagu ka paljude teiste RNA-viiruste puhul) on selle genoomi suur varieeruvus. Mutatsioonide suur tekkesagedus replikatsioonil tuleneb viiruse NS5B RNA-polümeraasi võimetusest parandada sünteesi käigus tehtud vigu (erinevalt DNA-polümeraasidest). See viib aja jooksul vigade akumulierimiseni ja seega paljude geneetilisel lähedaste viirusevariantide tekkeni. Simmonds'i klassifikatsiooni (9) järgi jaotatakse C-hepatiidi viirused 6 peamiseks genotüübiks ning mitmeks alltüübiks (üle 80). Genotüüpe tähistatakse numbritega 1 kuni 6, alltüüpe väikeste tähtedega a, b, c jne vastavalt nende avastamise järjekorrale. Iga HCV genotüübi genoom erineb teistest (s.t ühed nukleotiidid on asendatud teistega) umbes 30% ulatuses. Alltüüpide vahel on genoomide erinevuste ulatus ligikaudu 20%. Virioni valkudes avaldub see aminohapete asendustena. Kuna virioni valgud käituvad organismis antigeenidena, siis nakatumisel erinevate HCV genotüüpidega tekivad immuunvastusena ka erinevad antikehad. Sellest tingituna on HCV immuunvastus alltüüp-spetsiifiline, s.t et antikehad HCV 1b alltüübi vastu ei tunne ära 3a alltüüpi viiruse antigeene. See omakorda teeb keeruliseks tõhusa HCV-vaktsiini väljatöötamise.

HCV alltüüpidel on erinev geograafiline jaotumus. Näiteks on Euroopas enam levinud geno-

tüübid 1b, 2 ja 3a, Põhja-Ameerikas 1a ja 1b, Jaapan on HCV 1b infektsiooni endeemiline koht, Egiptuses on levinud genotüüp 4, Kagu-Aasias genotüüp 6 (10). Paljud uuringud näitavad, et HCV genotüüpide jaotumine varieerub ka spetsiifiliselt vastavalt riskirühmadele. Ilmselt on erinevad alltüübid kohastunud kindlatele ülekandeviisidele: nii seostatakse genotüüpide 1a ja 3a kandlust rohkem veenisestest narkootikumide süstimisega ning genotüübi 1b kandlust verepreparaatide kaudu saadud nakkusega (10). Lisaks on viiruse genotüübi teadmisel ka kliiniline tähtsus. Uuringud on näidanud, et 1b genotüübi infektsiooni puhul tekib maksatsirroos kiiremini. Samuti alluvad genotüübi 1, 4, 5 ja 6 infektsioonid palju halvemini viirusevastasele ravile (11): kombineeritud interferooni ja ribavariini aastane ravi on tulemuslik 35%-l patsientidest. Genotüüpide 2 ja 3 puhul allub samale ravile juba 80% patsientidest. Seega, genotüübi määramine on vajalik raviotsustuste tegemisel.

## Genotüpeerimine aastatel 1997–1998

Eestis korraldati HCV genotüüpide epidemioloogiline uuring aastail 1997–1998 (12). Määrati HCV alltüübid 215 kroonilise C-hepatiidi patsiendi seerumist. Määramine toimus paralleelselt kahe meetodiga: PCR (polümeraasahelreaktsioon) genotüübspetsiifiliste praimeritega, mis amplifitseerivad lõiku kapsiidiavalgu geenist, ja HCV genoomi 5'UTR osa PCR amplifikatsiooniproducti RFLP (restriktsioonifragmentide pikkuse polümorfism) analüüs. Kahe meetodi kasutamine lubas korrektselt iseloomustada genotüüpe ja segainfektsioone.

**Tabel 1. HCV genotüüpide jaotumus (% kõigist positiivsetest patsientidest) kahe kasutatud meetodi tulemusel**

HCV genotüüp	Genotüübspetsiifiline PCR %	RFLP-analüüs %
1a	0,9	0,9
1b	56,3	64,2
3a	13,9	22,3
2a	6,5	5,6
4	0,5	0
Segainfektsioon	13,5	0
Tundmatu	1,4	0,9

Ehkki kõik uuringus analüüsitud seerumid olid anti-HCV positiivsed, osutus osa neist HCV-RNA negatiivseks (7%-l juhtudel genotüübispetsiifilise PCRiga ja 6,1%-l RFLP analüüsiga). Tingitud võis see olla sellest, et PCR-metoodikaga määratakse viiruse olemasolu seerumis, antikehadega aga organismi vastus viirusele (nakkus võis olla patsiendil juba mitu aastat tagasi).

Kahes uurimuses saadud tulemused ei kattunud täielikult. Suurim lahknevus ilmnis segainfektsioonide detekteerimisel. Alltüübispetsiifilise PCR-analüüsi tulemusel leiti, et HCV seganakkuse osakaal uuritud rahvastikus on 13,5%, samal ajal kui RFLP-metoodikaga määrati samadest proovidest vaid üks genotüüp (vt tabel 1).

Sama uuringu raames püüti välja selgitada HCV leviku teed ja genotüüpide jaotumine erinevates riskirühmades. Patsiendid olid jaotatud rühmadeks viiruse edasikandmise tee (vereülekanDED ja kirurgilised operatsioonid, veenisistest narkootikumide süstimine, teised ülekanDE teed) ning vanuse (alla 30 aasta ja üle 30 aasta) alusel. HCV 1b alltüüp oli enam esindatud vereülekanDEid või kirurgilist vahelesegamist saanud patsientide rühmas. Selle rühma patsiendid olid enamasti vanemad kui 30 aastat. Süstitavate narkootikumide kasutajate rühmas oli enam levinud 3a genotüüp, kusjuures need patsiendid olid põhiliselt noored inimesed. Need andmed on kooskõlas ka teistes Euroopa riikides tehtud uuringute tulemustega, kus samuti näidati HCV genotüüpide jaotumuse muutumist aja jooksul ning mis lubasid prognoosida HCV 3a ja teiste harva esinevate alltüüpide sagedenemist ning 1b infektsiooni osatähtsuse vähenemist järgnevatel aastatel (13).

### Genotüpeerimine aastatel 2000–2004

Selleks et hinnata HCV genotüüpide esinemist järgnevatel aastail, analüüsiti HCV genotüüpide esinemist labori andmeil. Analüüsiti Quattromedi laborisse HCV genotüübi määramiseks saadetud 459 seerumit (ajavahemikul 2000. aasta 2. poolst kuni 2004. aasta alguseni). Genotüübi määramiseks kasutati RFLP-analüüsi genoomi 5' UTR

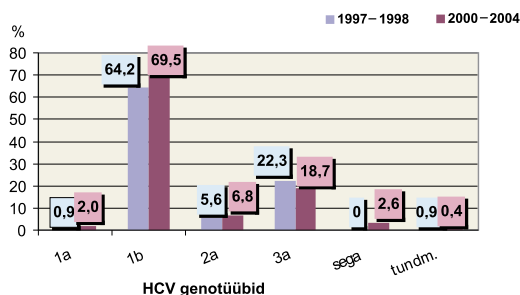
osast. Tulemused on järgmised: 1a – 2,0%, 1b – 69,5%, 2a – 6,8%, 3a – 18,7%, segatüüp – 2,6%, määramata tüüp – 0,4%.

### Tulemused

Tulemuste võrdlus eelnevatel aastatel määratud genotüüpidega on toodud joonisel 3 (võrdluseks on võetud ainult RFLP-metoodiga saadud andmed). Genotüüpide jaotumus ei ole muutunud, erinevused genotüüpide esinemises ei ole statistiliselt olulised ( $p > 0,05$ ). Ei tulnud esile ka 3a alltüübi osakaalu kasvu ja 1b alltüübi vähenemist. Väärrib tähelepanu segainfektsioonide kasv. Aastail 1997–1998 ei olnud RFLP-metoodiga määratud ühtegi segainfektsiooni. Seetõttu peeti RFLP-metoodit usaldusväärsemaks võrreldes genotüübispetsiifilise PCRiga, mis andis rohkem mittespetsiifilisi tulemusi segagenotüüpide näol (mittespetsiifiline praimeerite seostumine PCRi käigus on selle meetodi üheks puuduseks). 2000.–2004. aastal analüüsitud seerumitest on segainfektsioon kindlaks tehtud 2,6% juhtudest. Statistilisel analüüsil osutus see erinevus oluliseks ( $p = 0,025$ ). Sage-dam segatüübi esinemine võib peegeldada tõelist mitme viirusega infektsiooni esinemist, eriti arvestades suurenenud ohtu saada viirus rohkem kui ühest allikast (eelkõige süstivate narkomaanide üksikrühmas).

### Kokkuvõte

Eestis on enam kui kahel kolmandikul kroonilise C-viirushepatiidi patsientidel HCV genotüübiks 1b. Teistest genotüüpidest on esindatud 3a,



Joonis 3. HCV genotüübid Eestis erinevatel aastatel.

2a, 1a ning segatüübid. HCV genotüüpide võrdlus erinevatel ajaperioodidel (1997–1998 ja 2000–2004) näitas, et jaotus ei ole muutunud. Viimastel aastatel on rohkem leitud segainfektsioone (0% vs 2,6%) ning see erinevus on sta-

tistiliselt oluline. Suurenenud segainfektsioonide diagnoosimise sagedus võib olla seotud mitme viirusega nakatumisega näiteks mitmest infektsiooni-allikast.

#### Kirjandus

1. Tamme J, Rahu M, Kallassalu H, Sultsmann M-K, Lemming L, Veske M. C-hepatiidi-antikehade levimus veredoonoritel Eestis aastail 1995–1996. *Eesti Arst* 1997;(6):490–3.
2. Salupere R, Koldits A. Kroonilise C-hepatiidi esinemisest Eestis. *Eesti Arst* 1998;(4):299–302.
3. Salupere R, Margus B, Prükk T, Ott K. Kroonilise C-hepatiidi ravijuhend. *Eesti Arst* 2002;81(4):237–40.
4. Kutsar K. C-viirushepatiit. *Eesti Arst* 2002;81(2):74–6.
5. Tefanova V, Kremerman I, Priimägi L, Tallo T, Zilmer K, Ott K. Immuunsüsteemi funktsionaalse seisundi hindamine ägeda B- ja C-viirushepatiidi korral. *Eesti Arst* 1998;(2):106–9.
6. Kõiva P, Salupere R. Kroonilise C-hepatiidi ja porphyria cutanea tarda koosesinemisest. *Eesti Arst* 2001;80(10):468–73.
7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–62.
8. Pavio N, Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *Biosci* 2003;28(3):287–304.
9. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321–4.
10. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(2):223–35.
11. Kleter B, Brouwer JT, Nevens F, van Doorn LJ, Elewaut A, Versieck J, et al. Hepatitis C virus genotypes: epidemiological and clinical associations. Benelux Study Group on Treatment of Chronic Hepatitis C. *Liver* 1998;18(1):32–8.
12. Žusinaite E, Krispin T, Raukas E, Kiiver K, Salupere R, Ott K, et al. Hepatitis C virus genotypes in Estonia. *APMIS* 2000;108(11):739–46.
13. Schroter M, Zollner B, Schafer P, Reimer A, Muller M, Laufs R, et al. Epidemiological dynamics of hepatitis C virus among 747 German individuals: new subtypes on the advance. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1866–8.

#### Summary

#### Hepatitis C virus and its genotypes in Estonia

Chronic hepatitis C virus infection is one of the most important public health problems. The data published in the Estonian specialist literature until now describe mostly the clinical manifestation and treatment issues of chronic hepatitis C. The present paper gives an overview of the hepatitis C virus, its genome organization and genotypes in Estonia. HCV genotypes were determined in hepatitis C virus-positive patients' sera in two different periods of time: 1997–1998 and 2000–2004. The results

of our studies demonstrate that the distribution pattern of HCV genotypes has not changed much. The most prevalent HCV genotype is 1b. The subtypes 3a and 2a are present to a lesser degree and there have also been found some representatives of the genotype 1a. The increase in the detection rate of mixed infections was found to be statistically significant.

Eva Zusinaite@hotmail.com