

Genomska tipizacija izolatov virusa hepatitisa C v Sloveniji Genotyping of hepatitis C virus isolates in Slovenia

Katja Seme¹, Mario Poljak², Branka Čelan-Lucu³, Gorazd Lešničar⁴, Vladimir Brinovec⁵, Mojca Matičič⁶, Jelka Meglič-Volkar⁷, Saša Žužek-Rešek⁸, Srečko Štepec⁹, Zvonko Baklan¹⁰, Dušan Andoljšek¹¹, Majda Benedik-Dolničar¹², Peter Dovč¹³, Srečko Koren¹⁴

Ključne besede
hepatitis C virus
genotip
Slovenija

Key words
hepatitis C virus
genotype
Slovenia

Izvleček. Opredelelitev genotipa virusa hepatitisa C (HCV) je pomembna v raziskovanju epidemiologije okužbe s tem virusom oz. za natančno spremljanje ter razjasnitev načina prenosa in širjenja okužbe. Zaradi spremenljivosti genoma in neenakomerne zemljepisne porazdelitve genotipov HCV je treba pred začetkom kakršnekoli epidemiološke raziskave v vsaki državi preveriti učinkovitost različnih tipizacijskih metod s pilotsko raziskavo in ob tem ugotoviti tudi okvirno prisotnost in delež posameznih genotipov HCV. S primerjalno raziskavo, ki smo jo izvedli na 40 izolatih RNA HCV iz Slovenije, smo primerjali učinkovitost štirih posrednih metod genomske tipizacije in ugotovili, da s posameznimi metodami ni mogoče dokončno opredeliti vseh genotipov oz. podtipov HCV, prisotnih v Sloveniji. Izkazalo se je, da je v našem prostoru najbolj primerna metoda genomske tipizacije reverzni dot-blot s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za 5' nekodirajoči del genoma HCV. Z izbrano strategijo genomske tipizacije smo nato določili genotip/podtip HCV pri 226 slovenskih bolnikih, ki so se okužili s HCV na različne načine oz. so pripadali različnim epidemiološkim skupinam. Razporeditev genotipov HCV se v Sloveniji razlikuje med posameznimi epidemiološkimi skupinami bolnikov. Rezultati raziskave kažejo na povezavo med posameznimi genotipi HCV in določenimi načini prenosa virusa.

Abstract. Genotyping of hepatitis C virus (HCV) isolates is of particular interest for epidemiology. Because of extreme genome variability of HCV genome, each genotyping method should be evaluated in local setting before being introduced as a routine diagnostic procedure or a tool for large-scale epidemiological studies. This comparative study of four most widely used HCV genotyping assays, employed on 40 HCV isolates in Slovenia, showed that none of them was really suitable for genotyping Slovenian HCV isolates. Thanks to its satisfactory sensitivity, specificity and simplicity, the line probe assay was found to be the most appropriate tool for both routine and large-scale epidemiological studies. Using this assay the prevalence of HCV genotypes in Slovenia was studied on 226 individuals infected with HCV. Significant differences in HCV genotype distribution observed between epidemiological groups in Slovenia indicate a close relationship between individual HCV genotypes and certain routes of viral transmission.

¹As. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

²Doc. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

³Branka Čelan-Lucu, dr. med., Zdravstveni dom Ljubljana, Metelkova 9, 1000 Ljubljana.

⁴Prof. dr. Gorazd Lešničar, dr. med., Oddelek za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje.

⁵Doc. dr. Vladimir Brinovec, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Japljeva 2, 1105 Ljubljana.

⁶As. mag. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Japljeva 2, 1105 Ljubljana.

⁷Jelka Meglič-Volkar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Japljeva 2, 1105 Ljubljana.

⁸Saša Žužek-Rešek, dr. med., Oddelek za hemodializo, Splošna bolnišnica Izola, Polje 35, 6310 Izola.

⁹As. Srečko Štepec, dr. med., Gastroenterološka interna klinika, Klinični center, Japljeva 2, 1105 Ljubljana.

¹⁰Zvonko Baklan, dr. med., Oddelek za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

¹¹Doc. dr. Dušan Andoljšek, dr. med., Hematološka interna klinika, Klinični center, Zaloška 2, 1105 Ljubljana.

¹²Prim. Majda Benedik-Dolničar, dr. med., Pediatrska klinika, Klinični center, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana.

¹³Prof. dr. Peter Dovč, dipl. ing. kmet., Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Groblje 3, 1230 Domžale.

¹⁴Prof. dr. Srečko Koren, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

Uvod

Virus hepatitisa C (HCV), majhen RNA-virus, ki ga uvrščamo v samostojen rod družine *Flaviviridae* (1), je najpogostejši povzročitelj parenteralno prenesenega ne-A, ne-B hepatitisa (2). Akutna okužba največkrat poteka brez simptomov, vendar se bolezen v več kot polovici primerov nadaljuje v aktivno kronično vnetje jeter in od tega v približno 20 % primerov v jetrno cirozo (3). Rezultati številnih raziskav kažejo, da je HCV pomemben etiološki dejavnik v razvoju jetrnoceličnega karcinoma (4, 5). Virus se prenaša predvsem s krvjo in krvnimi pripravki. Drugi možni načini prenosa so še perinatalni ter spolni oz. prenos s tesnimi stiki v družini. Okužbi s HCV so najbolj izpostavljeni intravenski uživalci drog, bolniki s hemofilijo, bolniki, ki so večkrat prejeli transfuzijo krvi, in hemodializni bolniki (6).

Na osnovi skladnosti nukleotidnih zaporedij je mogoče različne izolate genoma HCV razvrstiti v več genotipov, med katerimi so nekateri zemljepisno omejeni, drugi pa se pojavljajo na različnih zemljepisnih področjih (7, 8). Pet neodvisnih raziskovalnih skupin je v preteklih štirih letih predlagalo različne razvrstitve in poimenovanja genotipov HCV, ki si jih v zadnjem času prizadevajo poenotiti. Leta 1994 je skupina 46 raziskovalcev objavila predlog enotne klasifikacije izolatov HCV in natančne kriterije za razvrščanje izolatov v genotipe in podtipe (tabela 1) (9).

Omenjeno klasifikacijo je že sprejela večina raziskovalnih skupin, ki se ukvarjajo s HCV. Tako danes poznamo najmanj 6 genotipov, ki jih označujemo z arabskimi številkami, v primeru podtipov pa je številki dodana še mala črka. Kriterij za razvrstitev izolata HCV v nov genotip je najmanj 28–32 % neskladnost njegovega nukleotidnega zaporedja s predstavniki že obstoječih genotipov ter za podtip znotraj genotipa 14–25 % neskladnost s predstavniki že obstoječih podtipov, pri čemer se upoštevajo primerjave nukleotidnih zaporedij področij genoma, ki nosijo zapis za beljakovino virusne ovojnice ter za četrto in peto nestrukturno virusno beljakovino (7, 9).

Tabela 1. Pregled in primerjava petih različnih sistemov razvrščanja genotipov HCV ter predlagano enotno poimenovanje. *nr* – nerazvrščen; *Ch* – Houghton in sod. (20) in *Cha* in sod. (19); *Si* – Chan in sod. (17) in *Simmonds* in sod. (14); *En* – Enomoto in sod. (11); *Ok* – Okamoto in sod. (16) in *Mori* in sod. (18); *Ts* – Tsukiyama-Kohara in sod. (21).

Izolat HCV	Viri	Predlagano ime	Ch	Si	En	Ok	Ts
HCV-1, H	10, 11	1a	I	1a	K-PT	I	nr
HCV-J, HCV-BK	12, 13	1b	II	1b	K-I	II	I
EG-28	14	1c	nr	nr	nr	nr	nr
HC-J6	15	2a	III	2a	K-2a	III	II
HC-J8	16	2b	III	2b	K-2b	IV	II
TO983, ARG6	1	2c	III	nr	nr	nr	nr
E-b1, Ta	17, 18	3a	IV	3	nr	V	nr
Tb	18	3b	IV	nr	nr	VI	nr
EG-16, 29, 33	13	4a	nr	4	nr	nr	nr
SA1-11, SA3, 4	19	5a	V	nr	nr	nr	nr
HK1-4, HK2	14, 19	6a	nr	nr	nr	nr	nr

Primerjave nukleotidnih zaporedij gena različnih izolatov HCV kažejo, da so v virusnem genomu področja z različno stopnjo spremenljivosti. Najbolj spremenljiva so področja, ki kodirajo strukturne beljakovine virusne ovojnice (E1 in E2), najbolj stabilno področje gena HCV pa je 5' nekodirajoče področje, veliko približno 340 baznih parov (bp), ki ima pomembno vlogo v uravnavanju podvojevanja in prevajanja virusne RNA (7). Nedavne raziskave so pokazale, da je razlike med posameznimi genotipi in podtipi mogoče ugotoviti z analizo nukleotidnega zaporedja znotraj vsakega področja gena HCV, ne glede na stopnjo spremenljivosti določenega področja (22).

Metode genomske tipizacije – genotipizacijske metode

Ker poznamo samo genom virusa, je mogoče v epidemioloških raziskavah posamezne virusne izolate opredeliti le z metodami molekularne virologije. Metodologija molekularne opredelitve tipov HCV ali genotipizacije ni niti enotna niti standardizirana. Kot »zlati« genotipizacijski standard je zaenkrat sprejeta le neposredna metoda določanja nukleotidnega zaporedja ali sekvenčna analiza (7, 9, 22). Rezultati nedavnih raziskav so pokazali, da je za razvrščanje izolatov HCV najprimernejše določanje nukleotidnega zaporedja področja, ki nosi zapis za peto nestrukturno virusno beljakovino (NS5), ali področja, ki nosi zapis za prvo beljakovino virusne ovojnice (E1) (22, 23). S primerjavo nukleotidnih zaporedij enega ali drugega področja je namreč mogoče zelo natančno razlikovati vse do sedaj znane tipe in podtipe HCV. Poleg tega so za večino izolatov HCV v genskih bankah zbrana ravno nukleotidna zaporedja teh dveh odsekov gena HCV in je tako razvrščanje novih izolatov najlažje, če poznamo nukleotidno zaporedje področij NS5 ali E1 (22). V zadnjem času se nukleotidno zaporedje določenega izolata največkrat določa po predhodnem pomnoževanju izbranega odseka gena HCV z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) tako, da bi se izognili zahtevnemu in dolgotrajnemu molekularnemu kloniranju (23, 24). Ker je za področje NS5 ugotovljena več kot 85 % skladnost nukleotidnih zaporedij različnih izolatov HCV, za področje E1 pa samo več kot 70 %, je verjetnost uspešnega pomnoževanja odseka NS5 različnih virusnih izolatov večja kot za pomnoževanje področja E1 (25). Na žalost je določanje nukleotidnih zaporedij izolatov virusnega gena tehnično zelo zahtevna in draga metoda in tako praktično neuporabna za analizo večjega števila vzorcev. Zato večina raziskovalcev za molekularno opredelitev tipov HCV uporablja več različnih posrednih molekularnih metod (26–34).

Večina posrednih genotipizacijskih metod temelji na pomnoževanju določenega odseka virusnega gena s PCR (26–30). Takšna genotipizacija HCV je mogoča že s samim pomnoževanjem, če se za ta namen uporabljajo tipsko specifični začetni oligonukleotidi, ki selektivno pomnožujejo različne genotipe. Tipsko specifični začetni oligonukleotidi morajo biti izbrani tako, da so komplementarni samo tistim delom izbranega področja virusnega gena, kjer so nukleotidna zaporedja značilna samo za določen genotip oz. podtip HCV (35). Vendar je večina posrednih genotipizacijskih metod zasnovana tako, da pomnoževanje določenega področja gena HCV poteka z začetnimi oligonukleotidi, ki so komplementarni najbolj ohranjenim delom izbranega področja, tako da z njimi lahko pomnožimo večino izolatov oz. različnih genotipov HCV. Področje med

obema začetnima oligonukleotidoma pa mora vsebovati nukleotidna zaporedja, ki se razlikujejo med posameznimi virusnimi tipi oz. podtipi in jih po končanem pomnoževanju največkrat odkrivamo z analizo pridelkov PCR s tipsko specifičnimi DNA-lovkami ali z metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*) po cepitvi pridelka PCR z restrikcijskimi endonukleazami (31–34).

Tipsko specifične DNA-lovke morajo biti izbrane tako, da v procesu hibridizacije najdejo skladno zaporedje pomnoženega dela genoma, ki je značilno samo za posamezni tip oz. podtip HCV. Za tipizacijo HCV so neradioaktivno označene tipsko specifične DNA-lovke največkrat vezane na nitrocelulozne membrane (t. i. reverzni dot-blot) ali na dno vdolbinic mikrotitracijske ploščice (t. i. encimsko oligonukleotidni test), kamor dodajamo pridelke PCR, ki jih želimo tipizirati (35).

Tipizacijo z metodo RFLP izvajamo tako, da pridelek PCR izpostavimo za določen čas delovanju ustreznih restrikcijskih endonukleaz – encimov, ki režejo dvojnovojačno DNA na mestu točno določenega nukleotidnega zaporedja. Restrikcijske endonukleaze razrežejo pridelke PCR v odvisnosti od nukleotidnega zaporedja pridelka na določeno število različno velikih delcev, kar imenujemo vzorec razgradnje. Za tipizacijo HCV morajo biti restrikcijske endonukleaze izbrane tako, da je za vsak genotip oz. podtip značilen drugačen vzorec razgradnje (31, 32, 35).

Ker so razlike v nukleotidnem zaporedju med posameznimi genotipi HCV prisotne znotraj vsakega področja genoma HCV, je tudi genotipizacija teoretično mogoča na vseh področjih virusnega genoma (22). Med posrednimi genotipizacijskimi metodami so se najbolj uveljavile tiste, ki temeljijo na razlikah v nukleotidnem zaporedju posameznih genotipov na področju 5' nekodirajočega dela genoma HCV, in na področju, ki kodira nukleokapsidno beljakovino sredice virusnega genoma, medtem ko so manj uveljavljene tiste genotipizacijske metode, ki temeljijo na razlikah v nukleotidnih zaporedjih tistih področij genoma, ki kodirajo nestrukturne virusne beljakovine (NS5, NS4, NS3). Genotipizacija na najbolj ohranjenem 5' nekodirajočem delu genoma HCV je sicer najbolj občutljiva, vendar na žalost slabše specifična (7). Razlike v nukleotidnem zaporedju na tem področju virusnega genoma so namreč med različnimi izolati HCV maloštevilne. Zato je mogoče s posrednimi genotipizacijskimi metodami ločevati le glavne genotipe, ne pa tudi vseh podtipov HCV. Nasprotno je genotipizacija na manj ohranjenih področjih virusnega genoma (področje, ki kodira kapsidno beljakovino, in področja, ki kodirajo nestrukturne virusne beljakovine) manj občutljiva, saj je zaradi številnih razlik v nukleotidnih zaporedjih med posameznimi izolati HCV težko izbrati začetne oligonukleotide, s katerimi bi lahko pomnožili vse virusne izolate. Specifičnost genotipizacijskih metod na teh področjih genoma HCV je zaradi omenjenih razlik med posameznimi izolati virusnega genoma lahko zelo visoka (7). Pri vrednotenju različnih genotipizacijskih metod je treba poleg občutljivosti in specifičnosti upoštevati tudi zahtevnost postopka, trajanje izvedbe in natančnost vrednotenja rezultatov, ki jo določena metoda oz. protokol omogoča. Pregled najpomembnejših genotipizacijskih metod HCV, ki temeljijo na PCR, pregled področij genoma HCV, na katerih delujejo posamezne metode, in genotipov, ki jih s posameznimi metodami lahko določimo, je podan v tabeli 2 (11, 26–34, 36, 37).

Tabela 2. Pregled najpomembnejših genotipizacijskih metod HCV, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR), pregled področij genoma HCV, na katerih delujejo posamezne metode, in genotipov, ki jih s posameznimi metodami lahko določimo. C – področje genoma, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice; 5'NCR – 5' nekodirajoče področje; NS5 – področje genoma HCV, ki nosi zapis za peto nestrukturno virusno beljakovino; RFLP – metoda določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov.

Metoda	Področje genoma	Genotipi	Viri
PCR s tipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	C	1a, 1b, 2a, 2b, 3a	26–28
	NS5	1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b	29, 30
RFLP	5'NCR	1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6	31
	5'NCR	1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5, 6	32
	NS5	1, 2a, 2b	33
Tipsko specifične DNA-lovke	5'NCR	1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3, 4, 5, 6	34
	C	1a, 1b, 2, 2a, 2b, 3a	36
	5'NCR + C	1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1e, 2a, 2b, 2c, 3a, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 9a	37
	NS5	1a, 1b, 2a, 2b	11

Določenih genotipov oz. podtipov HCV, zlasti tistih, ki so poznani šele kratak čas in/ali so bolj zemljepisno omejeni, ni mogoče opredeliti z vsemi do sedaj razvitimi genotipizacijskimi metodami, ampak le s posameznimi metodami oz. le z določanjem nukleotidnega zaporedja osamljenega virusnega genoma. Zaradi spremenljivosti genoma in neenakomerne zemljepisne porazdelitve genotipov HCV po mnenju večine avtorjev ni mogoče uporabljati enotne genotipizacijske metode v vseh deželah (7, 38, 39). Zato je treba pred začetkom kakršnekoli epidemiološke raziskave v vsaki državi s pilotsko raziskavo preveriti učinkovitost različnih tipizacijskih metod in ugotoviti prisotnost in delež posameznih genotipov HCV ter šele nato nadaljevati z načrtovanim delom (7). Z uporabo različnih tipizacijskih metod je dosežena večja zanesljivost opredeljevanja genotipov HCV in omogočeno odkrivanje morebitnega pojava rekombinacije med različnimi genotipi (7).

Zemljepisna razporeditev genotipov HCV

Večina raziskovalcev ugotavlja genotipsko različnost izolatov HCV v neki državi najprej v skupini bolnikov s kroničnim hepatitisom C. Domnevajo namreč, da je bila večina bolnikov s kroničnim hepatitisom C okužena v preteklosti z enkratnimi transfuzijami ali z drugo enkratno parenteralno izpostavitvijo okuženi krvi in naj bi pri teh bolnikih šlo za domnevno sporadično in ne epidemično širjenje okužbe (7, 8, 40, 41).

Dosedanje raziskave kažejo, da se pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C in krvodajalcih v zahodni Evropi in ZDA povsod pojavljajo genotipi 1a, 1b, 2a, 2b in 3a, razlike so le v deležu okužb s posameznim tipom. V ZDA je najbolj razširjen tip 1a. V vzhodni in južni Evropi prevladuje okužba s tipom 1b, medtem ko je na zahodu in severu bolj razširjen tip 1a. Na srednjem vzhodu, v Egiptu in centralni Afriki prevladuje genotip 4, v južni Afriki pa genotip 5. Na Japonskem, v Tajvanu in delu Kitajske prevladujejo genotipi

1b, 2a in 2b. Z genotipom 1a so na Japonskem okuženi le bolniki s hemofilijo, ki so prejeli krvne pripravke iz ZDA. Genotip 3 prevladuje na Tajskem, medtem ko je drugje na Daljnem vzhodu izjemno redek. Genotip 6 so odkrili le v Hong Kongu, genotipe 7–9 pa na Tajskem in v Vietnamu (7, 8, 42, 43).

Pomen genotipizacije HCV

Določanje genotipa HCV je nepogrešljivo v epidemioloških raziskavah okužbe s tem virusom, poleg tega ima pomembno vlogo pri raziskovanju virulentnosti HCV, ugotavljanju vzrokov različnega uspeha zdravljenja okužbe s protivirusnimi sredstvi ter pri iskanju vzrokov razlik v seroloških profilih okuženih posameznikov, določenih z imunoblot testi (7, 8, 44–46).

Opredelitev genotipa HCV je pomembna za natančno spremljanje ter razjasnitev načina prenosa in širjenja okužbe s tem virusom, še zlasti v določenih skupinah in pri osebah, okuženih z genotipi, za katere je značilna zemljepisna omejenost (7, 8, 46). Natančna genomska tipizacija izolatov HCV pri vseh okuženih je nujna za dokaz vertikalnega in spolnega prenosa ali prenosa znotraj družine. Prav tako je genotipizacija HCV nepogrešljiva pri iskanju vzrokov epidemij okužbe (npr. v skupinah z velikim tveganjem okužbe, kot so bolniki na hemodializi, ali pri bolnikih, ki so se okužili z okuženimi imunoglobulini) (47, 48). Določitev genotipa je lahko pomembna tudi pri ugotavljanju načina okužbe s HCV, saj so mnoge raziskovalne skupine v svojih epidemioloških raziskavah našle povezavo med genotipom HCV in načinom okužbe (transfuzija krvi ali krvnih pripravkov, intravensko uživanje drog) (41, 49–51).

Številne raziskovalne skupine si v zadnjem času prizadevajo odgovoriti na vprašanje, ali sta odziv bolnikov, okuženih s HCV, na zdravljenje z interferonom in potek bolezni odvisna od genotipa HCV (17, 52, 53). Rezultati večine dosedanjih raziskav namreč kažejo, da je okužba z genotipom 1b povezana s težjo klinično sliko kroničnega hepatitisa in slabšim odgovorom na protivirusno zdravljenje. Zato naj bi bila opredelitev genotipa HCV v kombinaciji z določanjem količine virusnega genoma v serumu bolnikov s kroničnim hepatitisom C tudi ena ključnih preiskav pred odločitvijo o zdravljenju z interferonom (7, 17, 53). Nekateri raziskovalci te domneve niso potrdili (52, 54). Dobljene razlike utemeljujejo predvsem s posebnostmi posameznih populacij (54). Mnogi raziskovalci so ugotovili, da ima večina bolnikov, okuženih z genotipom 1 (podtip 1a ali 1b), hudo okvaro jeter, in da je okužba s podtipom 1b povezana z agresivnim potekom bolezni, medtem ko je med bolniki, okuženimi z drugimi genotipi, le manjši del takšnih s hujšo prizadetostjo jeter. Prav tako so ugotovili, da je pri bolnikih z dekompenzirano jetrno boleznijo, ki zahteva presaditev, pogostejša okužba z genotipom 1b kot z drugimi genotipi HCV (44). Okužba s tem genotipom je pogostejša tudi pri jetrnoceličnem karcinomu, povezanem s HCV (44).

Pri ugotavljanju vzrokov nezadostne učinkovitosti določenih seroloških testov, ki so na voljo v posredni diagnostiki okužbe s HCV, so nedavno ugotovili razlike v reaktivnosti protiteles oseb, okuženih z različnimi genotipi HCV, z rekombinantnimi virusnimi beljakovinami, vključenimi v diagnostične teste. Vse rekombinantne beljakovine v diagnostičnih

seroloških kompletih so namreč pripravljene na osnovi poznavanja nukleotidnega zaporedja prvega izolata HCV, ki ga danes uvrščamo v genotip 1a. Najbolj očitna razlika je znatno manjša reaktivnost protiteles bolnikov, okuženih z genotipoma 2b in 3a, z beljakovinama 5–1–1 in C100–3 v primerjavi z bolniki, okuženimi z genotipoma 1a in 1b. Ker je prva generacija seroloških diagnostičnih testov za ugotavljanje okužbe s HCV temeljila ravno na teh dveh rekombinantnih virusnih beljakovinah, rezultati omenjenih raziskav pomenijo tudi novo možno razlago velikega števila lažnonegativnih rezultatov prve generacije seroloških testov (44, 46).

Genotipi HCV v Sloveniji

V Sloveniji je bila v številnih raziskavah, opravljenih v preteklih šestih letih, ugotovljena prekuženost s HCV in natančno opredeljene skupine bolnikov in oseb z velikim tveganjem okužbe s tem virusom, medtem ko ni bilo ničesar znanega o zastopanosti in razporeditvi genotipov HCV (55–66).

V prvem delu raziskave smo tako najprej primerjali uporabnost in učinkovitost štirih različnih posrednih metod za genotipizacijo HCV. S tem smo želeli izbrati metodo oz. kombinacijo metod, ki bi bila najbolj primerna za raziskave genomske raznolikosti slovenskih izolatov HCV, in ugotoviti tudi okvirno prisotnost in delež posameznih genotipov HCV v Sloveniji. Primerjalno analizo smo izvedli na 40 serumskih vzorcih 22 bolnikov s kroničnim hepatitisom C, 10 intravenskih uživalcev drog in 8 bolnikov na hemodializi, izbranih iz zbirke serumov Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. V vseh serumskih vzorcih je bila predhodno ugotovljena prisotnost RNA HCV. Uporabili smo naslednje štiri tipizacijske metode:

- reverzni dot-blot s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za 5' nekodirajoči del genoma HCV,
- encimsko razgradnjo pomnoženega odseka 5' nekodirajočega dela genoma HCV,
- PCR s tipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, in
- encimsko oligonukleotidni test s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice (67).

V primeru razlik v rezultatih različnih metod smo kot referenčno metodo za opredelitev genotipa oz. podtipa HCV izbrali določanje nukleotidnega zaporedja 222 bp velikega odseka področja NS5 genoma HCV (67, 68, 69).

Z obema genotipizacijskima metodama, ki sta temeljili na PCR in ugotavljanju za genotipe in podtipe HCV značilnih razlik v nukleotidnem zaporedju najbolj ohranjenega 5' nekodirajočega dela genoma HCV, smo uspeli pomnožiti ustrezen del virusnega genoma iz vseh serumskih vzorcev, vključenih v raziskavo, medtem ko smo z metodama, ki sta delovali na bolj spremenljivem področju genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, uspeli pomnožiti ustrezen del RNA HCV le iz 95 % serumskih vzorcev, vključenih v raziskavo. V večini raziskav, v katerih so primerjali posredne genotipizacijske metode na področju 5' nekodirajočega dela genoma HCV, in tiste na področju genoma, ki kodira zapis za beljakovino virusne sredice, so ugotovili 5–10 % manjšo občutljivost slednjih (37, 70–72).

Z našo raziskavo smo ugotovili, da je med vsemi štirimi posrednimi metodami za genotipizacijo slovenskih izolatov RNA HCV najmanj uporabna in najmanj zanesljiva najstarejša metoda – genotipizacija s tipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice. To genotipizacijsko metodo so razvili na Japonskem Okamoto in sod. leta 1992, ko so bila poznana nukleotidna zaporedja samo 44 izolatov RNA HCV (26). Z našimi rezultati se pridružujemo večini evropskih raziskovalcev, ki so pri svojem delu s tipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ugotovili, da so le-ti neprimerni za genotipizacijo evropskih izolatov RNA HCV, zato ker je različnost evropskih izolatov znotraj posameznih genotipov HCV večja v primerjavi z japonskimi izolati, na osnovi katerih so bili izbrani tipsko specifični začetni oligonukleotidi za genotipizacijo HCV (72, 73).

Rezultati genotipizacije z encimsko oligonukleotidnim testom s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, so bili pri opredelitvah genotipov HCV povsem skladni z rezultati obeh genotipizacijskih metod s področja 5' nekodirajočega dela genoma HCV. S tipsko specifičnimi DNA-lovkami za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, smo pri šestih izolatih RNA HCV genotipa 2 v dveh primerih opredelili podtip 2b, medtem ko smo v štirih primerih določili le genotip 2, ni pa nam uspelo opredeliti podtipa. Po določanju nukleotidnega zaporedja 222 bp velikega odseka področja NS5 genoma HCV teh štirih izolatov genotipa 2 smo ugotovili, da pripadajo podtipu 2c, ki ga z DNA-lovkami, vključenimi v uporabljeno genotipizacijsko metodo, ne moremo prepoznati. Vse izolate RNA HCV genotipov 1 in 3 smo z encimsko oligonukleotidnim testom s tipsko specifičnimi DNA-lovkami opredelili enako kot z genotipizacijo na področju 5' nekodirajočega dela genoma HCV oz. enako kot z določanjem nukleotidnega zaporedja 222 bp velikega odseka področja genoma HCV, ki nosi zapis za NS5. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da je genotipizacija z encimsko oligonukleotidnim testom s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za področje genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, med vsemi posrednimi genotipizacijskimi metodami, ki smo jih v naši raziskavi primerjali, najbolj specifična za opredeljevanje podtipov 1a in 1b. Zaradi velikega deleža podtipa 2c med slovenskimi izolati genotipa HCV 2 omenjena metoda žal ne omogoča dokončne opredelitve podtipa pri vseh izolatih genotipa 2. Glede na naše izkušnje in rezultate lahko trdimo, da je pomembna prednost te metode pred ostalimi tremi posrednimi genotipizacijskimi metodami v slovenskem prostoru v tem, da omogoča specifično ločevanje podtipov 2a in 2b od preostalih podtipov genotipa HCV 2. Pri vseh slovenskih izolatih podtipa 2c smo z encimsko oligonukleotidnim testom jasno opredelili genotip 2 in izključili podtipa 2a in 2b, medtem ko smo z obema posrednima genotipizacijskima metodama na 5' nekodirajočem delu genoma napačno opredelili podtip, s tipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pa nismo uspeli določiti niti genotipa teh izolatov (69).

Z obema genotipizacijskima metodama na 5' nekodirajočem delu genoma HCV smo skladno opredelili genotipe vseh izolatov RNA HCV. Z encimsko razgradnjo s PCR pomnoženega odseka 5' nekodirajočega dela genoma HCV smo pri vseh izolatih RNA HCV uspeli določiti tudi podtip, medtem ko smo z reverznim dot-blotom s tipsko specifičnimi

DNA-lovkami pri treh izolatih opredelili samo genotip 1, nismo pa mogli razlikovati med podtipoma HCV 1a in 1b (74). Pri vseh treh izolatih smo s preostalimi genotipizacijskimi metodami uspeli jasno opredeliti tudi podtip genotipa 1. O podobnih težavah, ki se pojavljajo pri opredeljevanju podtipa manjšega dela izolatov genotipa 1, poročajo tudi drugi avtorji, ki so pri svojem delu uporabljali reverzni dot-blot s tipsko specifičnimi DNA-lovkami (37, 70–73, 75). Večina takšne rezultate razlaga s premajhnimi razlikami v nukleotidnem zaporedju 5' nekodirajočega dela genoma HCV med podtipoma 1a in 1b.

Omeniti moramo še dva izolata RNA HCV, ki smo ju z obema genotipizacijskima metodama na področju genoma HCV, ki nosi zapis za beljakovino virusne sredice, opredelili kot podtip 1b, z genotipizacijo na 5' nekodirajočem delu virusnega genoma pa kot podtip 1a. Z določanjem nukleotidnega zaporedja 222 bp velikega odseka področja genoma HCV, ki nosi zapis za NS5, smo v obeh primerih potrdili podtip 1b. Z določanjem nukleotidnega zaporedja 5' nekodirajočega dela virusnega genoma smo ugotovili, da pri obeh omenjenih slovenskih izolatih RNA HCV verjetno zaradi spontane mutacije na mestu –99 5' nekodirajočega dela genoma HCV ni bilo gvanina, ki je na tem mestu značilen za podtip 1b, ampak adenin, ki je značilen za podtip 1a in ga prepozna za ta podtip značilna DNA-lovka oz. restrikcijski encim. Kleter in sod. (72) so takšne spontane mutacije predhodno dokazali pri dveh, Zeuzem in sod. (73) pa pri petih evropskih izolatih virusnega genoma podtipa 1b.

Z genotipizacijo na 5' nekodirajočem delu genoma HCV smo dva slovenska izolata RNA HCV podtipa 2c napačno opredelili kot podtip 2b. Z določanjem nukleotidnega zaporedja tega dela virusnega genoma smo pri obeh izolatih ugotovili mutacijo na mestu –161, in sicer je bil namesto gvanina, ki je značilen za podtipa 2a in 2c, na tem položaju adenin, ki je značilen za podtip 2b. Gvanin na mestu –161 prepoznata DNA-lovka, značilna za podtipa 2a in 2c, in restrikcijska endonukleaza *ScrF I*, ki v metodi RFLP ločuje podtipa 2a in 2b. Takšne napačne opredelitve podtipa 2c kot podtip 2b zaradi mutacije na 5' nekodirajočem delu genoma HCV doslej nismo zasledili v dostopni literaturi. Naša raziskava je nedvomno dokazala, da gvanina oz. adenina na mestu –161 5' nekodirajočega dela genoma HCV vsekakor ne moremo več smatrati kot podtipsko specifično zaporedje, ki omogoča ločevanje podtipa 2a/2c od podtipa 2b.

Glede na rezultate opravljene primerjave učinkovitosti štirih posrednih genotipizacijskih metod in izkušnje, ki smo jih pri tem delu pridobili, ter glede na metode, s katerimi v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani rutinsko dokazujemo prisotnost RNA HCV v serumskih vzorcih, smo se odločili za uporabo reverznega dot-blot-a s tipsko specifičnimi DNA-lovkami za rutinsko določanje genotipov HCV. Ker je bila specifičnost genotipizacije slovenskih izolatov genotipa 1 in 3 z reverznim dot-blotom zelo visoka in nekoliko slabša za izolate genotipa 2, smo se v nadaljnjih epidemioloških raziskavah prav tako odločili za genotipizacijo z reverznim dot-blotom, saj smo v opravljeni pilotski raziskavi ugotovili, da v Sloveniji prevladuje okužba z genotipom HCV 1 in da sledita v približno enaki meri okužbi z genotipoma 2 in 3. Na osnovi rezultatov primerjave posrednih genotipizacijskih metod smo se odločili vse izolate, ki jih bomo z reverznim dot-blotom opredelili kot genotip 2, dodatno tipizirati še z encimsko oligonukleotidnim testom. S tem dodatnim

testom je treba tipizirati tudi vse izolate RNA HCV, pri katerih z reverznim dot-blotom ni mogoče jasno razlikovati podtipa genotipa 1.

Genotipi HCV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom C

V nadaljevanju raziskave smo želeli najprej opredeliti splošno razporeditev genotipov HCV v Sloveniji, torej pri bolnikih, ki ne pripadajo nobeni od skupin z velikim tveganjem okužbe s tem virusom. Genotipsko spremenljivost slovenskih izolatov HCV smo ugotavljali v skupini 86 bolnikov s kroničnim hepatitisom C, ki smo jih obravnavali v specialističnih ambulantah Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Kliničnega centra v Ljubljani, Oddelkov za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Celje, Splošne bolnišnice Maribor in Gastroenterološke interne klinike Kliničnega centra v Ljubljani. Med njimi je bilo 58 moških in 28 žensk, starih od 12 do 79 let, povprečne starosti 40,1 let (67).

Domnevni način okužbe je bil znan za 31 bolnikov. Med njimi se jih je 21 okužilo s transfuzijo okužene krvi, dva s spolnim stikom s HCV-pozitivno osebo in en s tetoviranjem. Pet zdravstvenih delavcev naj bi se okužilo z vbodom z okuženo iglo. Za preostalih 57 bolnikov načina okužbe nismo poznali, nihče med njimi ni pripadal kateri od skupin z velikim tveganjem okužbe s HCV.

Razporeditev genotipov HCV, ki smo jo ugotovili pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom C, je bila podobna razporeditvi v sosednjih državah: Italiji, Avstriji in na Hrvaškem (76, 77) ter v večini zahodnoevropskih držav, zlasti v Franciji in Nemčiji (41, 49). Prevladovala je okužba s podtipom 1b (63,9%), sledili sta okužba s podtipom 1a (22,1%) in genotipom 3 (10,5%), in nazadnje okužba z genotipom 2 (2,3%). Razporeditev genotipov HCV pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C je drugačna v skandinavskih državah (40, 78) in v Španiji (50, 79). V teh državah je namreč približno 45% bolnikov s kroničnim hepatitisom C okuženo s podtipom 1a, sledita pa v približno enakem odstotku (23–29%) okužba s podtipom 1b in genotipom 3. Razporeditev genotipov HCV pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C v Sloveniji se po pričakovanju razlikuje od razporeditve v drugih delih sveta z izjemo Evrope (8, 31, 80).

Z določanjem genotipa/podtipa HCV pri 17 naključno izbranih bolnikih s kroničnim hepatitisom C v serumskih vzorcih, ki smo jih jemali trikrat zapored in v različnih časovnih presledkih, smo dokazali, da se kljub veliki spremenljivosti genoma HCV in številnim točkastim mutacijam, ki povzročajo nastajanje več različic virusnega seva, s katerim se je okužil posamezni bolnik (81), genotip/podtip HCV pri kronično okuženih slovenskih bolnikih v obdobju dveh let ne spremeni. Podobne rezultate so opisali tudi Kurosaki in sod. v do sedaj edini tovrstni raziskavi, opravljeni na sedmih japonskih bolnikih (81). V omejenih raziskavi so dokazali, da je kljub hitremu spreminjanju nekaterih področij virusnega genoma, osnovni genotip/podtip HCV pri vseh sedmih bolnikih ostal nespremenjen v opazovanem obdobju enega leta.

Način okužbe s HCV je bil znan le pri 36% naših bolnikov s kroničnim hepatitisom C, kar je bistveno manj kot poroča večina evropskih avtorjev. Med bolniki z znanim načinom okužbe je prevladovala okužba s transfuzijo krvi (72,4%), sledila pa je okužba zdravstvenih

delavcev z vbodom z okuženo iglo (17,2%). Zanimivo je, da smo pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom C, ki so bili okuženi s transfuzijo krvi, ugotovili le okužbo z genotipom HCV 1, s tem da je močno prevladovala okužba s podtipom 1b (81%), medtem ko smo pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C in neznanim načinom okužbe poleg podtipov 1b (54,4%) in 1a (24,6%) dokazali tudi okužbo z genotipoma HCV 2 in 3. Odsotnost genotipa 3 pri bolnikih, okuženih s transfuzijo krvi, lahko razložimo z dejstvom, da med slovenskimi krvodajalci zaradi prostovoljnega in neplačanega krvodajalstva ni intravenskih uživalcev drog, ki bi že pred začetkom obveznega testiranja vseh krvodajalcev na prisotnost anti-HCV protiteles leta 1993 lahko darovali s HCV genotipa 3 okuženo kri. Večina raziskovalcev okužbo z genotipom 3 namreč povezuje z intravenskim uživanjem drog (41, 78, 82) in tudi v Sloveniji smo ugotovili, da med intravenskimi uživalci drog prevladuje okužba s tem genotipom (67, 83).

Domnevamo, da je večina slovenskih bolnikov, pri katerih način okužbe s HCV ni bil znan, najverjetneje v preteklosti prejela transfuzijo krvi oz. krvne pripravke pri raznih nezahtevniških kirurških posegih, porodu ali prezgodnjem rojstvu. Mnogi bolniki so na to pozabili, ali za transfuzijo krvi ob posegih niso niti vedeli. Med možnimi vzroki okužbe s HCV pri bolnikih z neznanim načinom okužbe nikakor ne smemo pozabiti na okužbo s humanimi imunoglobulini. Večina bolnikov pozabi ali ne ve, da je bila ob kakšnem bolezenskem stanju zdravljena s temi krvnimi pripravki. Iz literature je namreč znanih nekaj podrobno opisanih epidemij hepatitisa C, ki so bile povzročene z okuženimi humanimi imunoglobulini (48, 84, 85). Kot ostale možne vzroke okužbe s HCV napogosteje omenjajo še zobozdravstvene posege, akupunkturo, tetoviranje, jemanje tkivnih vzorcev in endoskopije (41).

V večini do sedaj opravljenih raziskav so iskali morebitno povezavo med okužbo z različnimi genotipi HCV ter spolom in starostjo bolnikov. Tako kot večina raziskovalcev (40, 41, 80) tudi mi nismo našli nobene povezave med okužbo z določenim genotipom HCV in spolom bolnikov. Ugotovili smo, da so slovenski bolniki s kroničnim hepatitisom C, ki so okuženi z genotipom 3, v povprečju nekoliko mlajši kot bolniki, okuženi z ostalimi genotipi HCV, vendar razlika ni bila statistično značilna. V drugih evropskih državah so ugotovili, da so bolniki, okuženi z genotipom HCV 3, statistično pomembno mlajši kot bolniki, okuženi z ostalimi genotipi HCV. Ugotovljene razlike utemeljujejo s tem, da je genotip HCV 3 evolucijsko mlajši in da je bil kasneje vnesen v evropsko populacijo kot genotipa 1 in 2. V Evropo naj bi genotip HCV 3 prinesli na začetku sedemdesetih let evropski intravenski uživalci drog, ki so takrat množično potovali v države srednje Azije, Indijo, Nepal in Pakistan, kjer je ta genotip HCV endemičen (41, 76, 80, 82).

Ko smo ugotavljali možno povezavo okužbe z določenim genotipom HCV in težjim potekom kronične okužbe s tem virusom, smo pri vseh bolnikih s kroničnim hepatitisom C, ki so bili vključeni v raziskavo, določili količino RNA HCV v serumu. Ugotovili smo, da so imeli samo bolniki, okuženi z genotipom 3, v povprečju v serumu manjše količine virusnega genoma kot bolniki, okuženi z drugimi genotipi HCV. Večina drugih avtorjev, ki so opravili podobne raziskave na populacijah njihovih bolnikov, ni ugotovila razlik v številu kopij virusnega genoma v serumu pri bolnikih, okuženih z različnimi genotipi HCV (80, 86, 87). V nasprotju z rezultati teh raziskav so Lau in sodelavci (80) ugotovili, da

imajo v ZDA bolniki s kroničnim hepatitisom C, ki so okuženi z genotipom 4, v serumu manjše količine virusnega genoma kot bolniki, okuženi z drugimi genotipi HCV. Razlika, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi, bi morda lahko pojasnili z dejstvom, da smo količino RNA HCV v serumskih vzorcih določali s standardiziranim testom Amplicor HCV Monitor, ki naj bi bil glede na rezultate nedavne multicentrične evropske primerjalne raziskave najmanj učinkovit pri pomnoževanju RNA HCV genotipa 3 (88). Manjše količine RNA HCV, ki smo jih ugotovili v serumu bolnikov, okuženih z genotipom 3, v primerjavi z bolniki okuženimi z drugimi genotipi, bi lahko bile zato samo rezultat manj učinkovitega pomnoževanja genoma tega genotipa HCV.

Genotipi HCV pri slovenskih hemodializnih bolnikih

Hemodializni bolniki pripadajo skupini z velikim tveganjem okužbe s HCV. Glavni dejavnik tveganja okužbe s HCV v tej skupini bolnikov so najprej predstavljale pogoste transfuzije krvi, vendar se v zadnjem času vse pogosteje omenja tudi možnost prenosa okužbe med bolniki v posamezni hemodializni enoti (89–92).

V tujih raziskavah so ugotovili, da je razporeditev genotipov HCV pri hemodializnih bolnikih največkrat podobna razporeditvi pri krvodajalcih, okuženih s HCV (93). Na osnovi teh rezultatov so domnevali, da se je večina hemodializnih bolnikov okužila z enkratno izpostavitvijo okuženi krvi oz. da je šlo pri njih za sporadične okužbe, podobno kot pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C, ki ne pripadajo nobeni od skupin z velikim tveganjem okužbe. V primerih, ko so v določenih hemodializnih enotah ugotovili pojav redkih genotipov HCV ali takšno razporeditev genotipov, ki se je razlikovala od razporeditve v splošni populaciji, so navadno posumili in največkrat tudi dokazali bolnišnično okužbo hemodializnih bolnikov v posamezni enoti (89–92).

Z našo raziskavo, v katero smo vključili izolate virusnega genoma 37 slovenskih hemodializnih bolnikov, okuženih s HCV, smo ugotovili, da je med njimi najpogostejša okužba z genotipom HCV 2 (37,8%), sledijo okužba s podtipom HCV 1b (27%) in z genotipom 3 (21,7%). Kar devet izmed 14 hemodializnih bolnikov, okuženih z genotipom HCV 2, ter šest izmed osmih bolnikov, okuženih z genotipom 3, se je zdravilo v isti hemodializni enoti (67, 68). Šlo je za hemodializno enoto, v kateri je bila leta 1993 ugotovljena največja prekuženost s HCV v Sloveniji, saj je bilo med 47 bolniki kar 16 (34%) okuženih s HCV. Prvi seropozitivni bolnik je bil v enoti odkrit konec leta 1990, nato je sredi leta 1992 sledilo osem novih in po enem letu še nadaljnjih sedem novih seropozitivnih hemodializnih bolnikov (61). Ugotovili smo, da je med 15 viremičnimi hemodializnimi bolniki iz te enote devet okuženih s podtipom HCV 2c in preostalih šest z genotipom 3. Nihče ni bil okužen s podtipom 1b, ki je sicer v Sloveniji najbolj razširjen, medtem ko je bila najpogostejša okužba s podtipom 2c, ki smo ga v Sloveniji dokazali le pri 5 izmed 200 (2,5%) bolnikov, okuženih s HCV, ki so bili poleg omenjenih 15 hemodializnih bolnikov vključeni v našo raziskavo (83). Na osnovi velikega števila novoodkritih okužb hemodializnih bolnikov s HCV med leti 1990 in 1993 ter pojavljanja genotipov HCV, ki so sicer v Sloveniji zelo redko zastopani, smo postavili hipotezo o prenosu okužbe s HCV med bolniki znotraj te hemodializne enote. Z natančno molekularno epidemiološko raziskavo smo postavljeno hipotezo potrdili in dokazali bolnišnično okužbo oz. prenos HCV med bolniki

znotraj ene hemodializne enote (68). Doslej so z natančnimi molekularno epidemiološkimi raziskavami dokazali prenos okužbe s HCV med hemodializnimi bolniki v štirih hemodializnih enotah (89–92). Po nam dosegljivih podatkih je to prvi primer dveh neodvisnih epidemij okužbe s podtipom HCV 2c in genotipom 3 v eni epidemiološki enoti. V ostalih štirih primerih dokazane bolnišnične okužbe s HCV v hemodializnih enotah je šlo namreč za širjenje podtipa 1b in v enem primeru tudi genotipa 4 (89–92). Na žalost, podobno kot pri nas, način oz. pot širjenja okužbe nista bila ugotovljena v nobeni od omenjenih hemodializnih enot. Večina raziskovalcev kot možne vzroke prenosa HCV v hemodializnih enotah navaja slabe oz. nedosledne higienske ukrepe, nedosledno sterilizacijo in posledično okužbo dializne tekočine ter okužbo instrumentov, površin in pripravkov zdravil, do katere pride zaradi nenamernih napak pri delu zdravstvenih delavcev (91, 92).

Genotipi HCV pri slovenskih bolnikih s hemofilijo

Bolniki s hemofilijo v večini držav predstavljajo populacijo z največjo prekuženostjo s HCV. Razporeditev genotipov v tej epidemiološki skupini je v posamezni državi odvisna od tega, ali bolniki prejemajo preparate koncentrata faktorja VIII, pripravljene iz krvi domačih krvodajalcev, ali uvožene pripravke (53). Čeprav smo v našo raziskavo zajeli 25 bolnikov s hemofilijo A iz Slovenije, jih je bilo samo 18 viremičnih. Pri sedmih smo dokazali okužbo s podtipom HCV 1b, pri štirih s podtipom 1a, pri treh s podtipom 2b ter pri po dveh s podtipom 2a in genotipom 3.

Genotipi HCV pri slovenskih intravenskih uživalcih drog

Z našo raziskavo, v katero smo vključili 85 intravenskih uživalcev drog iz Slovenije, ki so bili okuženi s HCV, smo ugotovili, da se razporeditev genotipov HCV pri njih statistično značilno razlikuje od razporeditve genotipov HCV v drugih skupinah slovenskih bolnikov, ki se med seboj razlikujejo po načinu okužbe s HCV.

Tako kot v večini evropskih držav (41, 51, 78, 82) je tudi pri slovenskih intravenskih uživalcih drog najpogostejša okužba z genotipom HCV 3. Delež okužbe z genotipom HCV 3 pri slovenskih intravenskih uživalcih drog (45,9%) je zelo podoben deležu, ugotovljenemu v sosednjih državah, zlasti v Avstriji in na Hrvaškem (77, 94). Genotip HCV 3 se pojavlja v večini severno ameriških in evropskih držav, kjer je razširjeno intravensko uživanje drog (8, 41, 78, 82), medtem ko je na Japonskem, kjer je veliko manj intravenskih uživalcev drog, zelo redek (95). Izvor tega genotipa HCV ni znan, razširjen pa je med krvodajalci v Braziliji in nedavno so ga odkrili tudi v Nepalju (96, 97). Večina evropskih raziskovalcev domneva, da so genotip HCV iz teh področij v Evropo prinesli v sedemdesetih letih evropski intravenski uživalci drog (41, 51, 78). Ker je najbolj učinkovit način okužbe s HCV parenteralni prenos, medtem ko je spolni prenos mnogo redkejši kot npr. pri virusu hepatitisa B in HIV, se je genotip HCV 3 v Evropi širil predvsem med intravenskimi uživalci drog, z izmenjavo igel za vbrziganje droge. Slovenski intravenski uživalci drog so genotip HCV 3 verjetno prinesli v Slovenijo šele v zadnjih desetih letih s stiki z intravenskimi uživalci drog iz drugih evropskih držav, saj pred tem intravensko uživanje drog v naši državi še ni bilo tako razširjeno, kot je danes.

Med slovenskimi intravenskimi uživalci drog je bila poleg genotipa HCV 3 zelo pogosta tudi okužba s podtipom HCV 1a (42,3%). Prevladovanje genotipa 3 in podtipa 1a pri intravenskih uživalcih drog so ugotovili tudi na Hrvaškem, v Italiji, Avstriji, Nemčiji, Franciji in Islandiji (41, 51, 77, 78, 82, 94).

Pri intravenskem uživalcu drog smo osamili tudi edini izolat RNA HCV genotipa 4 v Sloveniji. Genotip HCV 4 je sicer razširjen na srednjem vzhodu ter v Egiptu in centralni Afriki (28), dokazali pa so ga tudi pri manjšem številu bolnikov v nekaterih evropskih državah (41, 49, 50). Med bolniki, okuženimi z genotipom HCV 4, ki so jih odkrili v Evropi, je bila večina Egipčanov, ki so se okužili s HCV pred prihodom v Evropo, medtem ko so bili ostali evropski intravenski uživalci drog, ki so se verjetno okužili v omenjenih državah, kjer je razširjen genotip HCV 4 (49).

Zaključek

V naši raziskavi smo določili genotip/podtip HCV pri 226 slovenskih bolnikih, ki so se okužili s HCV na različne načine oz. so pripadali različnim epidemiološkim skupinam. Ugotovili smo, da je v Sloveniji najpogostejša okužba s podtipom HCV 1b (33,0%), sledijo okužba s podtipom 1a (28,4%), z genotipom 3 (26,5%), z genotipom 2 (11,6%) in z genotipom 4 (0,5%).

Z rezultati naše raziskave smo tudi v Sloveniji ugotovili razlike v razporeditvi genotipov HCV med različnimi epidemiološkimi skupinami bolnikov, okuženih s tem virusom, ki nakazujejo tesno povezavo med posameznimi genotipi/podtipi HCV in določenimi načini prenosa virusa. Tako pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom C prevladuje okužba s podtipom 1b, ki je povezana predvsem s transfuzijo krvi in zelo redka pri intravenskih uživalcih drog.

Pri slovenskih intravenskih uživalcih drog sta najbolj razširjeni okužbi z genotipom 3 in podtipom 1a. S podtipom 1b, ki je sicer v Sloveniji najbolj razširjen, je okuženih le 5,9% intravenskih uživalcev drog. Med vsemi bolniki, okuženimi z genotipom 3, je v Sloveniji 68% intravenskih uživalcev drog. Zato vsekakor obstaja možnost, da se je tudi kateri izmed devetih bolnikov s kroničnim hepatitisom C, okuženih z genotipom 3, pri katerih načina okužbe nismo ugotovili, okužil na ta način.

Med hemodializnimi bolniki v Sloveniji prevladuje okužba z genotipom 2, in to predvsem zaradi epidemije okužbe s tem genotipom v eni izmed hemodializnih enot. Sledi okužba s podtipom 1b. S tem podtipom HCV so se hemodializni bolniki najverjetneje okužili s transfuzijo krvi. Na tretjem mestu je pri slovenskih hemodializnih bolnikih okužba z genotipom HCV 3, kar je spet posledica epidemije okužbe s tem genotipom v eni hemodializni enoti.

Z rezultati naše raziskave smo potrdili potrebo po genotipizaciji izolatov HCV v posamezni državi in njen pomen za raziskovanje epidemiologije okužb s tem virusom. Upamo, da bomo v nadaljevanju našega dela opredelili genotip HCV tudi pri čim večjem številu preostalih bolnikov, okuženih s HCV, in tako prispevali k boljšemu razumevanju epidemiologije okužbe s tem virusom v Sloveniji.

Literatura

1. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus genome. In: Reesink HW, ed. *Hepatitis C virus*. Basel: Karger, 1994: 12–35.
2. Alter MJ. The detection, transmission, and outcome of hepatitis C virus infection. *Infect Agents Dis* 1993; 2: 155–66.
3. Cordoba J, Camps J, Esteban JI. The clinical picture of acute and chronic hepatitis C. In Reesink HW, ed. *Hepatitis C virus*. Basel: Karger, 1994: 69–88.
4. Gerber MA, Shieh YSC, Shim KS, et al. Detection of replicative hepatitis C virus sequences in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1992; 141: 1271–7.
5. Wejstal R, Widell A, Norkrans G. Hepatitis C virus infection with progression to hepatocellular carcinoma: a report of five prospectively followed patients in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 417–20.
6. van der Poel CL. Hepatitis C virus. Epidemiology, transmission and prevention. In: Reesink HW, ed. *Hepatitis C virus*. Basel: Karger, 1994: 137–63.
7. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570–83.
8. Dusheiko G, Schmilovitz-Weis H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13–8.
9. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321–4.
10. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organisation and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451–5.
11. Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 1021–5.
12. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9524–8.
13. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and organisation of the hepatitis C virus isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105–13.
14. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, et al. Sequence variability in the 5' non coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993; 74: 661–8.
15. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697–704.
16. Okamoto H, Kurai K, Okada SI, et al. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331–41.
17. Chan SW, McOmish F, Holmes EC, et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131–41.
18. Mori S, Kato N, Yagyu A, et al. A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 334–42.
19. Cha T-A, Beall E, Irvine B, et al. At least five but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7144–8.
20. Houghton MA, Wiener AJ, Han J, Kuo G, Choo Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381–8.
21. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Yamaguchi K, et al. A second group of hepatitis C virus. *Virus Genes* 1991; 5: 243–54.
22. Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 1995; 140: 1747–61.
23. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053–61.
24. 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 NS5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391–9.
25. Reesink HW, Bresters D, van der Poel CI, Cuypers HTM, Leile PN. New developments in hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: Suppl 194: 82–6.

26. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai A, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing of hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: an application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73: 673–9.
27. Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, et al. Characterization 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.
28. Okamoto H, Kobata S, Tokita H, et al. A second generation of genotyping hepatitis C virus by polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods* 1996; 57: 31–45.
29. Chayama K, Tsubota A, Arase Y, et al. Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8: 150–6.
30. Hashimoto M, Chayama K, Tubota A, et al. Typing six major hepatitis C virus genotypes by polymerase chain reaction using primers derived from nucleotide sequences of the NS5 region. *Int Hepatol Commun* 1996; 4: 263–7.
31. McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of different hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884–92.
32. Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76: 1197–204.
33. Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991; 72: 2105–12.
34. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterisation of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74: 1093–102.
35. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
36. Viazov S, Zibert A, Ramakrishnan K, et al. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. *J Virol Methods* 1994; 48: 81–92.
37. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, et al. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypable samples. *Virus Res* 1995; 38: 137–57.
38. Ohba K, Masashi M, Ohno T, et al. Classification of hepatitis C virus into major types and subtypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Res* 1995; 36: 201–14.
39. Tisminetzky S, Gerotto M, Pontisso P, et al. Comparison of genotyping and serotyping methods for the identification of hepatitis C virus types. *J Virol Methods* 1995; 55: 303–7.
40. Shev S, Widell A, Foberg U, et al. HCV genotypes in Swedish blood donors as correlated to epidemiology, liver disease and hepatitis C virus antibody profile. *Infection* 1995; 23: 253–7.
41. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 1607–10.
42. Dusheiko G, Simmonds P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hepatitis* 1994; 1: 3–15.
43. Tokita H, Okamoto H, Luengrojanakul P, et al. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *J Gen Virol* 1995; 76: 2329–35.
44. Zein NN, Persing DH. Hepatitis C genotypes: current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 58–462.
45. Sallie R. Hepatitis C: IIb (IV) or not IIb (IV) that is the question. *Hepatology* 1995; 22: 671–4.
46. Pawlotsky JM, Roudot-Thorwal F, Pellet C, et al. Influence of hepatitis C virus (HCV) genotypes on HCV recombinant immunoblot assay patterns. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1357–9.
47. Stuyver L, Claeys H, Wyseur A, et al. Hepatitis C virus in a hemodialysis unit: molecular evidence for nosocomial transmission. *Kidney Intern* 1996; 49: 889–95.
48. Healey CJ, Sabharwal NK, Daub J, et al. Outbreak of acute hepatitis C following the use of anti-hepatitis C virus-screened intravenous immunoglobulin therapy. *Gastroenterology* 1996; 110: 1120–6.
49. Feucht HH, Zöllner B, Schröter M, Hoyer A, Sterneck M, Polywka S. Distribution of genotypes and response to alpha-interferon in patients with hepatitis C virus infection in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 128–32.

50. Soriano V, Bravo R, Garcia-Samaniego J, et al. Circulating hepatitis C virus genotypes in Spain. *Vox Sang* 1996; 70: 180–1.
51. Silini E, Bono F, Cividini A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995; 22: 691–5.
52. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293–9.
53. Telfer PT, Devereux H, Savage K, et al. Chronic hepatitis C virus infection in haemophilic patients: clinical significance of viral genotype. *Thromb Haemostasis* 1995; 74: 1259–64.
54. Alter HJ. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 1995; 85: 1681–95.
55. Glaser E. Pilotska študija testiranja anti hepatitis C virusa pri darovalcih krvi in drugih potencialno ogroženih skupinah ljudi. *Zdrav Vestn* 1991; 60: 319–22.
56. Lešničar G. Preliminarni rezultati iz študije akutnega hepatitisa ne A ne B (hepatitisa C). *Zdrav Vestn* 1992; 61: 579–84.
57. Hojs R. Protitelesa za virus hepatitisa C pri hemodializnih bolnikih in hemodializnem osebju. *Zdrav Vestn* 1993; 62: 141–3.
58. Lešničar G. Frequency and consequences of acute hepatitis non-A, non-B (hepatitis C) in Slovenia. *J Hepatol* 1994; 21: 478–9.
59. Levičnik-Stezinar S, Glonar L. Preprečevanje prenosa hepatitisa s krvjo in krvnimi pripravki za transfuzijo. *Zdrav Var* 1995; 34: 342–5.
60. Seme K. *Virus hepatitisa C pri bolnikih z velikim tveganjem okužbe*. Magistrska naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta in Biotehniška fakulteta, 1995.
61. Seme K, Poljak M, Žužek-Rešek S, Avšič-Županc T. High prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one dialysis unit in Slovenia. *Nephron* 1995; 71: 99–100.
62. Seme K, Poljak M. Use of commercial PCR kit for detection of hepatitis C. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1995; 14: 549–52.
63. Seme K, Poljak M, Brinovec V, Lesničar G. Uporabnost seroloških testov tretje generacije v posredni diagnostiki okužbe s virusom hepatitisa C. *Zdrav Vest* 1995; 64: Suppl 3: 9–12.
64. Seme K, Poljak M, Lešničar G, Močivnik M. Dialysis unit without hepatitis C virus infection in Slovenia. *Nephron* 1996; 73: 322.
65. Seme K, Poljak M. Evaluation of Amplicor HCV Test: Our experiences after one year of routine use in a diagnostic laboratory. *Infection* 1996; 24: 140–3.
66. Seme K, Poljak M. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – nova metoda za spremljanje poteka in zdravljenja virusnih okužb. *Med Razgl* 1996; 35: 59–74.
67. Seme K. *Genomska tipizacija izolatov virusa hepatitisa C v Sloveniji*. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1997.
68. Seme K, Poljak M, Žužek-Rešek S, Debeljak M, Dovč P, Koren S. Molecular evidence for nosocomial spread of two different hepatitis C virus strains in one hemodialysis unit. *Nephron* 1997; 77: 273–8.
69. Seme K, Poljak M, Dovč P, Koren S. Comparative evaluation of four genotyping methods for hepatitis C virus. *Folia Biol (Prague)* 1997; 43: 219–24.
70. Lau JYN, Mizokami M, Kolberg JA, et al. Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis* 1994; 171: 281–9.
71. Giannini C, Thiers V, Nousbaum JB, Stuyver L, Maertens G, Brechot C. Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers or probes. *J Hepatol* 1995; 23: 246–53.
72. Kleter GEM, Doorn LJ, Stuyver L, et al. Rapid genotyping of hepatitis C virus RNA-isolates obtained from patients residing in Western Europe. *J Med Virol* 1995; 47: 35–42.
73. Zeuzem S, Ruster B, Lee JH, Stripf T, Roth WK. Evaluation of a reverse hybridization assay for genotyping of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1995; 23: 654–61.
74. Poljak M, Seme K. Hepatitis C virus genotypes – mixed infections. *Vox Sang* 1997; 72: 63.
75. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2250–66.

76. 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.
77. Hofmann H. Genotypes and viral load in patients with hepatitis C infection. *Infection* 1995; 23: 133–8.
78. Löve A, Sigurdsson JR, Stanzeit B, Briem H, Rikardsdottir H, Widell A. Characteristics of hepatitis C virus among intravenous drug users in Iceland. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 631–6.
79. Bravo R, Soriano V, Garcia-Samaniego J, et al. Hepatitis C virus genotypes in different risk population in Spain. *J Infect Dis* 1996; 173: 509–10.
80. Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996; 124: 868–76.
81. Kurosaki M, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology* 1993; 18: 1293–9.
82. Silini E, Bono F, Cividini A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995; 22: 691–5.
83. Seme K, Poljak M, Lešničar G, Brinovec V, Štepec S, Koren S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Slovenia. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 29–31.
84. Mosley JW. Is safe always safe? Pooled plasma derivatives and viral hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1307–10.
85. Yap PL. The viral safety of intravenous immune globulin. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: Suppl 1: 35–42.
86. Smith DB, Davidson F, Yap PL, et al. Levels of hepatitis C virus in blood donors infected with different viral genotypes. *J Infect Dis* 1996; 173: 727–30.
87. Zeuzem S, Schmid JM, Lee JH, Ruster B, Roth WK. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996; 22: 366–71.
88. Damen M, Cuyper HTM, Zaaier HL, et al. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J Virol Methods* 1996; 58: 175–85.
89. Stuyver L, Claeys H, Wyseur A, et al. Hepatitis C virus in a hemodialysis unit: Molecular evidence for nosocomial transmission. *Kidney Intern* 1996; 49: 889–95.
90. De Lamballerie X, Olmer M, Bouchouareb D, Zandotti C, De Micco P. Nosocomial transmission of hepatitis C virus in haemodialysis patients. *J Med Virol* 1996; 49: 296–302.
91. Allander T, Medin C, Jacobson SH, Garillner L, Persson MAA. Hepatitis C transmission in a hemodialysis unit: Molecular evidence for spread of virus among patients not sharing equipment. *J Med Virol* 1994; 43: 415–9.
92. Sampietro M, Badalamenti S, Salvadori S, et al. High prevalence of rare hepatitis C virus in patients treated in the same hemodialysis unit: Evidence for nosocomial transmission of HCV. *Kidney Intern* 1995; 47: 911–7.
93. Zeuzem S, Scheuermann EH, Waschk D, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from hemodialysis patients. *Kidney Intern* 1996; 49: 896–902.
94. Vince A, Palmović D, Kutela N, Jeren T. Determination of HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia. In: *Abstract book of IV. Croatian congress of clinical microbiology and infectology*. Zagreb: Croatian Medical Association, 1996: 33.
95. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 1993; 17: 277–83.
96. Stuyver L, Van Arnhem W, Wyseur A, DeLeys R, Maertens G. Analysis of the putative E1 envelope and NS4a epitope regions of HCV type 3. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 635–41.
97. Tokita H, Man Shrestha S, Okamoto H. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. *J Gen Virol* 1994; 75: 931–6.