

GEPATIT C VIRUSINI O'ZBEKISTON POPULYATSIYASIDAGI GENOTIP VARIANTLARINI O'RGANISH

Axmedov Baxodir Baxtiyarovich

Adliya vazirligi huzuridagi X.Sulaymonova nomidagi Respublika sud ekspertiza markazi. Odam DNKsi sud biologik ekspertizasi laboratoriyasi yetakchi eksperti.

Normatov Asilbek Ermuxammadovich

Adliya vazirligi huzuridagi X.Sulaymonova nomidagi Respublika sud ekspertiza markazi. Odam DNKsi sud biologik ekspertizasi laboratoriyasi mudiri

Annotatsiya: Mazkur maqolada gepatit S virusining umumiy tuzilishi, areali, uning genotipik variantlari hamda O'zbekiston aholisi o'rtasida uchrash chastotalari yoritilgan.

Kalit so'zlar: Gepatit C, genotip, PZR.

KIRISH

Gepatit C-bu parenteral yo'llar orqali yuquvchi virus kasalligi bo'lib, 1989-yilda D.U. Bredli, M. Xyuton, KviLim Chu i D. Kuo tomonidan kashf qilingan. Gepatit C virusi kattaligi 55-65nm bo'lgan, sferik shaklsha egadir. Butun dunyo aholisining 3% gepatit C bilan kasallangan bo'lib, har yili 3-4 mln aholi mazkur virusni o'ziga yuqtirib oladi. Infeksiya manbai-bu kasllangan odam bo'lib, kasallik parenteral, transplantsentlar va bevosita aloqa orqali yuqadi. JSSTning ma'lumotlariga ko'ra Gepatit C sababli yuzaga kelgan jigar sirrozi va karsinomasi sababli 2019-yilda butun dunyo boylab 290 000 nafar odam vafot etgan[2].

Gepatit C virusi Flaviviridae (lat. flavus - sariq) oilasi, Hepacivirus (lot. hepar - jigar) turkumiga kiradi. Tur ichida Gepatit C genotiplarga bo'linadi. Hozirgi kunda Gepatit Cning 6 xil genotiplari mavjud. Genotiplar arab raqamlari(1-6) bilan belgilanadi. Genotiplarni aniqlash kasallikni davolash va kechishini prognoz qilishda katta ahamiyatga ega hisoblanadi. Har bir genotip o'z navbatida subtiplarga bo'linadi. Bu subtiplar 20-25% gacha nukletidlar ketma-ketligi bilan o'zaro bir-biridan farq qilishi mumkin. Gepatit Cning 90 hil subtipi aniqlangan va ular lotin alifbosi bilan belgilanadi. Subtiplar bir-biridan interferonga ta'sirchanligi, virusning qondagi konsentratsiyasi va geografik tarqalash areali bilan farqlanadi[4].

Gepatit C virusi yuqori o'zgaruvchanlik hususiyatlariga ega. Odam organizmiga tushganidan so'ng, mutatsiyalar tufayli dastlabki ona virusdan farq qiluvchi ko'plab variantlar paydo bo'ladi. Bunday variantlar kvaziturlar deb nomlanadi. Har bir kvaziturlar to'plamida ustunlik qiluvchi variant va kam uchrovchi variantlar bo'ladi[1]. Bu kvaziturlar 20-25% gacha nukletidlar ketma-ketligi bilan o'zaro bir-biridan farq qilishi mumkin Immun tizimi ustunlik qiluvchi variantni yo'q qilganidan so'ng, uning

oʻrnini kam uchrovchi variantlardan biri egallaydi. Shunday qilib, gepatit C organizim immun tizimining taʼsiridan omon qoladi.

Virus qonga tushganidan soʻng, butun organizmga tarqaladi. Jigarda gepatotsitlarga yopishgan virus ularning ichiga kiradi. Gepatotsitlar ichiga kirganidan soʻng, virus replikatsiyasi boshlanadi natijada gepatotsitlar faoliyati buziladi. Yangi hosil boʻlgan virus zarralari gepatotsitlardan chiqib yangi jigar hujayralarini zararlaydi. Jigarning zararlanishi koʻpincha simptomsiz kechganligi sababli, kasallikni belgilari koʻp hollarda jigar sirrozi yoki karsinoma shakllangandan keyingina namoyon boʻladi. Shu vaqtga qadar gepatit Cga qarshi vaksina yaratilmagan.

Gepatit Cni diagnostika qilishning bir necha usullari mavjud:

-Qonning biokimyoviy taxlili(alaninaminotransferaza, aspartataminotransferaza, ishqoriy fosfataza, umumiy bilirubin);

-Epidemiologik anamnez natijalarini taxlil qilish;

-Gepatit C qarshi paydo boʻluvchi antitanalarni IFA yordamida aniqlash;

Ammo hozirgi kundagi eng ishonchli, aniq va erta diagnostika qilish uslubi bu PZR orqali aniqlash hisoblanadi. Bu usulning afzalliklaridan yana biri bu virusni inkubatsion davrida ham aniqlay olish hisoblanadi.

Gepatit C virusini genotipini aniqlash quyidagi holatlar uchun zarur:

Davolashni toʻgʻri tashkil qilish va kasallak qanday rivolanishini bashorat qilish;

Virusga qarshi terapiya va dorilar dozasini toʻgʻri tanlash;

Material va usul

Tadqiqotlar uchun material sifatida Gepatit C virusi bilan kasallanganligi tasdiqlangan 2021-yildan 2023-yilgacha “Genotexnologiya” MCHJ laboratoriyasiga murojaat qilgan 57 nafar bemorlarning qon plazmasidan foydalanildi. Shulardan 39 nafarini ayollar va 18 nafarini erkak jinsli bemorlar tashkil etadi.

RNK ajratish uchun Ribo-preb(ishlab chiquvchi FGUN SNIIE Rospotrebnadzor) toʻplamidan foydalanildi. Plazmadan RNK ajratish quyidagi ketma-ketlikda amalga oshirildi:

-Tadqiqot uchun yetarli miqdorda 1,5 ml hajmli probirkalar olinadi va tegishli tartibda belgilanadi.

-Har bir probirkaga 300 mkldan lizis bufer solinadi.

-Har bir probirkaga 10 mkldan ichki kontrol namunasi(IKO) solinadi.

-Har bir probirkaga 100 mkldan qon plazmasi solinadi va qopqoqlari yopilib, vorteksda aralashtiriladi.

-Probirkalar 65°S haroratga sozlangan termostatga 5 daqiqaga qoʻyiladi.

-Probirkalarga 400 mkldan pretsipitatsiya eritmasi solinib, vorteksda aralashtiriladi.

-Probirkalar 5 daqiqaga 13ming g tezlikka sentrifugaga qoʻyiladi.

-Choʻkmaga tegmagan holda suyuqlik probirkalardan olib tashlanadi.

- Probirkalardagi cho‘kma ustiga 500mkldan 3-raqamli bufer eritmasi solinib, 3-5-marta aralashtiriladi.
 - Probirkalar 1 daqiqaga 13ming g tezlikka sentrifugaga qo‘yiladi.
 - Cho‘kmaga tegmagan holda suyuqlik probirkalardan olib tashlanadi.
 - Probirkalardagi cho‘kma ustiga 200mkldan 4-raqamli bufer eritmasi solinib, 3-5-marta aralashtiriladi.
 - Probirkalar 2 daqiqaga 13ming g tezlikka sentrifugaga qo‘yiladi.
 - Cho‘kmaga tegmagan holda suyuqlik probirkalardan olib tashlanadi.
 - Probirkalardagi cho‘kmalarni quritish uchun 65°S haroratga sozlangan termostatga 5 daqiqaga qopqoqlari ochilgan holatda qo‘yiladi.
 - Probirkalardagi cho‘kma ustiga 50mkldan RNK bufer eritmasi solinib, vorteksda aralashtiriladi. Probirkalar 65°S haroratga sozlangan termostatga 5 daqiqaga qo‘yiladi.
 - Probirkalar 1 daqiqaga 13ming g tezlikka sentrifugaga qo‘yiladi
 - Ajratilgan RNK namunalari sovutgichga olib qoyiladi.
- Ikki bosqichli PZR o‘tkazish uchun REVERTA-L va “AmpliSens HCV-1/2/3-FL” (ishlab chiquvchi FGUN SNIIE Rospotrebnadzor) to‘plamlaridan foydalanildi.
- Bu jarayonlar quyidagi sxema bo‘yicha bajarildi[5]:

1-sonli jadval

«PEBEPTA-L» to‘plami bo‘yicha teskari transkripsiya reaksiyasi:

Reagent to‘plam nomi	Aralashma tayyorlash		Quyib chiqish jarayoni		
	Komponentlar nomi	1 dona analiz uchun kerakli hajm	1 dona analiz uchun qo‘shilishi lozim bo‘lgan aralashma hajmi	1 analiz uchun qo‘shilishi lozim bo‘lgan RNK hajmi	Reaksiyon aralashmaning umumiy hvjmi
PEBEPT A-L	RT-mix	10 mkl	10 mkl	10 mkl	20 mkl
	RT-G mix 1	0,4mk l			
	Revertaza	0,5 mkl			



37°C haroratli termostatga 30 daqiqaga qo'yiladi



Har bir probirkaga 20 mkldan DNK-bufer solinadi (aralashma hajmi 40 mkl bo'ladi)

2-sonli jadval

HCV-genotipirlash

Ko'rsatgich	Aralashma tayyorlash		Quyib chiqish jarayoni		
	Komponentlar nomi	1 dona analiz uchun kerakli hajm	1 dona analiz uchun qo'shilishi lozim bo'lgan aralashma hajmi	1 analiz uchun qo'shilishi lozim bo'lgan RNK hajmi	Reaksiyon aralashmaning umumiy hajmi
PZR aralashma 1b/3a	PZR aralashma-1 1b/3a	10 mkl	15 mkl	10 mkl	25 mkl
	PZR aralashma-2	5 mkl			
	Polimeraza	0,5 mkl			
PZR aralashma 1a/2	PZR aralashma-1 1a/2	10 mkl	15 mkl	10 mkl	25 mkl
	PZR aralashma-2	5 mkl			
	Polimeraza	0,5 mkl			
PZR aralashma IKN/4	PZR aralashma-1 VKO/4	10 mkl	15 mkl	10 mkl	25 mkl
	PZR aralashma-2	5 mkl			
	Polimeraza	0,5 mkl			

Amplifikatsiya dasturi

3-sonli jadval

Bosqich	Harorat C°	Bosqich davomiyligi	Fluoressensiya o'lchovi	Sikllar miqdori
1	50	30 daqiqa	-	1
2	95	15 soniya	-	1
3	95	5 soniya	-	5
	60	20 soniya	-	
	72	15 soniya	-	
4	95	5 soniya	-	40
	60	30 soniya	FAM, HEX, ROX, CyC5	
	72	15 soniya	-	

Natijalar va ularning tahlili

Olingan natijalar, ya'ni hosil bo'lgan fluoressensiya signalini to'planishi mahsus "real taym" dasturiy ta'minoti yordamida analiz qilinadi. FAM kanali orqali gepatit Cni 1-genotipi orqali amplifikatsiya hosilasi to'planadi. HEX kanali orqali gepatit Cni 2-genotipi orqali amplifikatsiya hosilasi to'planadi. ROX kanali orqali gepatit Cni 3-genotipi orqali amplifikatsiya hosilasi to'planadi. CyC5 kanali orqali gepatit Cni 4-genotipi va musbat kontrol natijaning amplifikatsiya hosilasi to'planadi. Natijalar chegara qiymatidan "Ct" kesishishidan xosil bo'lgan egri chiziq qiymati asosida tahlil qilinadi.

Murojaat qilgan bemorlarning 53(93%) nafarida genotiplash natijasida yuqoridagi 4 xil genotipdan biri aniqlangan bo'lsa, qolgan 4(7%) nafarida gepatit C tashxisi tasdiqlangan bo'lishiga qaramasdan biror-bir genotip aniqlamadi. Genotip aniqlanmaganligi sababilar esa bu virus miqdorining kamligi yoki bemordagi virus to'plam imkoniyatlaridan tashqaridagi genotip bo'lganligi bo'lishi mumkin. Genotiplash muvaffaqiyatli yakunlangan bemorlarda quyidagi natijalar aniqlandi:

4-сонли жадвал

1a	1b	2	3a	4	Noma'lum genotip
16	28	3	5	1	4
30%	52,9%	5,7%	9,5%	1,9%	

Yuqoridagi jadvaldan ma'lum bo'lishicha bemorlarning asosiy qismi(28 nafar) 1b genotipi bilan zararlangan bo'lsa, 16 nafarida 1a genotipi, 3 nafarida 2 genotipi, 5

nafarida 3 genotipi va faqat 1 nafarida 4 genotipi aniqlangan.

Adabiyotlar:

1. ↑ Identification of Novel HCV Genotype and Subtypes in Patients Treated with Sofosbuvir-Based Regimens www.natap.org
2. <https://www.belriem.by/informatsiya/naseleniyu/gepatit-s>
3. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
4. Литусов Н.В. Вирус гепатита С. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 14 с.
5. ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL»