

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Ene-Ly Jõgeda

**GBV-C esinemine, genotüübid ja mõju HIV-1
nakatumisele Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis**

Magistritöö

Juhendajad M.Sc Kristi Huik

Ph.D Radko Avi

Prof. Jaanus Remme

TARTU 2013

Sissejuhatus

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Inimese immuunpuudulikkuse viirus tüüp 1	6
1.1.1 HIV-1 genoomi struktuur	6
1.1.2 Alatüübid ja levik erinevates populatsioonides	7
1.1.2.1 HIV-1 levimus Eestis	8
1.1.3 HIV-1 patogeneesi mõjutavad faktorid	9
1.1.3.1 HIV-1 tropism	10
1.1.3.2 HIV-1 infektsiooni mõjutavad geneetilised faktorid	10
1.1.3.3 Koinfektsioonid	11
1.2 GB viirus tüüp C (GBV-C).....	11
1.2.1 GBV-C avastamine.....	11
1.2.2 GBV-C genoomi struktuur	12
1.2.3 GBV-C ülekanne ja paljunemine.....	12
1.2.4 GBV-C infektsioonist vabanemine.....	13
1.2.5 GBV-C levik maailmas	13
1.2.6 GBV-C genotüübid.....	13
1.3 GBV-C ja HIV-1 vahelised interaktsioonid	14
2. Eksperimentaalsena	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjalid ja meetodid.....	17
2.2.1 Uuritavad	17
2.2.2 Uuringusse kaasamise skeem	17
2.2.3 HIV, HCV ja HBV infektsioonide olemasolu määramine	17
2.2.4 GBV-C RNA olemasolu määramine	18
2.2.5 Statistiline analüüs.....	19

2.3 Tulemused	20
2.3.1 Epidemioloogilised näitajad ning HIV, HCV ja HBV infektsioonide esinemine	20
2.3.2 GBV-C infektsiooni ja GBV-C genotüüpide esinemine	20
2.3.3 Kofaktorite esinemine GBV-C positiivsetel ja negatiivsetel SN-del	21
2.3.4 GBV-C seos vanuse ja HIV-1 infektsiooniga.....	21
2.3.5 GBV-C seos HIV ja HCV kaksikinfektsiooniga	22
2.3.6 HIV-1 seosed süstimisaja ja koinfektsioonidega.....	22
2.4 Arutelu	24
Järeldused	28
Kokkuvõte	29
Summary.....	30
Kasutatud kirjandus	32
Kasutatud Internetiaadressid	35

Kasutatud lühendid

AIDS	omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
CCL	C-C tüüpi kemokiin (<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>)
CCR5	kemokiini retseptor 5 (<i>C-C chemokine receptor 5</i>)
CD	diferentseerumise klaster (<i>cluster of differentiation</i>)
CI	usaldusintervall (<i>confidence interval</i>)
CRF	tsirkuleeriv rekombinantne vorm (<i>circulating recombinant form</i>)
CXCL12	C-X-C tüüpi kemokiin (<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>)
CXCR4	kemokiini retseptor 4 (<i>C-X-C chemokine receptor 4</i>)
GBV-C	GB viirus tüüp C (<i>GB virus type C</i>)
HAART	kombineeritud antiretroviirusravi (<i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HBV	hepatiit B viirus (<i>hepatitis B virus</i>)
HCV	hepatiit C viirus (<i>hepatitis C virus</i>)
HIV-1	inimese immuunpuudulikkuse viirus tüüp 1 (<i>human immunodeficiency virus type 1</i>)
IDU	intravenoosete narkootikumide tarvitaja (<i>intravenous drug user</i>)
IQR	kvartiilide vahemik (<i>interquartile range</i>)
LTR	pikk kordusjärjestus (<i>long terminal repeat</i>)
NTR	mittetransleeritav piirkond (<i>nontranslated region</i>)
PBMC	perifeerse vere mononuklearsed rakud (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
OR	šansside suhe (<i>odds ratio</i>)
SIV	inimahvide immuunpuudulikkuse viirus (<i>simian immunodeficiency virus</i>)
SN	süstivad narkomaanid

Sissejuhatus

HIV-1 infektsioon on viimastel kümnenditel kujunenud üheks olulisemaks nakkushaiguseks. Hinnanguliselt suri 2011. aastal HIV infektsiooni tagajärjel 1,7 miljonit inimest ning registreeriti 2,6 miljonit uut nakatunut. Oluline läbimurre antiretroviirusravis saavutati 1990ndate keskel, kui võeti kasutusele HAART. Paraku pole HAART võimeline vabastama organismi täielikult HIV infektsioonist, sellel on olulised kõrvaltoimed ning ajapikku tekib ravimitele resistentsus.

Endistes Nõukogude Liidu riikides puhkes HIV-1 epideemia 1990ndate keskel peamiselt noorte meessoost süstivate narkomaanide populatsioonis. Eestisse jõudis see epideemia 2000. aastal, olles põhjustatud seni suhteliselt haruldase monofüleetilise HIV-1 CRF06_cpx viirustüve poolt. Nimetatud populatsioonile oli iseloomulik ka hepatiit C ja hepatiit B viiruste koinfektsioon.

On näidatud, et HIV-1 nakatumist ning haiguse progressiooni mõjutavad kaasuvad infektsioonid. Üheks selliseks on 1990ndate keskel avastatud lümfotroopne ning ise patogeneesi mittepõhjustav GB viirus tüüp C (GBV-C). Seni on GBV-C esinemist uuritud küll erinevates riskigruppides, sealhulgas HIV positiivsete populatsioonides, kuid Eestis pole taolisi uuringuid läbi viidud. Andmed puuduvad ka siinse regiooni GBV-C genotüüpide kohta.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Eesti HIV-1 epideemia kontekstis GBV-C viiruse esinemissagedust, genotüübilist jaotuvust ning mõju HIV-1 nakatumisele intravenoosete narkootikumide tarvitajate seas. Töö on koostatud TÜ arstiteaduskonnas, mikrobioloogia instituudis. Uuringus kasutatud andmed on kogutud TÜ tervishoiu instituudi, Beth'i Ülikooli (New York) ja TÜ mikrobioloogia instituudi koostöös.

1. Kirjanduse ülevaade

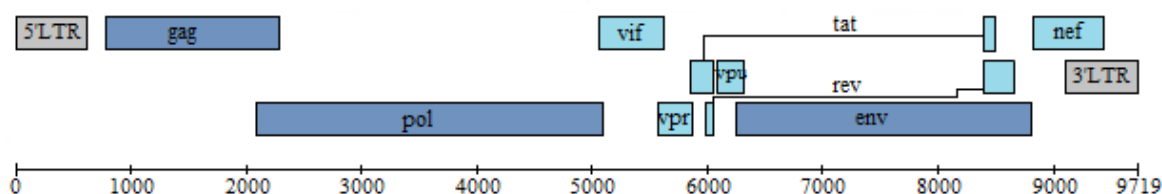
1.1 Inimese immuunpuudulikkuse viirus tüüp 1

Inimese immuunpuudulikkuse viirus tüüp 1 (*human immunodeficiency virus type 1*, HIV-1) on retroviirus, mis põhjustab omandatud immuunpuudulikkuse sündroomi (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). HIV-1 infektsioon on jätkuvalt üks olulisemaid nakkushaigusi maailmas. 2011. aastal nakatus umbes 2,6 miljonit ning infektsiooni kandjaid oli umbes 31,4-35,9 miljonit (UNAIDS, 2012).

Oluline läbimurre HIV vastases ravis saavutati 1990ndate keskel, kui võeti kasutusele kombineeritud antiretroviirusravi (ARV-ravi) ehk HAART (*highly active antiretroviral therapy*). HAART on kombinatsioon kolmest vähemalt kahte erinevasse ravimiklassi kuuluvast ARV-ravimist (UNAIDS, 2012). Tänapäevane HAART on võimeline alla suruma HIV-1 replikatsiooni ning seega pikendab AIDSi eelset perioodi ja vähendab HIV positiivsete suremust (UNAIDS, 2012). Paraku esineb ARV-ravil ka mitmeid probleeme: (a) ravimitel esinevad olulised kõrvaltoimed; (b) raviplaani eiramisel võib suure tõenäosusega tekkida ravimresistentsus; (c) antiretroviirusravi ja sellega kaasnevad protseduurid on suhteliselt kulukad.

1.1.1 HIV-1 genoomi struktuur

HIV-1 on *Retroviridae* sugukonda kuuluv üheaheelalise positiivse polaarsusega RNA viirus. HIV-1 genoom on veidi alla kümne tuhande aluspaari pikkune ning sisaldab üheksa geeni järjestust (Joonis 1).



Joonis 1. HIV-1 geenikaart. Genoomi otstes paiknevad pikad kordusjärjestused (*long terminal repeat*, LTR, hallid). Tumesinisega märgitud geenidelt transkribeeritakse polüproteiinid, teistelt üksikud valgud.

Gag, *pol* ja *env* geenidelt kodeeritakse polüproteiinid, mis lõigatakse kas viiruse enda või inimese proteaaside poolt funktsionaalseteks valkudeks. *Gag* kodeerib kapsiidivalke (p17,

p24, p7, p6), *pol* viiruslikke ensüüme (proteas, revertaas, integraas, RNaseH) ning *env* virioni pinnavalke, millest hilisema küpsemise käigus moodustuvad viiruse antiretseptorid (Turner & Summers, 1999). Ülejäänud kuus geeni (*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* ja *nef*) kodeerivad regulatoorseid valke, mis on vajalikud viiruse geeniekspressiooni regulatsioonil, replikatsioonil, uute virionide vabanemisel ja haiguse progressioonis (Turner & Summers, 1999).

HIV-1-le on iseloomulik vigaderohke replikatsioon. See on tingitud kahest HIV-1 revertaasi eripärast (Turner & Summers, 1999). Esiteks, revertaasil puudub *proofreading* aktiivsus, mistõttu tekib replikatsioonil hulgaliselt mutatsioone. Teiseks, revertaas võib komplementaarse DNA sünteesil kasutada mõlemat virioni pakitud genoomse RNA koopiat, mis põhjustab lisaks ka viiruse suure rekombinatiivse muutlikkuse.

1.1.2 Alatüübid ja levik erinevates populatsioonides

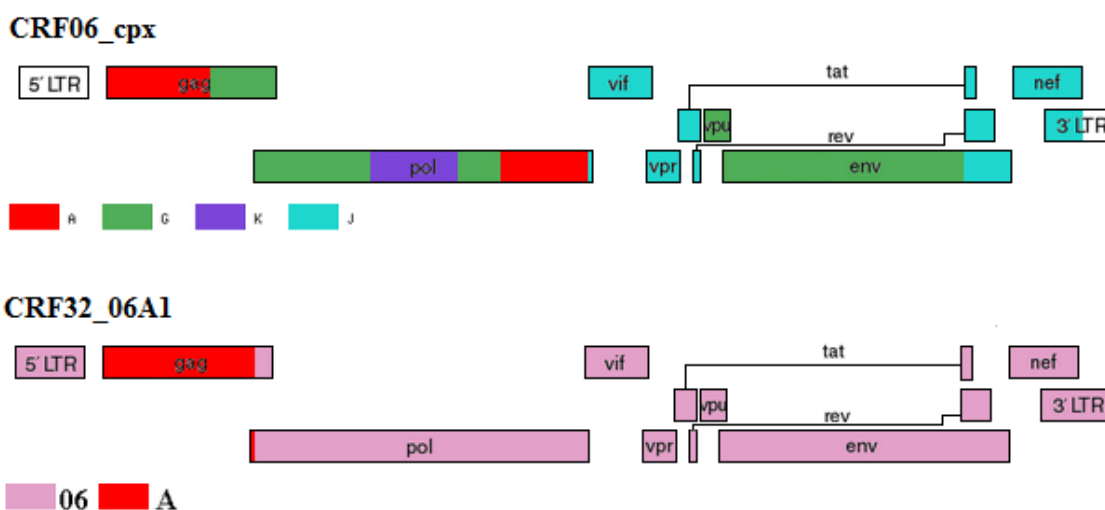
Tulenevalt HIV-1 geneetilisest varieeruvusest jagatakse HIV-1 tüved nelja alagruppi (M, N, O ja P). Enamik HIV positiivsetest on nakatunud M alagruppi (ingl. k. sõnast *major*) kuuluvate viirustüvedega; O alagrupi (ingl. k. sõnast *outlier*) poolt on põhjustatud alla 1% kõikidest HIV juhtudest ning see on peamiselt levinud Kesk-Aafrikas; N alagruppi (ingl. k. *non-M/non-O*) on seni leitud vaid üksikjuhtudel (alla 20) (Sharp & Hahn, 2011). Fülogeneetilise analüüsi põhjal pärinevad need kolm gruppi šimpansidelt levinud SIV-st (inimahvide immuunpuudulikkuse viirus) (Gao *et al.*, 1999). 2009. aastal identifitseeriti Prantsusmaal ka neljanda alagrupi (grupp P) poolt põhjustatud HIV-1 infektsioon, mille lähimad sugulased põhjustavad nakkusi hoopis gorilladel (Plantier *et al.*, 2009).

Ülemaailmset epideemiat põhjustavas M alagrupis eristatakse üheksat (A, B, C, D, F, G, H, J ja K) alatüüpi ja mitmeid nendevahelisi rekombinantseid vorme (*circulating recombinant form*, CRF). Kõige suurema esinemissagedusega on alatüüp C, põhjustades umbes 50% HIV-1 nakkustest maailmas, järgnevad alatüübid A ja B (Buonaguro *et al.*, 2007). C alatüübi osakaal on kõige suurem Aafrikas ja Indias (üle 80%), A alatüüp on laialt levinud Kesk- ja Ida-Aafrikas ning endistes Nõukogude Liidu riikides ning B alatüüp on valdav Kesk- ja Lääne-Euroopas, Ameerikas ja Austraalias (Buonaguro *et al.*, 2007).

1.1.2.1 HIV-1 levimus Eestis

1990ndatel oli Eestis HIV-1 infektsiooni esinemissagedus madal. 1999. aasta lõpuks oli diagnoositud vaid 96 HIV-1 positiivset isikut (Ustina *et al.*, 2001). Peamiseks levikuteeks oli suguline ülekannet (nii homo- kui heteroseksuaalsel kontaktil). HIV-1 infektsioon süstivate narkomaanide seas oli suhteliselt haruldane (4% HIV positiivsetest oli nakatunud süstitavate narkootikumide tarvitamise teel). Valdav enamus infektsioone oli põhjustatud B alatüüpi kuuluvate viiruste poolt (Ustina *et al.*, 2001).

Kontsentreeritud HIV-1 epideemia sai Eestis alguse 2000. aasta teises pooles. 90% uutest nakkusjuhtudest diagnoositi noorte meessoost intravenoosete narkootikumide tarvitajate (süstivad narkomaanid, edasipidi SN) populatsioonis (Uuskula *et al.*, 2002). Enamik HIV infektsiooni kandjatest oli nakatunud mujal maailmas suhteliselt haruldase HIV-1 rekombinantse vormi CRF06_cpx-ga (Adojaan *et al.*, 2005). CRF06_cpx on keeruka struktuuriga rekombinant, sisaldades piirkondi HIV-1 alatüüpidest A, G, K ja J (Joonis 2) (Montavon *et al.*, 2002). Umbes 10-20% nakkustest on põhjustatud ka CRF06_cpx ja alatüüp A1 vahelise teise põlvkonna rekombinandi CRF32_06A1 poolt (Joonis 2) (Adojaan *et al.*, 2005).

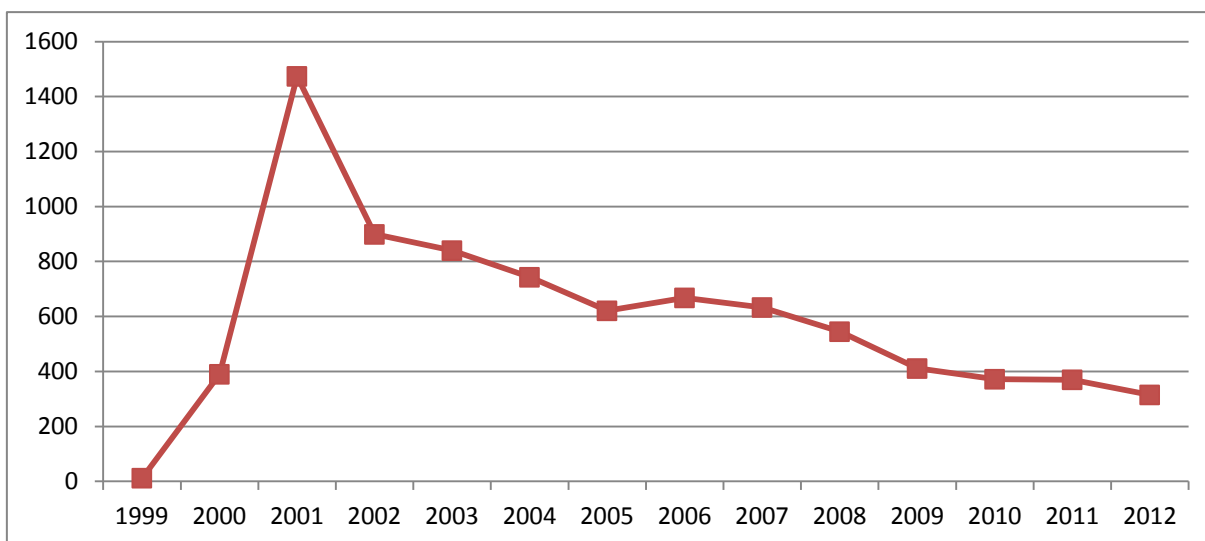


Joonis 2. CRF06_cpx ja CFR32_06A1 genoomid¹. HIV-1 erinevate alatüüpidega sarnased genoomsed järjestused on värvikoodidega välja toodud.

Pärast 2000. aasta augustit kasvas uute HIV nakkusjuhtude arv. Esmadiagnoosituid oli kõige rohkem aastal 2001, mil registreeriti 1474 uut HIV infektsiooni kandjat. Pärast 2001. aastat on

¹ <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

iga aastaga esmasdiagnoositute arv vähenenud (Joonis 3). Kokku on Eestis aastate jooksul HIV infektsioon registreeritud ligikaudu 8500 inimesel, neist umbes 400-1 on diagnoositud AIDS².



Joonis 3. Esmasdiagnoositute arv aastate lõikes. Märkus. y-teljel märgitud esmasdiagnoositute arv ning x-teljel aastad. 2012. aasta lõpuks oli Eestis kokku diagnoositud 8293 HIV positiivset².

Eestis ulatub HIV infektsiooni levimus täiskasvanute seas üle 1%, olles eriti kõrge just SN-de seas (50% või rohkem)³. Viimastel aastatel on HIV esmasdiagnoositute arv oluliselt vähenenud uute süstijate seas, ilmselt efektiivsete süstlavahetusprogrammide tõttu (Uuskula *et al.*, 2011). Samas ei ole toimunud olulisi muutusi levivates alatüüpides – esmasdiagnoositute seas on endiselt enamlevivaks alatüübiks CRF06_cpx (Avi *et al.*, 2011).

1.1.3 HIV-1 patogeneesi mõjutavad faktorid

HIV-1 haiguse progressioon sõltub nii viiruse kui peremehe poolsetest geneetilistest faktoritest, keskkondlikust mõjust ja koinfektsioonidest. Polümorfismid rakupinna retseptorite geenides ning viirustüvede eelistus koretseptori suhtes mõjutavad viiruse võimet rakku siseneda (Benkirane *et al.*, 1997; Sucupira *et al.*, 2012). Koinfektsioonid mõjutavad eelkõige peremehe immuunrakkude aktivatsiooni ja seeläbi nende vastuvõtlikkust HIV-1 infektsioonile ja haiguse progressioonile (Gendelman *et al.*, 1986; Juffermans *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2004).

² <http://terviseamet.ee/nakkushaigused/nakkushaigustesse-haigestumine/hiv-ja-aids.html>

³ <http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/factsheets/>

1.1.3.1 HIV-1 tropism

Viiruspartikli kinnitumine rakule toimub viiruse antiretseptori seondumisel viiruse retseptori CD4-ga. Lisaks sellele on viirusel rakku sisenemiseks vaja seonduda ka koretseptoriga. *In vivo* on peamisteks HIV-1 koretseptoriteks C-C tüüpi kemokiini retseptor CCR5 ja C-X-C tüüpi kemokiini retseptor CXCR4 (Berger *et al.*, 1999). Koretseptori eelistus määrab viirustüve troopsete. Sellest tulenevalt nimetatakse CCR5 koretseptorina kasutavaid HIV-1 viirustüvesid R5 troopseteks, CXCR4 kasutavad tüvesid X4 troopseteks ning tüvesid, mis suudavad mõlemaid kemokiini retseptoreid koretseptorina kasutada, R5X4 troopseteks (Berger *et al.*, 1999).

Viiruse tropism võib muutuda haiguse progressiooni käigus. Haiguse algstaadiumis replitseeruvad tüved kasutavad koretseptorina valdavalt CCR5 (Scarlati *et al.*, 1997). Haiguse progresseerudes muutuvad umbes kolmandikul patsientidel viirused X4 troopseteks (Berger *et al.*, 1999). Nimetatud muutus on ajaliselt seotud CD4+ T-rakkude arvu vähenemise ning AIDSi väljakujunemisega (Scarlati *et al.*, 1997). Samuti on näidatud kiiremat haiguse progressiooni patsientidel, kes on nakatunud X4 troopsete viirustüvedega (Sucupira *et al.*, 2012).

1.1.3.2 HIV-1 infektsiooni mõjutavad geneetilised faktorid

Polümorfismid koretseptorite geenides võivad mõjutada nii viiruse sisenemist rakku kui ka haiguse progressiooni. Tuntuim polümorfism on CCR5 geenis paiknev 32-aluspaariline deletsioon (CCR5 Δ 32), mille tulemusena ei toodeta funktsionaalset CCR5 geeniproducti (Benkirane *et al.*, 1997). Sellest tulenevalt ei ekspresseerita CCR5 Δ 32 homosügootidel CCR5 retseptorit rakkude pinnal ning nakatumist HIV-1 R5 tüvedega ei toimu. Heterosügootidel on näidatud tunduvalt madalamat CCR5 ekspressiooni rakkude pinnal ning aeglasemat haiguse progressiooni (Benkirane *et al.*, 1997).

CCR5 Δ 32 homosügootsetel indiviididel esineb resistentsus R5 troopsetele HIV-1 tüvedele, mitte aga X4 troopsetele tüvedele. Seni on HIV-1 infektsioon kirjeldatud ka väikesel arvul CCR5 Δ 32 homosügootsetel isikutel, neil on infektsioon põhjustatud X4 troopsete viirustüvede poolt (Michael *et al.*, 1998).

Seni pole CXCR4 geenis leitud polümorfisme, mis mõjutaksid HIV-1 nakatumist sarnaselt CCR5 geenis paiknevatele polümorfismidele. CCR5 Δ 32 homosügootsetel inimestel pole seni tuvastatud mingeid olulisi füsioloogilisi häireid (Berger *et al.*, 1999). Erandiks on vaid CCR5 Δ 32 homosügootide suurenenud risk West-Nile viiruse sümptomaatilise infektsioonile (Glass *et al.*, 2006).

CXCR4 retseptori olemasolu on aga hädavajalik alates organismi varasest arengust – CXCR4 puudulikud homosügootsed hiired (CXCR4 geeni *knockout*) surevad juba looteas (Tachibana *et al.*, 1998).

1.1.3.3 Koinfektsioonid

Erinevad infektsioonid (nt tuberkuloos) või vaksineerimine võivad suurendada kemokiinide retseptorite, sealhulgas CCR5 ja CXCR4, ekspressiooni rakkude pinnal ning seeläbi suurendada HIV-1 poolt nakatavate rakkude arvu (Juffermans *et al.*, 2001). Mõningate DNA viiruste (inimese T-lümfotroopne viirus tüüp 1, herpesviirus 3 ja tsütomegaloviirus) poolt kodeeritud valgud võivad aktiveerida ka HIV-1 latentset proviiruslikku DNA-d ning võimendada selle transkriptsiooni (Gendelman *et al.*, 1986).

Sõltuvalt koinfektsioonist võib selle mõju olla HIV-1 progressiooni pidurdav. Seni on kirjeldatud GB viirus tüüp C (*GB virus type C*, GBV-C) ja Dengue viiruse inhibeeriv mõju HIV-1 paljunemisele (Xiang *et al.*, 2009). Dengue viiruse mittestruktuurne valk NS5 inhibeerib HIV-1 replikatsiooni, alandab CXCR4 ekspressiooni ning suurendab CXCR4 ligandi CXCL12 ekspressiooni *in vitro* (McLinden *et al.*, 2008). GBV-C puhul on tuvastatud mitmeid HIV-1 paljunemist mõjutavaid interaktsioone, kuid neist täpsemalt järgmistes alapeatükkides.

1.2 GB viirus tüüp C (GBV-C)

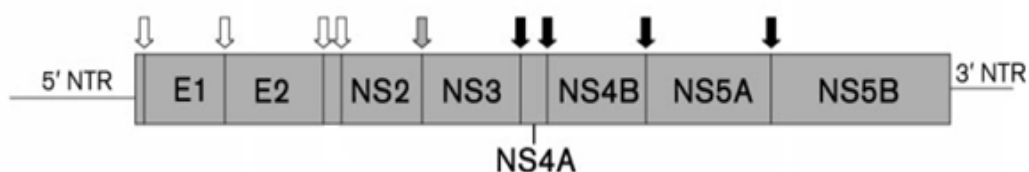
1.2.1 GBV-C avastamine

1995. aastal avastasid kaks sõltumatut laborit uue inimest nakatava viiruse. *Abbott Laboratories* nimetasid viiruse GBV-C-ks, kuna viiruse nukleotiidne järjestus oli sarnane varasemalt primaatidest avastatud GBV-A ja GBV-B viirustega (Simons *et al.*, 1995b). Stanfordi ülikooli töögrupp avastas viiruse kroonilist hepatiiti põdeva indiviidi seerumist ning nimetas selle hepatiit G viiruseks (*hepatitis G virus*, HGV) (Linnen *et al.*, 1996). GBV-C ja

HGV omavaheline võrdlus näitas 96%-list sarnasust, mistõttu oli suure tõenäosusega tegu sama viiruse kahe erineva variandiga. Kuna antud viirust pole seostatud ühegi haigusega, sealhulgas hepatiidiga, kasutatakse pigem nimetust GBV-C.

1.2.2 GBV-C genoomi struktuur

GBV-C on *Flaviviridae* sugukonda kuuluv üheaheelalise positiivse polaarsusega RNA viirus. GBV-C genoom on umbes 9,4 tuhande aluspaari pikkune ning genoomi organisatsioon on sarnane hepatiit C viirusele (*hepatitis C virus*, HCV) (Leary *et al.*, 1996). Nii HCV kui GBV-C genoomid sisaldavad 5' ja 3' mittetransleeritavaid piirkondi (*nontranslated region*, NTR) ning ühte avatud lugemisraami. Avatud lugemisraamilt kodeeritakse umbes 3000 aminohappe pikkune polüproteiin, mis lõigatakse nii rakuliste kui viiruslike proteaaside poolt struktuurseteks ja mittestruktuurseteks valkudeks (Joonis 4) (Leary *et al.*, 1996; Simons *et al.*, 1995a).



Joonis 4. GBV-C genoomne organisatsioon. Joonis on kohandatud artiklist (Stapleton *et al.*, 2011). GBV-C genoomis pole tuvastatud kapsiidivalgu kodeerivat järjestust. Struktuursed valgud (E1, E2) protsessitakse rakuliste proteaaside poolt (valged nooled), NS2-NS3 lõikamine toimub autoproteolüütiliselt (hall nool) ning ülejäänud mittestruktuursete valkude protsessimine toimub NS3-NS4A kompleksi poolt (mustad nooled). Kodeerivat järjestust ümbritsevad mittetransleeritavad piirkonnad.

1.2.3 GBV-C ülekanne ja paljunemine

GBV-C ülekandumine on sarnane HCV-le. Nakatumine GBV-C-ga võib toimuda horisontaalselt (suguline kontakt, kokkupuude verega) ja harvem ka vertikaalselt (emalt-lapsele) (Nerurkar *et al.*, 1998; Scallan *et al.*, 1998; Woelfle *et al.*, 1998).

GBV-C RNA-d võib leida perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest (PBMC), põrnast ja luuüdist (Laskus *et al.*, 1998; Radkowski *et al.*, 2000). GBV-C paljuneb rakukultuuris PBMC-des (Fogeda *et al.*, 1999), sealhulgas CD4⁺ T-rakkudes (Xiang *et al.*, 2000), CD8⁺ T-rakkudes ja CD19⁺ B rakkudes (George *et al.*, 2006).

1.2.4 GBV-C infektsioonist vabanemine

Immuunokompetentsed inimesed vabanevad GBV-C infektsioonist tavaliselt kuni aasta pärast esmast nakatumist (Thomas *et al.*, 1998). Nõrgenenud immuunsüsteemiga inimesed ei vabane viirusest nii kiiresti ning aktiivne infektsioon (esineb GBV-C RNA) võib kesta kuni kümneid aastaid (Masuko *et al.*, 1996). Aktiivsest infektsioonist vabanedes tekivad viiruse struktuurse valgu E2 vastased antikehad. E2 vastaste antikehade esinemine on levinum kui GBV-C RNA esinemine ning kaitseb reinfektsiooni eest (Thomas *et al.*, 1998). Samas, GBV-C aktiivsest infektsioonist vabanedes ei pruugi alati E2 vastaseid antikehi tekkida (Boodram *et al.*, 2011).

GBV-C RNA ja E2 vastaste antikehade koosesinemine on pigem erand kui reegel, seni on mõlemad tuvastatud mõnel üksikul patsiendil (Giret *et al.*, 2011; Ramezani *et al.*, 2008). Nii GBV-C RNA kui E2 vastaste antikehade samaaegne olemasolu võib olla üleminekustaadiumiks, kus nakatunu immuunsüsteem tegeleb infektsioonist vabanemisega. Immuunpuudulikkusega inimeste puhul võivad infektsioonijärgselt tekkinud antikehad pikema aja möödudes kaduda (Devereux *et al.*, 1998).

1.2.5 GBV-C levik maailmas

GBV-C on maailmas laialt levinud, kuigi esinemissagedus sõltub uuritavatest populatsioonidest. Veredoonoritel ulatub GBV-C RNA esinemissagedus kuni 5%-ni arenenud riikides ning kuni 20%-ni arengumaades (Mohr & Stapleton, 2009). Aktiivne GBV-C infektsioon on oluliselt rohkem levinud erinevate riskikäitumisega isikutel, ulatudes SN-de populatsioonis kuni 45%-ni (Boodram *et al.*, 2011; Rey *et al.*, 1999).

1.2.6 GBV-C genotüübid

GBV-C tüved jagatakse nukleotiidsel järjestusel põhjal gruppidesse/genotüüpidesse. Genotüüpide identifitseerimiseks on seni lähtutud viiruse genoomi 5' NTR regiooni nukleotiidsel järjestusel omavahelisest võrdlemisest (Muerhoff *et al.*, 1996).

Kirjeldatud on 6 erinevat GBV-C genotüüpi. Esmalt identifitseeritud genotüüpidest on genotüüp 1 levinud peamiselt Lääne-Aafrikas, genotüüp 2 peamiselt Põhja-Ameerikas ja Euroopas ning genotüüp 3 Aasias (Tai, Jaapan) (Katayama *et al.*, 1997; Muerhoff *et al.*, 1996; Muerhoff *et al.*, 1997; Mukaide *et al.*, 1997). Genotüüp 2 puhul eristatakse alatüüpe 2a ja 2b

(Muerhoff *et al.*, 1997). Hiljem avastatud genotüübid 4 ja 5 on levinud vastavalt Aasia kagu osas (Myanmar ja Vietnam) (Naito *et al.*, 1999) ja Lõuna-Aafrikas (Tucker *et al.*, 1999). Viimasena on leitud genotüüp 6, mis põhjustab nakkusi peamiselt Indoneesias (Handajani *et al.*, 2000).

1.3 GBV-C ja HIV-1 vahelised interaktsioonid

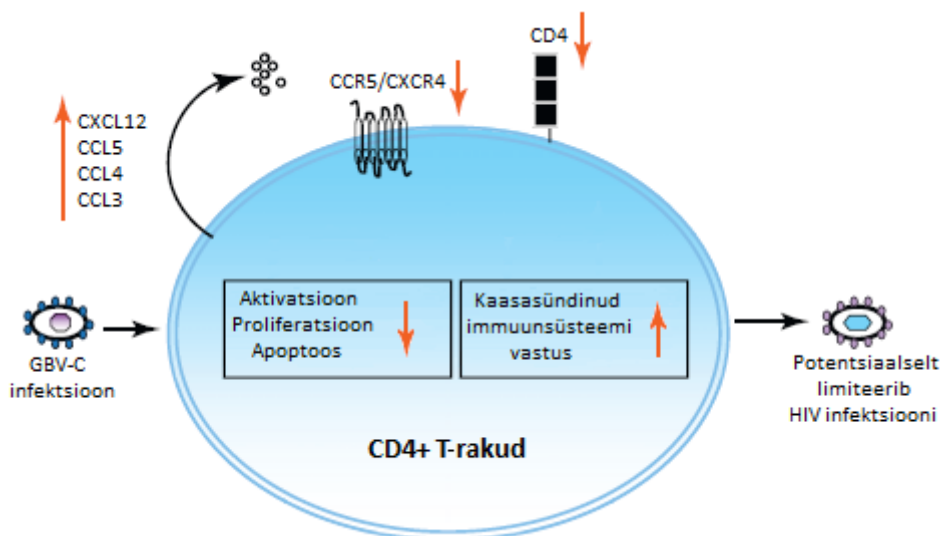
GBV-C ja HIV-1 koinfektsiooni korral on täheldatud mitmeid erinevusi võrreldes HIV-1 monoinfektsiooniga, sealhulgas madalamat viiruskoormust, kõrgemat CD4+ T-rakkude arvu ning hilisemat AIDSi väljakujunemist (Bhattarai & Stapleton, 2012). Uuringute kohaselt võib GBV-C otseselt inhibeerida HIV-1 paljunemist, kuid võib HIV-1 elutsükli mõjutada ka läbi rakuliste faktorite (nt T-rakkude aktivatsiooni alandamine) (Bhattarai & Stapleton, 2012; Jung *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2006).

In vitro uuringute kohaselt stimuleerib GBV-C PBMC-sid vabastama HIV infektsiooni inhibeerivaid faktoreid, kusjuures GBV-C replikatsioon ei ole selle jaoks vajalik (Jung *et al.*, 2005). Inhibeeriv efekt avaldus ka replikatsioonidefektsete GBV-C viirustüvedega. GBV-C ja HIV-1 koinfektsiooni võib potentsiaalselt inhibeerida nii R5 kui X4 troopseid HIV-1 isolaate (Jung *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2004). Mehhanismiks paistab olevat kemokiinide ja nende retseptorite ekspresioonitasemete muutmine.

GBV-C vahendab R5 troopsete HIV-1 tüvede supressiooni alandades CCR5 ekspressiooni raku pinnal ning suurendades CCR5 ligandide (CCL5, CCL3, CCL4) sekretsiooni (Joonis 5) (Xiang *et al.*, 2004). X4 troopsete isolaatide supressioon tuleneb CXCR4 ekspressiooni langusest ja CXCR4 ligandi (CXCL12) ekspressiooni suurenemisest (Jung *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2004).

In vitro on seni kirjeldatud kaks HIV-1 replikatsiooni mõjutavat GBV-C valku: E2 ja NS5A. E2 on GBV-C struktuurne valk, mis põhjustab CCR5 ekspressiooni langust rakkude pinnal (Jung *et al.*, 2007). E2 suurendab ka CCL5 sekretsiooni, kuid mitte CCL3 ja CCL4 sekretsiooni (Nattermann *et al.*, 2003). NS5A on GBV-C mittestruktuurne valk, millel on näidatud HIV-1 replikatsiooni inhibeeriv mõju koekultuuris (Mohr & Stapleton, 2009). NS5A põhjustab CXCR4 ekspressiooni languse rakkude pinnal ning suurendab CXCL12 sekretsiooni (Xiang *et al.*, 2006). Seega, GBV-C E2 valk pärsib R5 troopsete HIV-1 tüvede ja NS5A valk X4 troopsete HIV-1 tüvede sisenemist rakku ning seeläbi ka viiruse paljunemist.

GBV-C mõju HIV-1 progressioonile võib toimuda ka üle Fas-ligandi. Fas-ligand on oluline programmeeritud rakusurma ehk apoptoosi. Fas-ligandi ekspressioon on oluliselt madalam HIV-1 monoinfektsiooni kandvatel isikutel võrreldes GBV-C ja HIV-1 koinfektsiooni kandvate isikutega (Joonis 5) (Bhattarai & Stapleton, 2012). GBV-C avaldab ka T-rakkude aktivatsiooni. Koinfektsiooni kandvatel isikutel on madalam T-rakkude aktivatsioonimarkerite ekspressioon (CD38, CD69, CD25 ja CCR5), võrreldes HIV-1 monoinfektsiooniga isikutega (Joonis 5) (Bhattarai & Stapleton, 2012).



Joonis 5. GBV-C infektsiooni *in vivo* mudel. Joonis on kohandatud artiklist (Bhattarai & Stapleton, 2012). GBV-C infektsioon vähendab CCR5 ja CXCR4 ekspressiooni raku pinnal, suurendab nende ligandide ekspressiooni ning võimendab kaasasündinud immuunsüsteemi vastust (punased nooled). GBV-C infektsioon vähendab T-rakkude aktivatsiooni, proliferatsiooni ja apoptoosi. Seega, GBV-C, nakatades CD4+ T-rakke, võib potentsiaalselt limiteerida HIV infektsiooni (horisontaalsed nooled)

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

1. Määrata GBV-C esinemissagedus ja genotüübiline jaotuvus Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis.
2. Hinnata GBV-C ja kofaktorite (vanus, sugu, süstitavate narkootikumide tarvitamise kestvus, koinfektsioonid) vahelisi seoseid Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis.
3. Hinnata HIV-1 ja kofaktorite vahelisi seoseid Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis.

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1 Uuritavad

Käesolevas töös olid uuritavateks aktiivselt intravenoosseid narkootikume tarvitavad isikud (süstivad narkomaanid – SN-d). Uuringus osalenud 345 isiku vereproovid koguti ajavahemikul 9.11.2011-16.12.2011 Tallinnas MTÜ Convictus Eesti süstlavahetuspunktis.

Pärast informeeritud nõusoleku allkirjastamist viidi uuringus osalejatega läbi intervjuu, mille käigus koguti demograafilised näitajad (vanus, sugu), andmed HIV riskikäitumise ja intravenoossete narkootikumide tarvitamise kestvuse (edaspidi süstimisaeg) kohta.

Uuringu läbiviimiseks oli loa andnud Tartu Inimuuringute Eetikakomitee. Uuringus kasutatud andmed on kogutud TÜ tervishoiu instituudi, Beth'i Ülikooli (New York) ja TÜ mikrobioloogia instituudi koostöös.

2.2.2 Uuringusse kaasamise skeem

Uuritav populatsioon koguti kasutades uuritavate poolt juhitud kaasamise meetodit (*respondent-driven sampling*, RDS) (Malekinejad *et al.*, 2008). See on ahelkaasamismeetod, mis sobib just varjatud populatsioonide uurimiseks. Järgides läbilõiget Tallinna demograafilisest profiilist ja geograafilisest mitmekesisusest, valiti välja kuus „seemet“, kes erinesid üksteisest eelnevalt seatud kriteeriumite põhjal (sugu, etnilisus, sotsiaalne taust, HIV staatus jne). Andes nõusoleku uuringus osalemiseks sai igaüks neist primaarse stiimuli (kohaliku toidupoe talong). Iga järgneva isiku (kuni kolm) toomisega uuringusse sai uuringus osaleja sekundaarse stiimuli (kohaliku toidupoe talong).

2.2.3 HIV, HCV ja HBV infektsioonide olemasolu määramine

HIV testimine viidi läbi HIV referentslaboris, HCV ja HBV testimine Tervise Arengu Instituudis. HIV infektsiooni olemasolu määrati esmalt ELISA testiga (Vironistica HIV Uniform II Ag/Ab, BioMerieux, Marcy Etoile, Prantsusmaa) ning positiivsed tulemused kinnitati immunoblotanalüüsiga (INNO LIA HIV I/II Score Westernblot, Microgen Bioproducts Ltd, Surrey, Suurbritannia). HCV vastaste antikehade olemasolu määrati ETI-AB-HCVK-3 anti-HCV testiga (DiaSorin, Vercelli, Itaalia). HBV vastaste antikehade olemasolu määrati ETI-MAK-4 HBsAb (DiaSorin, Vercelli, Itaalia) ja ETIAB-COREK Plus

(anti-HBc core) (DiaSorin, Vercelli, Itaalia) testidega. HBV positiivseks loeti isikud, kes olid anti-HBc positiivsed ning HBV vaktseeritaks isikud, kes olid ainult HBsAb positiivsed.

2.2.4 GBV-C RNA olemasolu määramine

GBV-C RNA eraldati 140 µl vereplasmast kasutades *QIAamp Viral RNA Mini kit*'i (Qiagen, Hilden, Saksamaa) vastavalt tootja protokollile. Kasutades eraldatud RNA-d, viidi läbi pöördtranskriptsiooniline polümeraasi ahelreaktsioon (RT-PCR) praimeriga GBVC_Rout (Tabel 1). Reaktsioon viidi läbi lõppmahus 20 µl, mis sisaldas 9,6 µl eraldatud RNA-d ja järgmisi reagente vastavates lõppkontsentratsioonides: 1xRT puhvrit, 1mM dNTP (desoksüribonukleotiidtrifosfaatide segu), 8 pmol praimerit GBVC_Rout, 8 U pöördtranskriptaasi MuLV ja 8 U RNAasi inhibiitorit Ribolock.

Saadud cDNA-d amplifitseeriti *nested* PCR meetodil lõppmahus 50 µl, kasutades kahte paari spetsiifilisi praimereid (Tabel 1) vastavalt kahes järjestikuses reaktsioonis. Esimeses reaktsioonis kasutati 5 µl cDNA-d ning 25 pmol kumbagi välimist praimerit, teises reaktsioonis kasutati 3 µl esimese reaktsiooni produkti ja 25 pmol kumbagi sisemist praimerit. Teisi reagente kasutati kahes reaktsioonis samades lõppkontsentratsioonides: 1xPCR puhver ammooniumsulfaadiga, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ lahust, 2,58 U Maxima Hot Start *Taq* DNA polümeraasi ja *Pfu* DNA polümeraasi segu 6:1. PCR reaktsioonide läbiviimiseks kasutati termotsüklerit *Eppendorf Master Cycler Gradient* ja vastavad programmid on toodud tabelis 2. Kõikides reaktsioonides kasutatud praimerid telliti firmast TAG Copenhagen A/S (Kopenhaagen, Taani) ning ülejäänud PCR reagentid firmast Fermentas (Vilnius, Leedu). PCR positiivsed proovid loeti aktiivseteks infektsioonideks.

Tabel 1. PCR-il kasutatud praimerid (Giret *et al.*, 2011).

Praimeri nimi	Praimeri järjestus	Märkus
GBVC_Fout	5'-AGGTGGTGGATGGGTGAT-3'	välimine, positsioon 108; <i>sense</i>
GBVC_Rout	5'-TGCCACCCGCCCTCACCCGAA-3'	välimine, positsioon 531; <i>antisense</i>
GBVC_Fin	5'-TGGTAGGTCGTAAATCCCGGT-3'	sisemine, positsioon 134; <i>sense</i>
GBVC_Rin	5'-GGAGCTGGGTGGCCCCATGCAT-3'	sisemine, positsioon 476; <i>antisense</i>

Tabel 2. RT-PCR-il ja *nested* PCR-il kasutatud termotsükleri programmid.

RT-PCR		Nested PCR, I ring		Nested PCR, II ring	
1. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$	90 min	1. $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$	4 min	1. $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$	4 min
2. $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min	2. $T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s	2. $T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s
3. Hoida $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$		3. $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s	3. $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s
		4. $T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s	4. $T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s
		5. Punkte 2-4 kokku 40 tsükli		5. Punkte 2-4 kokku 40 tsükli	
		6. $T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min	6. $T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min
		7. Hoida $T = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$		7. Hoida $T = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$	

GBV-C RNA olemasolu detekteeriti geelelektrofooresil, kasutades 1%-list agarosgeeli ja PCR produkti värvimist etiidiumbromiidiga ultravioletvalguses. Positiivseks osutunud proovide nukleotiidne järjestus määrati Sanger'i sekveneerimisel, kasutades sisemist *forward* praimerit. Sekveneeritud järjestused joondati kasutades MEGA5 tarkvara ning fülogeneetilise puu koostamisel kasutati maksimaalse tõepära (*maximum likelihood*) meetodit (*Tamura-Ney substitution model*; *bootstrap* väärtused arvutatud 500 korduse pealt). Puu koostamisel kasutatud referentsjärjestused pärinevad andmebaasist GeneBank⁴.

2.2.5 Statistiline analüüs

Käesoleva töö statistiline analüüs viidi läbi kasutades programmi „R“ (versioon 2.15.2). Uuritavatega seotud näitajate kirjeldamiseks kasutati kirjeldava statistika meetodeid. Võimalikke erinevusi kahe grupi vahel kontrolliti kasutades vastavalt vajadusele Fisher'i täpset testi või Mann-Whitney-Wilcoxon testi. GBV-C ja kofaktorite (vanus, sugu, süstitavate narkootikumide tarvitamise kestvus, koinfektsioonid) ning HIV-1 ja kofaktorite vaheliste seoste hindamiseks kasutati logistilist regressioonanalüüsi. Oluliseks peeti statistilist tõenäosust $p < 0,05$.

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

2.3.3 Kofaktorite esinemine GBV-C positiivsetel ja negatiivsetel SN-del

Järgnevalt vaadati, kuidas sugu, vanus, süstimisae ja koinfektsioonid jagunevad GBV-C positiivsete ja negatiivsete gruppides. Leiti, et GBV-C positiivsete SN-de seas olid vanemad isikud ja rohkem HIV-positiivseid kui GBV-C negatiivsete seas (Tabel 3).

Tabel 3. Epidemioloogilised andmed ning HIV, HCV ja HBV infektsioonide esinemine GBV-C positiivsete ja negatiivsete seas.

	GBV-C staatus		p-väärtus
	GBV-C RNA+ (n = 114)	GBV-C RNA- (n = 231)	
Sugu			0,5530
Mehed, n (%)	92 (80,7%)	180 (77,9%)	
Vanus, mediaan (IQR)^a	28 (25-31)	31 (26-36)	0,0014
Süstimisaeg, mediaan (IQR)^a	11 (6-13)	11 (8-15)	0,1831
HIV staatus, n (%)			0,0013
HIV+	71 (62,3%)	101 (43,7%)	
HCV staatus, n (%)			0,5892
HCV+	103 (90,4%)	203 (87,9%)	
HBV staatus, n (%)			0,3162
HBV+	82 (71,9%)	150 (64,9%)	
HBV vaktsineeritud	12 (10,5%)	31 (13,4%)	

Märkus. ^a Vanuse ja süstimisaja väärtused on esitatud aastates.

GBV-C, HIV ja HCV kolmikinfektsioon tuvastati 69-l (20%) ning GBV-C, HIV, HCV ja HBV nelikinfektsioon 58 isikul (16,8%). Seitsmel isikul (2%) tuvastati ainult GBV-C monoinfektsioon ning 23-l (6,7%) ei tuvastatud ühtegi uuringu raames testitud viirust (GBV-C, HIV-1, HCV, HBV).

2.3.4 GBV-C seos vanuse ja HIV-1 infektsiooniga

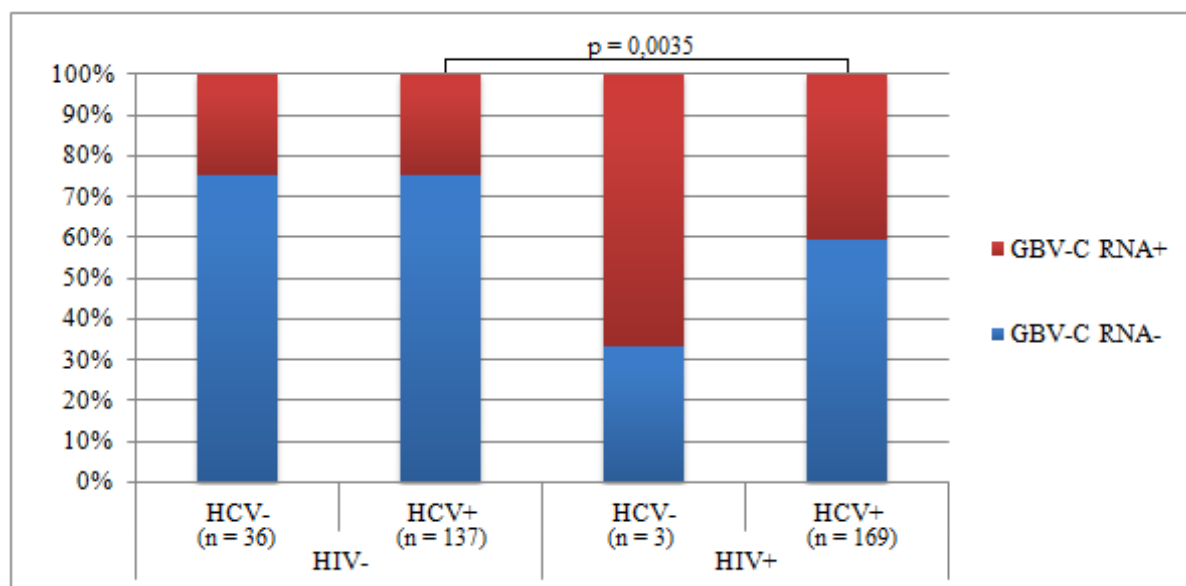
Vaadates GBV-C RNA seoseid kofaktoritega, selgus, et šansid omada GBV-C aktiivset infektsiooni vähenesid vanuse tõusuga. Vanematel uuringus osalenutel olid väiksemad šansid olla GBV-C RNA positiivne, kui noorematel (OR = 0,94; 95% CI = 0,90-0,98; p = 0,0013).

Univariantne analüüs näitas, et HIV positiivsetel isikutel olid umbes kaks korda suuremad šansid olla GBV-C positiivne, kui HIV negatiivsetel (OR = 2,13; 95% CI = 1,34-3,36;

$p = 0,0013$). Pärast vanuse kaasamist multivariantsesse analüüsi jäid mõlemad tunnused oluliseks selliselt, et vanuse tõustes vähenesid šansid ($OR = 0,93$; $95\% CI = 0,90-0,97$; $p = 0,0009$) ning HIV positiivsus suurendas šansse ($OR = 2,23$; $95\% CI = 1,39-3,58$; $p = 0,0008$) omada GBV-C aktiivset infektsiooni.

2.3.5 GBV-C seos HIV ja HCV kaksikinfektsiooniga

Vastavalt HIV ja HCV infektsioonide staatustele jagati uuritav populatsioon järgmistesse gruppidesse: (1) HIV ja HCV negatiivsed (HIV-HCV-); (2) HIV negatiivsed, HCV positiivsed (HIV-HCV+); (3) HIV positiivsed, HCV negatiivsed (HIV+HCV-); (4) HIV ja HCV positiivsed (HIV+HCV+). GBV-C infektsiooni esines rohkem HIV+HCV+ isikutel, kui HIV-HCV+ isikutel (vastavalt 40,8% ja 24,8%; $p = 0,0035$) (Joonis 7). Univariantne analüüs näitas, et HIV+HCV+ isikutel olid umbes kaks korda suuremad šansid olla GBV-C RNA positiivne, kui HIV-HCV+ isikutel ($OR = 2,09$; $95\% CI = 1,24-3,55$; $p = 0,0035$).



Joonis 7. GBV-C RNA esinemine HIV ja HCV negatiivsete, mono- või kaksikinfektsiooniga SN-de seas.

2.3.6 HIV-1 seosed süstimisaja ja koinfektsioonidega

Võrreldes HIV positiivseid ja negatiivseid SN-sid ilmnes erinevus süstimisaja puhul ning infektsioonide jaotuvuses. HCV ja HBV infektsioonide esinemissagedused olid kõrgemad HIV positiivsetel kui HIV negatiivsetel (vastavalt 98,3% ja 79,2% ning 88,7% ja 63,6%; mõlemal juhul $p < 0,0001$). Lisaks olid HIV positiivsed isikud kasutanud süstitavaid narkootikume kauem kui HIV negatiivsed (Tabel 4).

Tabel 4. Kofaktorite esinemine HIV positiivsete ja negatiivsete SN-de seas.

	HIV staatus		p-väärtus
	HIV- (n = 173)	HIV+ (n = 172)	
Sugu			0,5123
Mehed, n (%)	133 (76,9%)	139 (80,8%)	
Vanus, mediaan (IQR)^a	30 (24-35)	30 (27-33)	0,611
Süstimisaeg, mediaan (IQR)^a	10 (6-13)	12 (10-15)	< 0,0001
HCV staatus, n (%)			< 0,0001
HCV+	137 (79,2%)	169 (98,3%)	
HBV staatus, n (%)			< 0,0001
HBV+	91 (52,6%)	141 (82%)	
HBV vaktsineeritud	30 (17,3%)	13 (7,6%)	

Märkus. ^a Vanuse ja süstimisaja väärtused on esitatud aastates.

Järgnevalt hinnati seoseid HIV-i, süstimisaja ja koinfektsioonide esinemise vahel. Univariantne analüüs näitas, et isikutel, kes on GBV-C, HCV või HBV positiivsed, on vastavalt umbes kaks, 15 või neli korda suuremad šansid olla HIV positiivsed. Lisaks tõstab pikemaajaline süstitavate narkootikumide kasutamine HIV positiivsuse šansse. (Tabel 5).

Tabel 5. Univariantne analüüs hindamaks seoseid HIV infektsiooni, süstimisaja ja koinfektsioonide esinemise vahel.

Tulem: HIV positiivsus			
Univariantne analüüs			
	OR	95% CI	p-väärtus
GBV-C infektsioon			
GBV-C-*	1,0		
GBV-C+	2,13	1,34-3,36	0,0013
HCV infektsioon			
HCV-*	1,0		
HCV+	14,8	4,46-49,11	< 0,0001
HBV infektsioon			
HBV-*	1,0		
HBV+	4,1	2,51-6,69	< 0,0001
Süstimisaeg^a	1,06	1,02-1,11	0,0018

Märkus. ^a Süstimisaja väärtused on esitatud aastates. * referentsgrupp.

Järgmisena viidi läbi multivariantne analüüs, kuhu kaasati süstimisaja ja kõik eelpool nimetatud HIV-ga seotud infektsioonid. Selle tulemusel selgus, et HIV-i nakatumise šansse tõstsid nii GBV-C RNA positiivsus kui ka HCV ja HBV positiivsused. (Tabel 6).

Tabel 6. Multivariantne analüüs hindamaks seoseid HIV infektsiooni, süstimisaja ja koinfektsioonide esinemise vahel.

Tulem: HIV positiivsus			
Multivariantne analüüs			
	OR	95% CI	p-väärtus
GBV-C infektsioon			
GBV-C-*	1,0		
GBV-C+	2,19	1,32-3,62	0,0023
HCV infektsioon			
HCV-*	1,0		
HCV+	9,22	2,66-31,98	0,0005
HBV infektsioon			
HBV-*	1,0		
HBV+	2,56	1,43-4,61	0,0017
Süstimisaeg^a	1,02	0,97-1,07	0,4034

Märkus. ^a Süstimisaja väärtused on esitatud aastates. * referentsgrupp.

2.4 Arutelu

Antud töö raames määrati GBV-C genotüübid ja esinemissagedus Eesti SN-de populatsioonis ning hinnati GBV-C mõju HIV infektsiooni nakatumisele. Uuritav populatsioon koosnes europiidsesse rassi kuuluvatest peamiselt noortest meessoost SN-dest, kellest suur osa oli nakatunud ka hepatiit C ja B viirustega. Uuringule lisab väärtust ka Eesti HIV-1 epideemia homogeensus ja monofüleetiline päritolu (Adojaan *et al.*, 2005), mis annab parema võimaluse uurida GBV-C infektsiooni mõju HIV-1 nakatumisele.

Töös uuriti Eesti SN populatsioonis verrega levivate infektsioonide (HIV, HCV, HBV ja GBV-C) olemasolu ja omavahelisi interaktsioone. Kui GBV-C infektsioon esines umbes kolmandikul (33%) ja HIV infektsioon umbes pooltel (49,9%) uuritavatest, siis HCV ja HBV infektsioonide esinemissagedused olid oluliselt kõrgemad (vastavalt 88,7% ja 67,2%). See on kooskõlas varasemaga, kus näidati, et kokkupuutel saastunud süstaldega on risk nakatuda HCV ja HBV infektsiooni kõrgem kui HIV infektsiooni (Wasley & Alter, 2000).

GBV-C aktiivse infektsiooni esinemissagedust SN-de populatsioonis pole seni väga põhjalikult uuritud, kuid tulemused on ligilähedased käesoleva töö tulemustega. Varasemalt on näidatud, et GBV-C RNA esinemissagedus HIV negatiivsete SN-de seas ulatub kuni 32% (Anastassopoulou *et al.*, 1998; Boodram *et al.*, 2011) ning HIV positiivsete SN-de seas kuni 45% (Rey *et al.*, 1999). Sarnaselt käesoleva tööga kirjeldas Thomas *et al.* GBV-C RNA esinemissagedust nii HIV positiivsete kui negatiivsete SN-de populatsioonis ja tegi kindlaks GBV-C nakkuse 28%-l uuritavatel (Thomas *et al.*, 1998).

Üheks oluliseks leiuks antud töös oli see, et GBV-C aktiivse infektsiooni kandjaid oli rohkem nooremate uuritavate seas. Põhjuseks võib olla aktiivse GBV-C infektsiooni, kuid mitte varasemat nakkust näitavate GBV-C (E2 glükoproteiini) vastaste antikehade määramine. Vanemad SN-d on suurema tõenäosusega GBV-C infektsiooni juba läbinud, osad ilmselt ka oma pikema süstimisaja tõttu. Taolist seaduspära on kirjeldanud ka Thomas *et al.*, näidates, et nakatudes viirusega nooremas eas toimub üldjuhul viirusest vabanemine ka varem ning tekkivad antikehad aitavad vältida korduvat GBV-C infektsiooni (Thomas *et al.*, 1998).

GBV-C järjestuste fülogeneetiline analüüs näitas kahe alatüübi, 2a ja 2b, esinemist. Valdav enamik viirustest kuulusid 2a alatüüpi, kuid erinevalt Eesti HIV-1 CRF06_cpx viirustest ei moodusta nad üht monofüleetilist klastrit. Sarnast mitte-monofüleetilist GBV-C infektsiooni levikut on näidatud Kreeka SN-de populatsioonis (Anastassopoulou *et al.*, 1998). Eesti puhul viitab see GBV-C mitmetele sõltumatutele sisenemistele SN-de populatsiooni – ilmselt võis uuritavatel olla GBV-C infektsioon olemas juba enne süstitavate narkootikumide tarvitamise alustamist, kuna GBV-C on levinud ka tavapopulatsioonis (nt veredoonorid). Samas näitasid identsete GBV-C viirustüvede ning sarnastest viirustest koosnevate klastrite olemasolu (nii 2a kui 2b järjestuste klastrid), et süstitavate narkootikumide tarvitamine ning süstalde jagamine võis anda soodsa võimaluse viiruse kiireks levikuks.

Kuigi GBV-C genotüüpe pole seni Euroopas põhjalikult uuritud võib seniste tööde põhjal järeldada, et GBV-C genotüübiline struktuur on Euroopa lõikes suhteliselt muutumatu. Nii käesolev töö, kui ka Venemaal, Kreekas ja Saksamaal läbiviidud uuringud näitavad, et nendes regioonides on valdavaks genotüüp 2, kusjuures alatüüpidest on enamlevinud 2a (Anastassopoulou *et al.*, 1998; Dmitriev *et al.*, 2010; Neibecker *et al.*, 2011).

HIV-1, HCV ja HBV infektsioonid ei ole tõenäoliselt ajaliselt seotud. HCV ja HBV epideemiad said Eestis alguse kuni neli aastat enne HIV epideemiat⁵, mistõttu tõenäoliselt sisenes HIV-1 HCV ja HBV-ga eelnevalt nakatunud populatsiooni. Paraku puuduvad varasemad andmed GBV-C esinemissageduse kohta Eestis. Samas, võrreldes Eestis ringlevate GBV-C tüvede mittemonofüleetilisust ning HIV-1 CRF06_cpx tüvede monofüleetilisust, võib eeldada, et GBV-C infektsioon kandus Eestisse enne kontsentreeritud HIV-1 epideemia algust ning on populatsioonis kauem ringelnud kui HIV-1 CRF06_cpx.

Käesolev töö näitas seost HIV ja GBV-C infektsioonide esinemise vahel nii, et GBV-C positiivsetel isikutel on suurem tõenäosus omada HIV infektsiooni ja vastupidi. Tulemused nende kahe infektsiooni vastastikust mõjust on siiani vastuolulised. Kuigi mõningad tööd ei ole suutnud näidata, et GBV-C anktiivse infektsiooni olemasolu mõjutaks HIV infektsiooni (Dmitriev *et al.*, 2010; Giret *et al.*, 2011) on antud tööga sarnaseid tulemusi ka varem leitud (Heringlake *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2001). GBV-C ja HIV infektsioonide sage koosesinemine SN-de populatsioonis võib olla tingitud kahe viiruse sarnasest levikuteest kontamineeritud süstevahenditega.

Sarnaselt teistele SN populatsioonidele tõstab ka Eesti SN-del nii pikemaajaline süstitavate narkootikumide kasutamine kui HCV ja HBV positiivsus tõenäosust omada HIV infektsiooni (Imani *et al.*, 2008), mis on sõltumatu GBV-C infektsiooni olemasolust. Kõrge koinfitseerituse tase viitab eksponeeritust nimetatud viirustele, mis võib muuhulgas olla tingitud süstalde ja teiste süstevahendite jagamisest.

Vaatamata sellele, et kõik käsitletud viirused (HIV, HCV, HBV ja GBV-C) omavad sarnast levikuteed ja võiks arvata, et nende esinemissagedused on tugevas korrelatsioonis, ei ole antud uuringus GBV-C RNA positiivsus seotud HCV ja HBV infektsioonide esinemistega. See viitab, et lisaks süstevahendite jagamisele, võib GBV-C mõjutada HIV-i nakatumist ka mingite muude mehhanismide kaudu.

Põhjuseks võib olla inimese immuunvastuse erinevus HIV positiivsetel ja negatiivsetel isikutel. Vähenenud CD4+ T-rakkude arv ja üldine immuunaktiivsus võivad pidurdada GBV-C infektsioonist vabanemist HIV positiivsetel. Seda teooriat toetavad ka tööd, kus immuunokompetentsed inimesed vabanevad GBV-C infektsioonist tavaliselt kuni aasta pärast

⁵ www.terviseamet.ee

esmast nakatumist samas kui nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestel võib GBV-C aktiivne infektsioon kesta kuni kümneid aastaid (Masuko *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1998).

Kuna HIV ja HCV koosesinemine on Eesti SN-de populatsioonis väga kõrge, siis analüüsiti antud töö raames ka GBV-C esinemist sõltuvalt HIV ja HCV kaksikinfektsioonist. HCV monoinfektsiooniga SN-del oli GBV-C esinemissagedus madalam võrreldes HIV ja HCV kaksikinfektsiooniga patsientidel. Kuna GBV-C esinemissagedused ei erinenud HIV ja HCV kaksikinfektsiooniga ning HIV ja HCV negatiivsete isikute vahel, siis leitud seos on tõenäoliselt tingitud HIV infektsiooni mõjust HCV positiivses populatsioonis. Siinkohal tuleb silmas pidada HCV-HIV+ grupi väiksust (kolm isikut), millest tulenevalt ei ole antud töö põhjal võimalik teha lõplikke järeldusi GBV-C mõju kohta HIV ja HCV kaksikinfektsioonile.

Töö puudusena võib välja tuua, et paraku ei olnud saadaval andmeid HIV serokonversiooni või HIV infektsiooni kirjeldavate kliiniliste markerite (viiruskoormus ja CD4+ rakkude arv) kohta. Seetõttu ei olnud võimalik hinnata GBV-C mõju HIV progressioonile, mille puhul on näidatud soodsam HIV infektsiooni kulg GBV-C RNA positiivsetel, sealhulgas hilisem AIDSi väljakujunemine ning vähenenud suremus (Heringlake *et al.*, 1998).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kolmandik Eesti SN-st omab GBV-C aktiivset infektsiooni ja sarnaselt Euroopale ja Venemaale on nakkused põhjustatud alatüüpide 2a ja 2b poolt. GBV-C infektsioon on soodustav faktor HIV-1 infektsiooni nakatumisele. Lisaks GBV-C infektsioonile suurendasid ka HCV ja HBV infektsioonid ning pikem süstimisaeg šansse olla HIV positiivne.

Järeldused

1. Üks kolmandik Eesti süstivatest narkomaanidest kannab GBV-C aktiivset infektsiooni. Sarnaselt teistele Euroopa riikidele on selles populatsioonis prevaleerivaks genotüüp 2.
2. GBV-C aktiivse infektsiooni esinemine on seotud vanuse ja HIV staatusega. Noorematel isikutel esineb GBV-C aktiivne infektsioon sagedamini kui vanematel ning HIV positiivsetel on kõrgemad šansid omada GBV-C infektsiooni.
3. Pikemaajaline süstitavate narkootikumide kasutamine tõstab HIV infektsiooni tõenäosust. Samuti tõstavad GBV-C, HCV ja HBV infektsioonid šansse omada HIV infektsiooni.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli GBV-C esinemissageduse ja levivate genotüüpide määramine ning GBV-C võimaliku mõju hindamine HIV-1 infektsioonile kõrgelt eksponeeritute populatsioonis. Uuritav populatsioon koosnes 345-st intravenoosselt narkootikumide tarvitavast isikust, kelle vereproovid koguti ajavahemikul 9.11.2011-16.12.2011 Tallinnas MTÜ Convictus Eesti süstlavahetuspunktis. Kasutades RT-PCR ja *nested* PCR meetodeid, määrati GBV-C RNA olemasolu. PCR positiivseks osutunud proovid sekveneeriti Sanger meetodil, kasutades sisemist *forward* praimerit. Lisaks HIV-1 infektsioonile, esines uuritavas populatsioonis ka HCV ja HBV infektsioonid.

GBV-C aktiivne infektsioon tuvastati 33%-l (114/345) uuritavatest. GBV-C genotüüpidest oli enamlevinud alatüüp 2a (75,4%) ning vähem esines alatüüpi 2b (19,4%). GBV-C RNA positiivsust mõjutasid vanus ning HIV infektsioon. Vanuse tõustes vähenesid šansid (OR = 0,93; 95% CI = 0,90-0,97; p = 0,0009) ning HIV positiivsus suurendas šansse (OR = 2,23; 95% CI = 1,39-3,58; p = 0,0008) omada GBV-C aktiivset infektsiooni. HIV+HCV+ isikutel olid suuremad šansid olla GBV-C RNA positiivne kui HIV+HCV-isikutega (OR = 2,09; 95% CI = 1,24-3,55; p = 0,0035).

HIV-1, HCV ja HBV infektsioonide esinemissagedused olid vastavalt 50% (172/345), 89% (306/345) ja 67% (232/345). Univariantse analüüsi kohaselt suurendasid GBV-C (OR = 2,13; 95% CI = 1,34-3,36; p = 0,0013), HCV (OR = 14,8; 95% CI = 4,46-49,11; p < 0,0001) ja HBV (OR = 4,1; 95% CI = 2,51-6,69; p < 0,0001) infektsioonid ning pikemaajaline süstitavate narkootikumide kasutamine (OR = 1,06; 95% CI = 1,02-1,11; p = 0,0018) šansse olla HIV positiivne. Multivariantses analüüsis selgus, et HIV-i nakatumise šansse tõstsid GBV-C RNA (OR = 2,19; 95% CI = 1,32-3,62; p = 0,0023), HCV (OR = 9,22; 95% CI = 2,66-31,98; p = 0,0005) ja HBV (OR = 4,1; 95% CI = 1,43-4,61; p = 0,0017) positiivsused.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kolmandik Eesti SN-st omab GBV-C aktiivset infektsiooni ja sarnaselt Euroopale ja Venemaale on nakkused põhjustatud alatüüpide 2a ja 2b poolt. GBV-C infektsioon on soodustav faktor HIV-1 infektsiooni nakatumisele. Lisaks GBV-C infektsioonile suurendasid ka HCV ja HBV infektsioonid ning pikem süstimisaeg šansse olla HIV positiivne.

The prevalence and genotypic distribution of GBV-C and its associations with HIV infection among Estonian intravenous drug users

Ene-Ly Jõgeda

Summary

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a retrovirus that causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HIV-1 disease progression depends on both viral and host genetic factors, environmental impact and co-infections. Depending on the co-infection, other viruses may increase the expression of HIV-1 co-receptors and therefore HIV-1 replication (e.g. tuberculosis), or inhibit HIV-1 replication and delay disease progression (e.g. GB virus type C).

GB virus type C (GBV-C) is a RNA virus of the *Flaviviridae* family that has not been associated with any disease. Previous studies have indicated a beneficial effect of GBV-C on HIV-1 disease progression. GBV-C active infection is associated with lower HIV-1 viral load, increased CD4+ T-cell count and delayed progression to AIDS. The frequency of GBV-C RNA is up to 45% among HIV positive individuals.

We aimed to determine the prevalence of GBV-C and the distribution of its genotypes among Estonian injecting drug users (IDUs) and to evaluate associations between GBV-C and cofactors (gender, age, time of intravenous drug use, and co-infections).

The study included 345 IDUs from a syringe exchange program in Tallinn in 2011. The presence of GBV-C RNA was determined by reverse transcriptase-nested PCR in 5' non-coding region, PCR products were sequenced and thereafter genotyped by phylogenetic analysis. Differences between two groups were compared either by Fisher exact test or Mann-Whitney-Wilcoxon test, as appropriate. Uni- and multivariate logistic regression were used to determine associations between GBV-C or HIV-1 and cofactors.

Of total 33% (114/344) of study subjects were GBV-C RNA positive. Out of 114 sequenced GBV-C viruses 75.4% belonged to genotype 2a, 19.4% to genotype 2b and six viruses remained unclassified. The distribution of GBV-C differed between HIV+ and HIV- IDUs

(41.3% vs 24.9%; $p = 0.0019$) such that HIV positive persons had two times increased odds to be GBV-C positive as compared to HIV-negative subjects (OR = 2.13; 95% CI = 1.34-3.36; $p = 0.0013$). In addition, odds of being GBV-C RNA positive decreased with increasing age (OR = 0.94; 95% CI = 0.90-0.98; $p = 0.0013$). Multivariate analysis revealed that HIV positivity remained associated with GBV-C infection after adjustment for age (OR = 2.23; 95% CI = 1.39-3.58; $p = 0.0008$). No associations between HCV or HBV and GBV-C infections were found.

Of total, half of the subjects (172/345) were HIV-positive, 88.7% (305/345) HCV-positive, 67% (232/344) HBV-positive. GBV-C (OR = 2.13, 95% CI = 1.34-3.36, $p = 0.0013$), HCV (OR = 14.8, 95% CI = 4.46-49.11, $p < 0.0001$), and HBV (OR = 4.1; 95% CI = 2.51-6.69, $p < 0.0001$) infections, and longer time of intravenous drug use (OR = 1.06, 95% CI = 1.02-1.11, $p = 0.0018$) increased odds of being HIV positive. Multivariate analysis revealed that GBV-C, HCV, and HBV infections remained associated with HIV-1 infection (OR = 2.19, 95% CI = 1.32-3.62, $p = 0.0023$; OR = 9.22, 95% CI = 2.66-31.98, $p = 0.0005$; OR = 4.1; 95% CI = 1.43-4.61; $p = 0.0017$, respectively).

In conclusion, this study provides the unique report of GBV-C prevalence and genotype distribution on a large number of IDUs from Eastern-European region. GBV-C infection is more common in HIV-positive IDUs than HIV-negative IDUs from Estonia. Similarly to other European countries and Russia, the genotype 2a is prevailing.

Kasutatud kirjandus

- Adojaan, M., Kivisild, T. et al. (2005). Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 39(5): 598-605.
- Anastassopoulou, C.G., Paraskevis, D. et al. (1998). Prevalence patterns and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among imprisoned intravenous drug users. *J Med Virol*, 56(3): 246-252.
- Avi, R., Huik, K. et al. (2011). Emerging transmitted drug resistance in treatment-naive human immunodeficiency virus-1 CRF06_cpx-infected patients in Estonia. *Scand J Infect Dis*, 43(2): 122-128.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599): 868-871.
- Benkirane, M., Jin, D.Y. et al. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem*, 272(49): 30603-30606.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., & Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17: 657-700.
- Bhattarai, N., & Stapleton, J.T. (2012). GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol*, 20(3): 124-130.
- Boodram, B., Hershow, R.C. et al. (2011). GB virus C infection among young, HIV-negative injection drug users with and without hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*, 18(4): e153-159.
- Buonaguro, L., Tornesello, M.L., & Buonaguro, F.M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol*, 81(19): 10209-10219.
- Devereux, H., Sabin, C.A. et al. (1998). Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *J Med Virol*, 56(4): 316-320.
- Dmitriev, P.N., Tsikina, M.N. et al. (2010). [GBV-C infection in HIV-infected patients in the Russian Federation]. *Vopr Virusol*, 55(1): 23-26.
- Fogeda, M., Navas, S. et al. (1999). In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus. *J Virol*, 73(5): 4052-4061.
- Gao, F., Bailes, E. et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397(6718): 436-441.
- Gendelman, H.E., Phelps, W. et al. (1986). Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(24): 9759-9763.
- George, S.L., Varmaz, D., & Stapleton, J.T. (2006). GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis*, 193(3): 451-454.
- Giret, M.T., Miraglia, J.L. et al. (2011). Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One*, 6(4): e18407.
- Glass, W.G., McDermott, D.H. et al. (2006). CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med*, 203(1): 35-40.

- Handajani, R., Soetjipto et al. (2000). Prevalence of GB virus C/Hepatitis G virus infection among various populations in Surabaya, Indonesia, and identification of novel groups of sequence variants. *J Clin Microbiol*, 38(2): 662-668.
- Heringlake, S., Ockenga, J. et al. (1998). GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis*, 177(6): 1723-1726.
- Imani, R., Karimi, A. et al. (2008). Seroprevalence of HBV, HCV and HIV infection among intravenous drug users in Shahr-e-Kord, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*, 14(5): 1136-1141.
- Juffermans, N.P., Speelman, P. et al. (2001). Patients with active tuberculosis have increased expression of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4(+) T cells. *Clin Infect Dis*, 32(4): 650-652.
- Jung, S., Eichenmuller, M. et al. (2007). HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS*, 21(5): 645-647.
- Jung, S., Knauer, O. et al. (2005). Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS*, 19(12): 1267-1272.
- Katayama, Y., Apichartpiyakul, C. et al. (1997). GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) infection in Chiang Mai, Thailand, and identification of variants on the basis of 5'-untranslated region sequences. *Arch Virol*, 142(12): 2433-2445.
- Laskus, T., Radkowski, M. et al. (1998). Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J Virol*, 72(4): 3072-3075.
- Leary, T.P., Muerhoff, A.S. et al. (1996). Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*, 48(1): 60-67.
- Linnen, J., Wages, J., Jr. et al. (1996). Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, 271(5248): 505-508.
- Malekinejad, M., Johnston, L.G. et al. (2008). Using respondent-driven sampling methodology for HIV biological and behavioral surveillance in international settings: a systematic review. *AIDS Behav*, 12(4 Suppl): S105-130.
- Masuko, K., Mitsui, T. et al. (1996). Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*, 334(23): 1485-1490.
- McLinden, J.H., Stapleton, J.T. et al. (2008). Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication. *J Infect Dis*, 198(6): 860-863.
- Michael, N.L., Nelson, J.A. et al. (1998). Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32. *J Virol*, 72(7): 6040-6047.
- Mohr, E.L., & Stapleton, J.T. (2009). GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat*, 16(11): 757-768.
- Montavon, C., Toure-Kane, C. et al. (2002). CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 29(5): 522-530.

- Muerhoff, A.S., Simons, J.N. et al. (1996). Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol*, 25(3): 379-384.
- Muerhoff, A.S., Smith, D.B. et al. (1997). Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol*, 71(9): 6501-6508.
- Mukaide, M., Mizokami, M. et al. (1997). Three different GB virus C/hepatitis G virus genotypes. Phylogenetic analysis and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Lett*, 407(1): 51-58.
- Naito, H., Win, K.M., & Abe, K. (1999). Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *J Clin Microbiol*, 37(4): 1217-1220.
- Nattermann, J., Nischalke, H.D. et al. (2003). Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*, 17(10): 1457-1462.
- Neibecker, M., Schwarze-Zander, C. et al. (2011). Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol*, 83(4): 685-694.
- Nerurkar, V.R., Chua, P.K. et al. (1998). High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection among homosexual men infected with human immunodeficiency virus type 1: evidence for sexual transmission. *J Med Virol*, 56(2): 123-127.
- Plantier, J.C., Leoz, M. et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, 15(8): 871-872.
- Radkowski, M., Kubicka, J. et al. (2000). Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood*, 95(12): 3986-3989.
- Ramezani, A., Gachkar, L. et al. (2008). Detection of hepatitis G virus envelope protein E2 antibody in blood donors. *Int J Infect Dis*, 12(1): 57-61.
- Rey, D., Fraize, S. et al. (1999). High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol*, 57(1): 75-79.
- Scallan, M.F., Clutterbuck, D. et al. (1998). Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *J Med Virol*, 55(3): 203-208.
- Scarlatti, G., Tresoldi, E. et al. (1997). In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*, 3(11): 1259-1265.
- Sharp, P.M., & Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1): a006841.
- Simons, J.N., Leary, T.P. et al. (1995a). Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*, 1(6): 564-569.
- Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J. et al. (1995b). Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8): 3401-3405.
- Stapleton, J.T., Fong, S. et al. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*, 92(Pt 2): 233-246.
- Sucupira, M.C., Sanabani, S. et al. (2012). Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS One*, 7(1): e30292.
- Tachibana, K., Hirota, S. et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393(6685): 591-594.

- Thomas, D.L., Vlahov, D. et al. (1998). Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis*, 177(3): 539-542.
- Tucker, T.J., Smuts, H. et al. (1999). Molecular characterization of the 5' non-coding region of South African GBV-C/HGV isolates: major deletion and evidence for a fourth genotype. *J Med Virol*, 59(1): 52-59.
- Turner, B.G., & Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, 285(1): 1-32.
- UNAIDS. 2012. UNAIDS Report on the Global AIDS epidemic. www.unaids.org.
- Ustina, V., Zilmer, K. et al. (2001). Epidemiology of HIV in Estonia. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17(1): 81-85.
- Uuskula, A., Des Jarlais, D.C. et al. (2011). Expanded syringe exchange programs and reduced HIV infection among new injection drug users in Tallinn, Estonia. *BMC Public Health*, 11: 517.
- Uuskula, A., Kalikova, A. et al. (2002). The role of injection drug use in the emergence of Human Immunodeficiency Virus infection in Estonia. *Int J Infect Dis*, 6(1): 23-27.
- Wasley, A., & Alter, M.J. (2000). Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*, 20(1): 1-16.
- Woelfle, J., Berg, T. et al. (1998). Persistent hepatitis G virus infection after neonatal transfusion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 26(4): 402-407.
- Xiang, J., George, S.L. et al. (2004). Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet*, 363(9426): 2040-2046.
- Xiang, J., McLinden, J.H. et al. (2006). An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42): 15570-15575.
- Xiang, J., McLinden, J.H. et al. (2009). Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol*, 183(12): 7860-7869.
- Xiang, J., Wunschmann, S. et al. (2001). Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med*, 345(10): 707-714.
- Xiang, J., Wunschmann, S. et al. (2000). Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol*, 74(19): 9125-9133.

Kasutatud Internetiaadressid

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

<http://terviseamet.ee/nakkushaigused/nakkushaigustesse-haigestumine/hiv-ja-aids.html>

<http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/factsheets/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Ene-Ly Jõgeda**

(sünnikuupäev: 23.02.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

**GBV-C esinemine, genotüübid ja mõju HIV-1 nakatumisele Eesti süstivate
narkomaanide populatsioonis**

mille juhendajad on Kristi Huik, Radko Avi, Jaanus Remme,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013