

¹Paweł Kozłowski, ¹Joanna Pogorzelska, ¹Tadeusz Wojciech Łapiński, ²Oksana Kowalczyk, ²Jacek Nikliński,
¹Robert Flisiak

WYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW HCV I POLIMORFIZMU SNP rs12979860 WŚRÓD ZAKAŻONYCH HCV PÓŁNOCNO-WSCHODNIEJ POLSKI

THE OCCURRENCE OF HCV GENOTYPES AND SINGLE POLYNUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF rs12979860 AMONG HCV INFECTED PATIENTS IN NORTHEASTERN POLAND

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

HCV jest odpowiedzialny za rozwój przewlekłego zapalenia wątroby typu C, marskości wątroby oraz raka wątrobowokomórkowego. W Polsce dominuje genotyp 1, a w następnej kolejności występują zakażenia genotypami 3 i 4. Badania wykazały, że zmiany SNP rs12979860 ludzkiego chromosomu 19 wpływają na możliwość eliminacji zakażenia zarówno spontanicznie, jak też pod wpływem terapii przeciwwirusowej.

CELEM PRACY. była ocena częstości zakażenia poszczególnymi genotypami HCV w województwie podlaskim w okresie od 2002 do 2011 roku oraz określenie częstości występowania poszczególnych genów związanych z polimorfizmem miejsca rs12979860 wśród kwalifikowanych i leczonych chorych.

BADANIA I METODY. Ocenę genotypów przeprowadzono u 923 osób zakażonych HCV, a określenie genów SNP rs12979860 wykonano u 126 chorych (97, zakażonych genotypem 1, 17 - genotypem 3 i 12 - genotypem 4). Zakażenie HCV stwierdzono na podstawie wykrycia w surowicy krwi HCV-RNA i jego genotypu metodą RT- nested - PCR (Syngen Biotech, USA). Polimorfizm rs12979860 wykrywano metodą sekwencjonowania, przy użyciu metody PCR. Ostateczną ocenę określano korzystając z aparatury 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

WYNIKI. Zakażenie HCV obserwowano częściej wśród mężczyzn (60%). Genotyp 1 stwierdzono u 66% chorych, genotyp 3 u 27%, a genotyp 4 u 7% chorych. W czasie 10 lat stwierdzono powolny wzrost odsetka chorych zakażonych genotypem 4 HCV. Wśród zakażonych genotypem 1 HCV oczekujących na leczenie przeciwwirusowe i chorych po zakończonej terapii występowanie genotypu C/C stwierdzano u 21%, C/T u 59%, a T/T u 20% badanych.

WNIOSKI. Najczęściej w Polsce północno - wschodniej występuje genotyp 1 HCV. Obserwuje się powolny wzrost zakażeń genotypem 4. U 79% chorych

ABSTRACT

HCV is responsible for the development of chronic hepatitis C, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Polish population is mainly dominated by genotype 1 infections, genotypes 3 and 4 are less common. Studies have shown that changes in SNP rs12979860 of human chromosome 19 affect their ability to eliminate infection both spontaneously and during the antiviral therapy.

THE AIM OF THIS STUDY was to evaluate the frequency of different HCV genotype infections in the Podlasie region during the period from 2002 to 2011 and to determine the frequency of particular genes associated with rs12979860 polymorphism amongst patients both eligible for treatment and currently undergoing the treatment.

METHODS. Research and evaluation of the genotypes was performed in 923 cases of HCV and in 126 cases genes rs 12.97986 were identified (97 patients infected with genotype 1, 17 - genotype 3 and 12 - genotype 4). HCV infection was confirmed by the detection of HCV-RNA and its genotype in serum with RT-nested - PCR (Syngen Biotech, USA). Rs12979860 polymorphism was detected by sequencing, using PCR. The final scores were determined using 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

RESULTS. HCV infection was more frequent among men (60%). Genotype 1 was found in 66% of patients, genotype 3 in 27% and genotype 4 in 7% of patients. During period of 10 years slow increase of genotype 4 HCV infection prevalence was observed. Among patients infected with genotype 1 HCV waiting for the treatment and those who already completed antiviral therapy the presence of genotype C/C was found in 21%, C/T in 59% and T/T in 20%.

CONCLUSIONS. The most common in Northeastern Poland is genotype 1 of HCV. There has been a slow increase of infections with genotype 4. In 79% of patients infected with genotype 1 of HCV genotypes C/T

zakażonych genotypem 1 HCV stwierdza się genotyp C/T lub T/T będące niekorzystnym czynnikiem prognostycznym terapii.

Słowa kluczowe: genotypy HCV, zmienność genetyczna IL-28B

WSTĘP

HCV jest wirusem odpowiedzialnym za rozwój przewlekłego zapalenia wątroby typu C, marskości wątroby oraz raka wątrobowokomórkowego. Spośród 6 znanych genotypów wirusa, w Europie i Ameryce Północnej dominuje genotyp 1, a w następnej kolejności występują zakażenia genotypami 2 i 3. Zakażenia genotypem 4 dotyczą najczęściej chorych z Afryki Północnej i Bliskiego Wschodu, jednak coraz częściej, zakażenie tym genotypem jest rozpoznawane również w Europie (1, 2).

Standardem w leczeniu przewlekłe zakażonych HCV jest terapia interferonem pegylovanym alfa w skojarzeniu z rybawiryną. W 2011 roku zarejestrowane zostały również dwa leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAA – *Direct Acting Antivirals*), inhibitory proteazy: Telaprewir (TVR) i Boceprewir (BOC). Mogą być one dołączane do terapii interferonem i rybawiryną u zakażonych genotypem 1 HCV, u których powodują znaczącą poprawę skuteczności leczenia. Jednak nawet taka terapia trójlekowa nie zawsze jest skuteczna. Wyniki wieloośrodkowych badań klinicznych wskazują na bardzo wysoką, jednak nie 100% skuteczność nowych leków przeciwwirusowych. Obserwacje te potwierdzają istnienie czynników zależnych od pacjenta i wpływających na efektywność terapii. Najlepszymi predyktorami skuteczności leczenia jest uzyskanie odpowiedzi wirusologicznej w 4 tygodniu (RVR), lub w 12 tygodniu (EVR) leczenia. Ostatecznym wskaźnikiem równoważnym wyleczeniu jest uzyskanie przetrwałej odpowiedzi wirusologicznej ocenianej w 6 miesięcy po zakończeniu terapii (SVR). Badania nad czynnikami warunkującymi odpowiedź na leczenie, które mogą być określone jeszcze przed rozpoczęciem terapii stanowią bardzo zachęcające wyzwanie. Jednym z takich niedawno opisanych wskaźników skuteczności terapii jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w promotorze genu IL-28B (rs12979860) zmapowanym na chromosomie 19. Stwierdzono występowanie zależności pomiędzy występowaniem genotypów C/C, C/T lub T/T, oraz prawdopodobieństwem spontanicznej eliminacji zakażenia, a także uzyskaniem odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe.

Celem pracy była ocena częstości występowania genotypów HCV w województwie Podlaskim i ewentualna jej zmienność w okresie od 2002 roku do 2011 roku.

or T/T have been found which is an adverse prognostic factor of the treatment.

Key words: HCV genotype, genetic variation in IL28B

Ponadto określono częstość występowania genotypów polimorfizmu rs12979860 wśród chorych kwalifikowanych do leczenia w latach 2011-2012.

MATERIAŁY I METODY

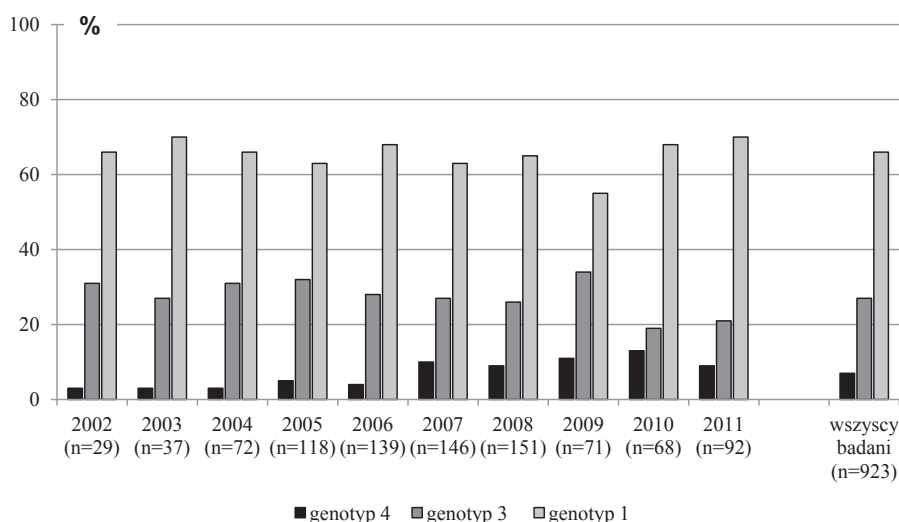
HCV RNA w osoczu krwi pacjentów oznaczano metodą RT-nested-PCR ze starterami reakcji swoistymi wobec niekodującego 5'-końcowego obszaru genomu (5'-UTR) wirusowego. Genotyp wirusa określano metodą bezpośredniego sekwencjonowania uzyskanego w reakcji PCR produktu. Polimorfizm rs12979860 oceniano na drodze sekwencjonowania produktu PCR obejmującego wyżej wymieniony SNP. Sekwencjonowanie wykonano metodą terminacji syntezy łańcucha z zastosowaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

Izolację DNA z krwi pełnej pacjentów oraz RNA z osocza krwi wykonano na aparacie do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych EasyMag (Biomerieux, Francja) techniką magnetyczną według protokołu producenta z wykorzystaniem gotowych odczynników tegoż producenta. Przed izolacją białka krwi zostały strawione na drodze inkubacji z Proteinazą K (Sigma-Aldrich). Reakcje PCR wykonywano przy użyciu polimerazy DNA *Taq* i mieszaniny dNTPs (EURx, Gdańsk), odwrotną transkrypcję – polimerazy *Tth* (Epicentre, USA). Produkty PCR przeznaczone do sekwencjonowania oraz produkty reakcji terminacji syntezy łańcucha oczyszczano z zastosowaniem gotowych zestawów odczynników „Gel-Out” oraz „Ex-Terminator” (DNA II Gdańsk, Gdańsk). Sekwencjonowanie DNA wykonano na automatycznym sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA). Uzyskane sekwencje analizowano przy użyciu programu BLAST (NCBI, USA).

Analiza statystyczna. Analizę statystyczną przeprowadzono używając testów Spearmana i Chi-kwadrat (χ^2). Istotność statystyczną określono jako $p < 0,05$.

WYNIKI

Genotyp HCV określono u 923 osób chorych, przewlekłe zakażonych HCV (369 kobiet i 554 mężczyzn) w wieku od 25 do 81 lat. Genotyp 1 stwierdzano u 66%



Ryc. 1. Występowanie genotypów HCV wśród badanych 923 osób przewlekle zakażonych HCV na terenie województwa podlaskiego w okresie od 2002 do 2011 roku

Fig.1. The occurrence of HCV genotypes among 923 patients with chronically infected HCV in the Podlasie region in the period from 2002 to 2011

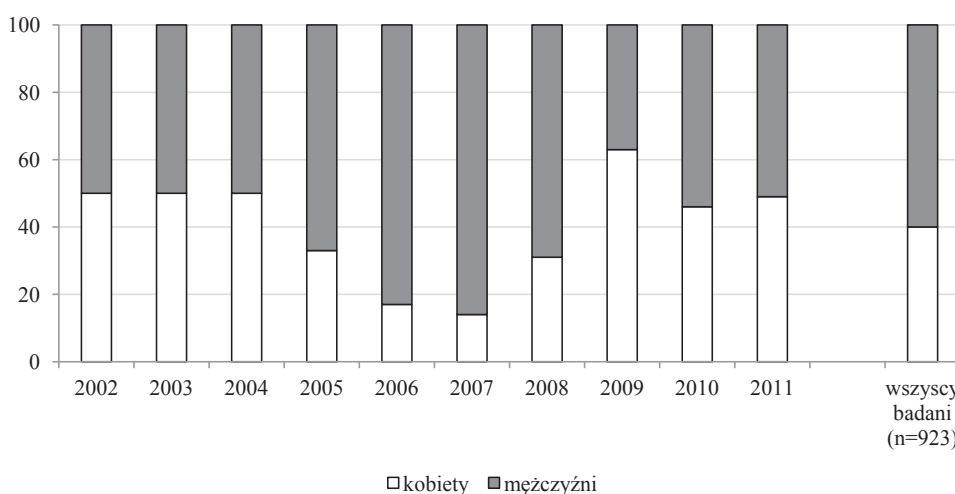
chorych, genotyp 3 u 27%, a genotyp 4 u 7% chorych. W okresie ostatnich dziesięciu lat nie stwierdzano istotnych zmian częstości występowania genotypu 1, natomiast obserwowano zmniejszenie się odsetka chorych zakażonych genotypem 3 i wzrost liczby chorych z genotypem 4 (ryc. 1). Zakażenie HCV częściej stwierdzano wśród mężczyzn (60%) niż u kobiet (40%), (ryc.2).

Ocenę polimorfizmu na rs12979860 przeprowadzono u 126 chorych, w tym u 97 chorych zakażonych genotypem 1. Oceniając wszystkich chorych zakażonych genotypem 1, przed i po leczeniu, C/C występowało u 21%, C/T u 59%, a T/T u 20% badanych. W grupie chorych zakażonych genotypem 1 uprzednio nie leczonych, oczekujących na terapię wykazano po-

dobne odsetkowe występowanie genotypów C/C-19%, C/T-65%, T/T-16%, (ryc. 3). Rozkład polimorfizmu na rs12979860 u zakażonych genotypami 3 i 4 charakteryzował się wyższym odsetkiem występowania alleli C/C, ale stosunkowo niedużą liczebność tych grup uniemożliwia wyciągnięcie wniosków (ryc.3).

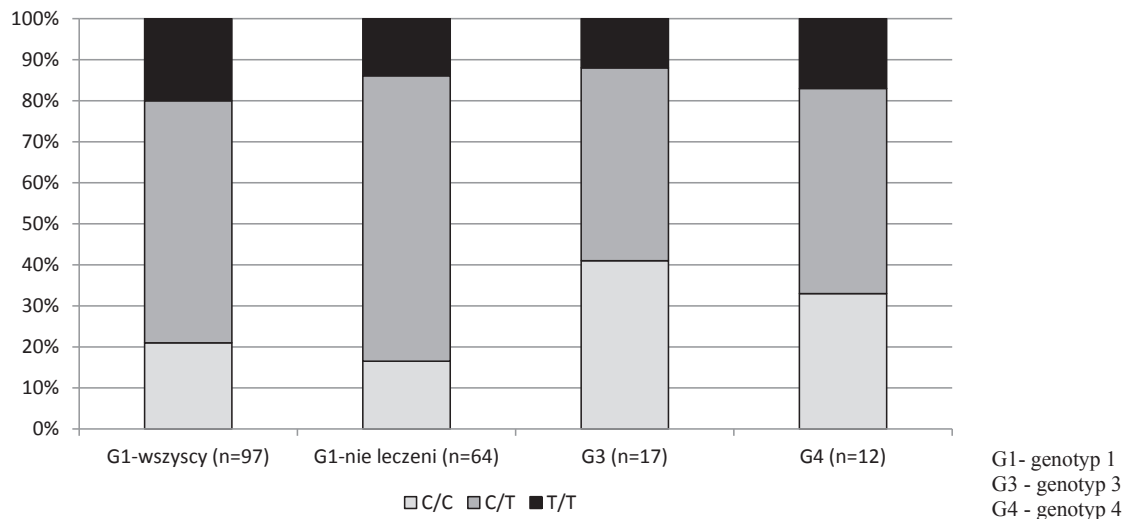
DYSKUSJA

Wyniki naszych badań oceniające częstość występowania poszczególnych genotypów HCV są zbliżone do wyników badań z Chorwacji, Niemiec czy też Francji (3, 4, 5), jednak, w przeciwieństwie do tych krajów interesujące jest, że wśród badanych przez



Ryc.2. Chorzy przewlekle zakażeni HCV badani w zależności od płci na terenie województwa podlaskiego w okresie od 2002 do 2011 roku

Fig.2. Patients with chronic HCV infected examination according to sex in the province of Podlasie in the period from 2002 to 2011



Ryc.3. Polimorfizm rs12979860 wśród badanych 126 chorych zakażonych różnymi genotypami HCV

Fig.3. Rs12979860 polymorphism among the examined 126 patients infected with different HCV genotypes

nas chorych praktycznie nie obserwowaliśmy zakażonych genotypem 2 HCV (tab.I). U żadnego pacjenta w okresie ostatnich 10 lat nie stwierdzono zakażenia genotypem 2 HCV. Natomiast charakterystyczny był wzrost częstości występowania w ostatnich latach odsetka chorych zakażonych genotypem 4. Było to obserwowane również w innych krajach europejskich i związane głównie z parenteralną transmisją tego typu HCV poprzez dożylnie środki odurzające lub tatuaże (6). W naszych, obserwacjach, podobnie jak opisują to inni autorzy, częstość zakażenia HCV była rzadsza u kobiet (7), (tab.I).

Tabela I. Występowanie genotypów HCV w wybranych krajach europejskich

Table I. The occurrence of HCV genotypes in selected European countries

	Liczba badanych	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	Genotyp 4	Inne
Grecja (8)	973	41,9%	7,2%	32,7%	16,2%	1,9% genotyp 5
Rumunia (9)	241	98%	0	0,8%	1,2%	
Chorwacja (3)	1163	58,8%	2,2%	35,6%	3,4%	
Francja (4)	356	59,4%	9,2%	19,9%	9,2%	2% genotyp 5
Słowacja (10)	198	90%	1,7%	6,6%	1,7%	
Czechy (11)	220	79,3%	1,0%	19,7%	0	
Niemcy (5)	10 326	61,7%	34,9%		0	

Według różnych opracowań, częstość występowania genotypu C/C polimorfizmu rs12979860 w populacji kaukaskiej (USA, Austria, Włochy, Hiszpania) wynosi 36-46% (C/T: 40-52%, T/T: 10-17%), a wśród Afro-amerykanów zaledwie 11-19% (CT: 48-61%, TT: 20-35%), co warunkuje gorszą skuteczność terapii w tej populacji. Wstępna, niepublikowana analiza oparta o próbki 117 polskich pacjentów pochodzących

z różnych badań klinicznych wskazywała na występowanie genotypu C/C u 23%, C/T u 58% i T/T u 19%. Analiza ta mogła być obciążona ryzykiem błędu wynikającego z selekcji chorych do leczenia w badaniach klinicznych (pacjenci zazwyczaj w młodym wieku, bez współistniejących ostrych i przewlekłych chorób). Jednak przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań własnych wskazują na niezwykle zbliżony rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu rs12979860, na który nie miała wpływu kwalifikacja chorych do rozpoczęcia terapii. Należy zwrócić uwagę, że wynika z tego, iż częstość występowania genotypu C/C jest w populacji podlaskiej (być może ogólnopolskiej) znacząco niższa od obserwowanej u przedstawicieli rasy kaukaskiej w innych krajach. Niesie to ze sobą konsekwencje w postaci gorszej skuteczności terapii, co można zniwelować przynajmniej częściowo stosując w ramach terapii trójlekowej zarejestrowane w UE, lecz niedostępne w Polsce inhibitory proteazy. Warto zwrócić też uwagę na brak różnic rozkładu częstości występowania genotypów polimorfizmu rs12979860 pomiędzy zakażonymi genotypem 1 HCV wszystkimi chorymi a chorymi wcześniej nieleczonymi, co wskazuje na brak wpływu na wyniki preselekcji wynikającej z nieskuteczności wcześniejszego leczenia.

Badania przeprowadzone wśród kobiet ciężarnych z obecnymi przeciwciałami anti-HCV wykazały obecność HCV-RNA u 61% posiadających genotypy C/C i 82% C/T lub T/T, co wskazuje na częstszą eliminację spontaniczną w populacji chorych z genotypem C/C (12). Potwierdzeniem tego było badanie, które *Thomas i wsp.* (13) przeprowadzili wśród Europejczyków i Afrykańczyków wykazując częstą spontaniczną eliminację HCV związaną z genotypem C/C, szczególnie u chorych z niską wiramię HCV. Z kolei niska wiramia wśród chorych posiadających genotypy C/T i T/T nie

wpływała na spontaniczną eliminację wirusa. Również wśród noworodków obserwowano częstą, spontaniczną eliminację HCV zależną od obecności genotypu C/C (12). Konsekwencją tego jest znacznie rzadsze występowanie genotypu C/C niż C/T wśród przewlekle zakażonych HCV. Z drugiej strony trudno wytłumaczyć stosunkowo rzadkie występowanie alleli T/T, które nie sprzyjają spontanicznej eliminacji zakażenia. Jest to zapewne związane z procesami dziedziczenia i wymaga dalszych badań.

Najwyższa częstość występowania genotypu C/C, jako kluczowego czynnika predykcyjnego uzyskania SVR, obserwowana jest wśród Azjatów (ponad 90%), rzadziej Europejczyków, Amerykanów i Latynosów, a najrzadziej wśród Afro-amerykanów (około 40%), (14). Wyniki badań własnych wydają się być zgodne.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W Polsce północno-wschodniej najczęściej obserwowane są zakażenia genotypem 1 HCV. Na przestrzeni ostatnich 10 lat obserwuje się powolny wzrost częstości występowania zakażeń genotypem 4. U 79% zakażonych genotypem 1 HCV stwierdza się genotypy C/T lub T/T polimorfizmu na rs12979860, będące niekorzystnym czynnikiem prognostycznym terapii. W związku z tym, że odsetek ten jest wyższy od stwierdanego u osób rasy kaukaskiej w innych krajach Europy i USA, pacjenci w Polsce powinni uzyskać jak najszerszy dostęp do terapii trójlekowej, zwiększającej prawdopodobieństwo uzyskania trwałej odpowiedzi wirusologicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A i in. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31 [Suppl 2]: 30-60.
2. Łapiński TW, Pawluczuk P, Flisiak R. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna zakażeń HCV genotypem 4 w rejonie północno-wschodniej Polski. *Przegl Epidemiol* 2009; 4: 501-4.
3. Vince A, Iscić-Bes J, Zidovec Lepej S i in. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia--a 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 2006; [Suppl 2]: 139-43.

4. Cantaloube JF, Laperche S, Gallian P i in. Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J Clin Microbiol* 2006; 6: 2051-6.
5. Hüppe D, Zehnter E, Mauss S i in. Epidemiology of chronic hepatitis C in Germany--an analysis of 10,326 patients in hepatitis centres and outpatient units. *Z Gastroenterol* 2008; 1: 34-44.
6. Roulot D, Bourcier V, Grando V i in. Observational VHC4 Study Group. Epidemiological Characteristics and Response to Peginterferon Plus Ribavirin Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 4. *J Viral Hepat* 2007; 7: 460-7.
7. Juszczyk J. *Hepatitis C Patogeneza i terapia*. Poznań, Wyd Med, Termedia, 2009, 5-123.
8. Karatapanis S, Tsoplou P, Papastergiou V i in. Hepatitis C virus genotyping in Greece: unexpected high prevalence of genotype 5a in a Greek island. *J Med Virol* 2012; 2: 223-8.
9. Sultana C, Oprisan G, Szmal C i in. Molecular epidemiology of hepatitis C virus strains from Romania. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 3: 261-6.
10. Paralicová Z, Kristian P, Schréter I. Epidemiological survey of hepatitis C at the Clinic of Infectology and Travel Medicine in Kosice. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2009; 4: 158-62.
11. Nēmecek V, Strunecký O. Genotypic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) from blood donors in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2009; 2: 63-72.
12. Ruiz-Extremera A, Muñoz-Gámez JA, Salmerón-Ruiz MA i in. I.: Genetic variation in interleukin 28B with respect to vertical transmission of hepatitis C virus and spontaneous clearance in HCV-infected children. *Hepatology* 2011; 53: 1830-8.
13. Thomas DL, Thio CL, Martin MP i in. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.
14. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, i in. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.

Otrzymano: 15.04.2012 r

Zaakceptowano do druku: 30.05.2012 r.

Adres do korespondencji:

dr hab. Tadeusz W. Łapiński
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,
15-540 Białystok, ul. Żurawia 14
e-mail: twlapinski@wp.pl