



شناسایی جهش های ژن NS5B ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C در استان گیلان

لیلا اسدپور^{۱*}، حمدالله رحیمی دوگانه^۲، مهناز هوشمند راد^۲

^۱استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

^۲کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: ویروس هپاتیت C عامل اصلی هپاتیت مزمن کبدی است که سالیانه باعث مرگ هزاران نفر در دنیا می گردد. پروتئین NS5B، RNA پلی مرز وابسته به RNA است که توسط ژن NS5B کد می شود و در همانندسازی ویروس نقش دارد. از جمله داروهای موثر در درمان این عفونت های ناشی از این ویروس مهارکننده های پروتئین NS5B می باشند. ظهور سویه های مقاوم به این داروها یک مانع بزرگ در موفقیت درمان می باشد. هدف از این مطالعه بررسی جهش های احتمالی در ناحیه NS5B ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C در استان گیلان است.

مواد و روش ها: RNA ژنومی ویروس از پلاسما ۲۲۵ بیمار آنتی HCV مثبت استخراج و شناسایی مولکولی و تعیین سروتیپ آن به روش RT-PCR و تعیین توالی محصول انجام شد. پس از آن ژن NS5B در ۱۰ سویه دارای ژنوتیپ 1a تکثیر و به منظور شناسایی جهش ها توالی یابی گردید.

یافته ها: به ترتیب ژنوتیپ های 3a (۵۳/۳ درصد) و 1a (۳۶/۹ درصد) فراوان ترین ژنوتیپ های شناسایی شده در گیلان بودند. بر اساس نتایج توالی یابی، از میان ۱۰ سویه دارای ژنوتیپ 1a مورد بررسی در ۵ سویه، ۷ نوع جهش بدمعنی در کدون های Q309، A327، S254، K304، N307، R250 و A334 شناسایی شد.

نتیجه گیری: ژنوتیپ 1a از ژنوتیپ های شایع ویروس هپاتیت C در گیلان می باشد. شناسایی جهش ها یا پلی مورفیسم مرتبط با مقاومت در ویروس هپاتیت C می تواند در بهینه سازی درمان و تعیین کارایی داروها در درمان هپاتیت C مفید باشد. **واژگان کلیدی:** هپاتیت C، مقاومت دارویی، جهش NS5B.

پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹۷

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۷

مقدمه

جنس RNA تک رشته ای با طول تقریبی ۹/۶ کیلو باز می باشد. این ویروس عضوی از خانواده فلاوی ویریده و جنس هپاسی ویروس است. ویروس هپاتیت C دارای توالی نوکلئوتیدی متغیر در طول ژنوم خود است و بر اساس مطالعات فیلوژنتیک به ۷ ژنوتیپ و حدود ۹۰ زیر تیپ تقسیم می شود. تفاوت ژنوتیپ ها حاصل اختلاف در بیش یا برابر ۳۰٪ توالی نوکلئوتیدها است. ژنوتیپ ۱ شایع ترین ژنوتیپ با گسترش جهانی می باشد که پاسخ به درمان آن ضعیف است. همچنین بیش از ۴۵ درصد موارد عفونت با این

ویروس هپاتیت C یک مشکل عمده بهداشتی در سراسر جهان می باشد و حدود ۱۷۰ میلیون نفر در دنیا به عفونت این ویروس مبتلا هستند و ۷۰۰ هزار نفر از بیماری های کبدی ناشی از این عفونت جان خود را از دست می دهند. این ویروس منجر به ایجاد هپاتیت حاد و مزمن، سیروز و کارسینوم سلول های کبدی می گردد (۱ و ۲).

ویروس هپاتیت C یک ویروس پوشش دار و دارای ژنومی از

* آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: asadpour@iaurasht.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۱۳۳۸۲۸۶۰

تعدادی از این جهش‌های مقاومتی در نواحی یاد شده شناسایی شده‌اند.

هدف این مطالعه بررسی جهش‌های احتمالی در ناحیه NS5B ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C، به منظور بررسی دلایل مقاومت به داروهای مهارکننده پروتئین NS5B، در استان گیلان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه، ۲۲۵ نمونه پلاسما بی‌ماران آنتی HCV مثبت (بیماران مثبت از نظر آنتی بادی ضد HCV) مراجعه‌کننده در سال‌های ۹۴ و ۹۵ به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر رشت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های پلاسما تا زمان انجام آزمون در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

ب) استخراج RNA و ساخت cDNA: به منظور استخراج RNA از کیت QIAamp (شرکت Qiagen، آلمان) استفاده گردید. به دلیل ناپایدار بودن مولکول RNA، پس از استخراج، cDNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما، ایران) ساخته شد. بدین منظور RNA، رندوم هگزامر و آب مقطر RNase free با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. سپس آنزیم و دیگر اجزای واکنش به مخلوط اضافه و برای انجام واکنش سنتز cDNA به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس قرار گرفت. در نهایت مخلوط واکنش در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد تا آنزیم RT غیرفعال گردد.

ج) شناسایی مولکولی و تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C: به منظور شناسایی مولکولی ویروس هپاتیت C، از cDNA حاصل در واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ناحیه 5'-UTR

ویروس ایجاد می‌شود. پس از آن ژنوتیپ‌های ۳ و ۲ بیشترین شیوع را دارند (۴-۲).

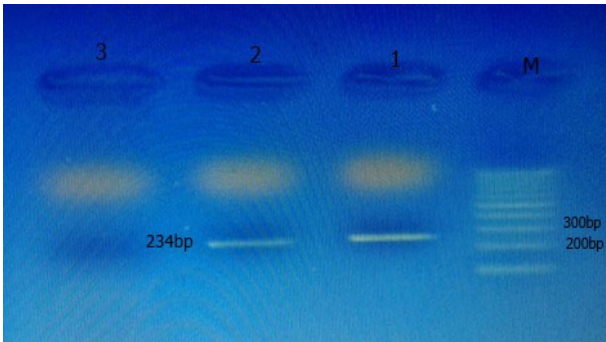
تا قبل از سال ۱۹۹۰ که ویروس هپاتیت C کشف نشده بود و هیچگونه کیت آزمایشگاهی نیز برای شناسایی ویروس وجود نداشت، اصلی‌ترین راه انتقال آلودگی، خون و فرآورده‌های آلوده به ویروس بود. اما با کشف ویروس و تولید کیت‌های آزمایشگاهی تا حد زیادی از انتقال ویروس جلوگیری به عمل آمد. به طور کلی این ویروس در مایعات بیولوژیک مانند خون، سرم، پلاسما، بزاق دهان، اشک، مایع منی، مایع آسیت و مایع مغزی نخاعی یافت می‌شود و تماس با این مایعات بیولوژیک می‌تواند موجب انتقال عفونت گردد (۵ و ۶).

درمان هپاتیت C به دلیل تعدد ژنوتیپ‌ها و زیر تیپ‌های ویروس پیچیده و دشوار است (۲). از داروهایی که در حال حاضر در دست مطالعه می‌باشند، می‌توان به مهارکننده‌های پروتئاز و مهارکننده‌های پلی‌مراز ویروس اشاره نمود که امیدهای زیادی را برای درمان هپاتیت C به ارمغان آورده‌اند. نکته‌شایان توجه در مورد این داروها، این است که مقاومت ویروس هپاتیت C به این داروها در اثر مصرف آنها مشاهده شده است. این امر به دلیل جهش و تغییرات آمینواسیدی در پروتئین‌های هدف مانند NS5B رخ می‌دهد.

NS5B یک RNA پلی‌مراز وابسته به RNA است که در پردازش ژنوم ویروس به منظور ایجاد رشته‌الگوی منفی و سپس رونویسی نسخه‌های دختری ژنوم دخالت دارد (۶). این آنزیم دارای دو جایگاه می‌باشد: یک جایگاه کاتالیتیک برای اتصال ترکیبات نوکلئوتیدی و چهار جایگاه دیگر برای تغییرات آلوستریک که ترکیبات غیرنوکلئوتیدی می‌توانند به آنها متصل شوند. ساختار RNA پلی‌مراز وابسته به RNA در میان تمام ژنوتیپ‌های این ویروس بسیار حفاظت شده است (۸). تاکنون

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ناحیه 5'-UTR ژنوم HCV و ژن NS5B

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر یافته (bp)	منبع
5'-UTR	F(5'- CAAGCACCTATCAGGCAGT-3') R(5'- AGCGTCTAGCCATGGCGT-3')	۲۳۴	۹
NS5B	F(5'- GATACCCGCTGTTTIGACTC-3') R(5'- CTGGTCATAGCTCCGTGAA-3')	۳۷۷	۱۰



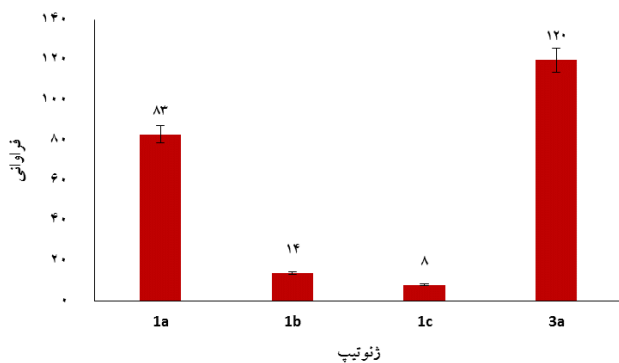
شکل ۱. نتایج مربوط به محصول RT-PCR ژن HCV. M. مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) نمونه مثبت ویروس هپاتیت C، ستون ۲) کنترل مثبت، ستون ۳) کنترل منفی.

(۱۰).

یافته‌ها

الف) نتایج ردیابی ژنوم ویروس HCV و ژنوتایپینگ: در این مطالعه شناسایی مولکولی ویروس هپاتیت C با تولید قطعاتی به طول ۲۳۴ جفت باز در واکنش PCR انجام گرفت. از مقایسه توالی نوکلئوتیدی محصولات واکنش با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی، ۴ نوع ژنوتیپ 1a، 1b، 1c و 3a در نمونه‌ها شناسایی گردید. نتایج حاصل از تکثیر این ژن در شکل ۱ و فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف این ویروس در نمودار ۱ نشان داده شده است.

ب) تکثیر ژن NS5B و تعیین توالی آن: در ۱۰ نمونه از ویروس هپاتیت C با ژنوتیپ 1a از تکثیر ژن NS5B، محصولی با طول ۳۷۷ جفت باز ایجاد شد. نتایج حاصل از تکثیر این ژن در



نمودار ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف ویروس HCV

ژنوم HCV استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش نهایی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۳ میکرولیتر cDNA الگو، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) ۱۸ میکرولیتر از ماستر میکس PCR (Golden Double Helix، ایتالیا) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر (PCR Analytik، Jena، آلمان) در شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۶ °C به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه. در نهایت محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردیدند و با دستگاه UV trans illuminator مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نتایج حاصل به کمک نرم افزار آنالین بلاست (BLAST)، مورد بررسی قرار گرفت (۹).

د) تکثیر ژن NS5B و بررسی جهش‌های آن: تکثیر ژن NS5B در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر همانند مرحله قبل انجام شد با این تفاوت که دمای اتصال پرایمر در این مرحله، ۶۵ °C به مدت ۶۰ ثانیه بود. در نهایت محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV trans illuminator مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. نتایج حاصل به کمک نرم افزار آنالین بلاست (BLAST)، نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار کروماتس (Chromas) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مورد مطالعه نسبت به نمونه استاندارد موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت

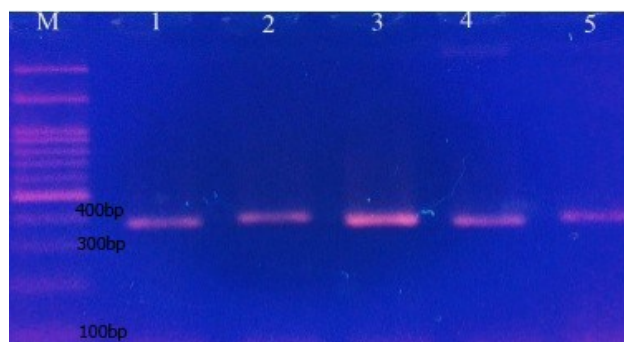
هپاتیت C می‌گذرد، اما گزینه‌های درمانی آن هنوز محدود هستند (۱۱). بخشی از این محدودیت به دلیل جهش‌های متعدد در ساختار ژنوم ویروس به ویژه در ژن NS5B که یک RNA پلی‌مراز وابسته به RNA موثر در پردازش ژنوم ویروس به منظور ایجاد رشته‌الگوی منفی و رونویسی نسخه‌های دختری ژنوم می‌باشد (۷).

در مطالعه حاضر بیش‌ترین ژنوتیپ‌های مشاهده شده به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های 1a، 3a، 1b و 1c بودند که با مطالعه حسینی مقدم (Hosseini Moghaddam) و همکاران در تهران، ورما (Verma) و همکاران در شمال هند و حق شناس (Haghshenas) و همکاران در قائمشهر کاملاً هم‌خوانی دارد (۱۴-۱۲).

اما در مطالعات دیگری که توسط صمیمی راد (Samimi Rad) و همکاران، مخلوق (Makhloogh) و همکاران و حجازی (Hejazi) و همکاران انجام گرفت، ژنوتیپ 1a دارای بیشترین فراوانی بود که با مطالعه حاضر متفاوت است (۱۷-۱۵). بر این اساس میزان شیوع ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت C در مناطق مختلف، بسته به شرایط اقلیمی و ژنتیکی آن منطقه متفاوت است. بروز مقاومت نسبت به داروهای مختلف در ویروس هپاتیت C به دلیل جهش در ژن‌های مختلف این ویروس مانند NS3، NS5A و NS5B رخ می‌دهد. از جمله شایع‌ترین این جهش‌ها می‌توان به D310N، S282T، S326G، T329I و Q309R اشاره نمود.

جاسپ (Jaspe) و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی شیوع جهش‌های آمینواسیدی در نواحی مرکزی و NS5B ویروس هپاتیت C در جدایه‌های ونزوئلایی پرداختند. نتایج آنها نشان داد که جهش Q309R در تمام ژنوتیپ‌ها به جز ژنوتیپ ۲ مشاهده می‌شود (۱۸).

کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۱۴، جهش‌هایی که به طور طبیعی در ناحیه غیرساختاری ویروس هپاتیت C در بیماران کره‌ای آلوده به HCV مزمن که تحت درمان بودند، مورد بررسی قرار دادند (۱۹). در سال ۲۰۱۱، کاستیلو (Castilho) و



شکل ۲. نتایج مربوط به محصول PCR ژن NS5B (M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱ تا ۵) محصول PCR با طول ۳۷۷ جفت باز.

شکل ۲ نشان داده شده است. از آنالیز توالی نوکلئوتیدی این نمونه‌ها در ۵ مورد دو تا چهار جهش بدمعنی شناسایی گردید (شکل‌های ۳-۵).

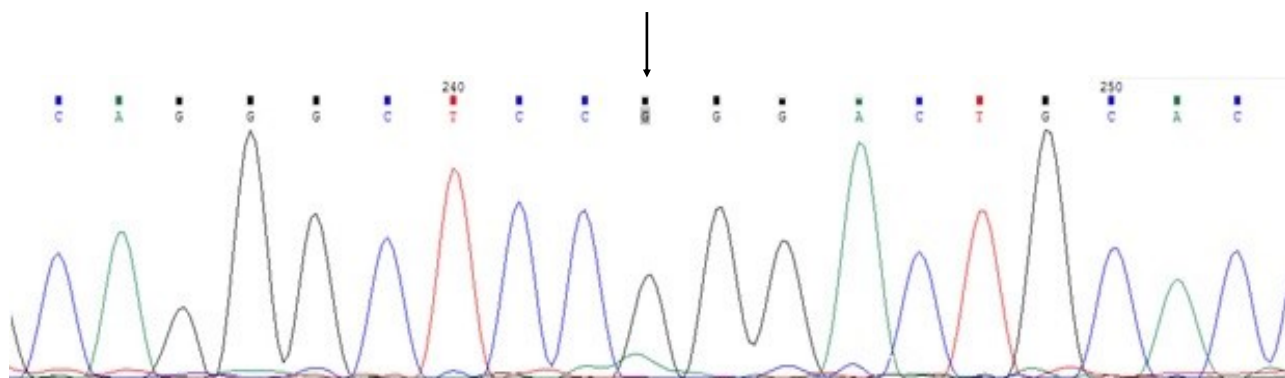
این جهش‌ها موجب تغییرات آمینواسیدی Q309، A327، S254، K304، N307، R250 و A334 گردیدند. همچنین تمام نمونه‌های مورد بررسی دارای یک یا چند جهش خاموش نیز بودند. به طوری که در مجموع جدایه‌ها ۳۳ نوع جهش خاموش شناسایی شد. فهرست جهش‌های بدمعنی و تغییرات آمینواسیدی مشاهده شده در نمونه‌های توالی‌یابی شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

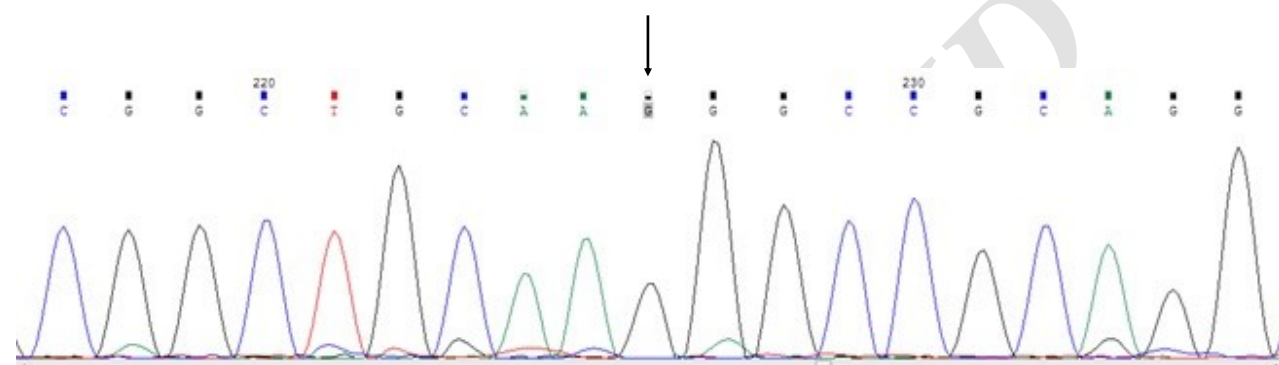
ویروس هپاتیت C یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری‌های کبدی می‌باشد. بیش از دو دهه از زمان کشف ویروس

جدول ۲. جهش‌های بدمعنی مشاهده شده در نمونه‌های توالی‌یابی شده.

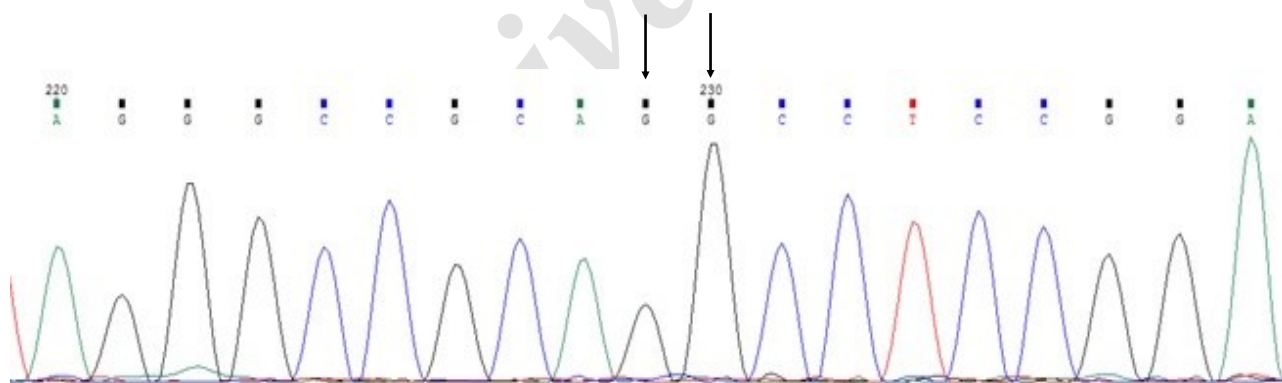
تعداد نمونه	کدون	تغییر بازی	تغییر آمینواسیدی
۲	۳۰۹	CAG>CGG	Gln>Arg Q309R
	۳۲۷	GCG>CAG	Ala>Gln A327Q
۱	۳۰۴	AAG>AGG	Lys>Arg K304R
	۳۰۷	AAC>GGC	Asn>Gly N307G
	۲۵۴	TCC>ACC	Ser>Thr S254T
۱	۳۰۴	AAG>AGG	Lys>Arg K304R
	۳۰۷	AAC>GGC	Asn>Gly N307G
	۲۵۰	AGG>AAG	Arg>Lys R250K
۱	۳۰۴	AAG>AGG	Lys>Arg K304R
	۳۰۷	AAC>GGC	Asn>Gly N307G
	۳۳۴	GCA>ACA	Ala>Thr A334T



شکل ۳: الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۳۰۹ به G: با تغییر کدون CAG>CGG و تغییر آمینواسیدی Q309R.



شکل ۴: الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۳۰۴ به G: با تغییر کدون AAG>AGG و تغییر آمینواسیدی K304R.



شکل ۵: الکتروفوروگرام مربوط به تغییر بازهای Aa در موقعیت ۳۰۷ به GG: با تغییر کدون AAC>GGC و تغییر آمینواسیدی N307G.

در مطالعه ما نیز جهش شایع Q309R مشاهده شد. همچنین در نتیجه مشابهی در مطالعه حاضر نیز جهش‌های S282T، S326G و T329I در هیچ کدام از نمونه‌ها یافت نشد. پائولوچی (Paolucci) و همکاران در سال ۲۰۱۳ به مطالعه جهش‌های مقاومت به مهارکننده‌های ناحیه NS5B پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که در سویه‌های دارای ژنوتیپ 1a، جهش‌های مقاومت در NS5B از

همکاران به بررسی ارتباط واریانت‌های *NS5B* در ویروس هپاتیت C با مقاومت به داروهای ضدویروسی جدید در بیماران غیرخویشاوند پرداختند. بر اساس نتایج تحقیق آنها، شایع‌ترین جهش، Q309R بود. بر اساس این مطالعه، جهش Q309R شایع‌ترین جهش در *NS5B* به ویژه در بیماران آسیایی است. در این مطالعه، جهش‌های S282T، S326G یا T329I در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نگردید (۱۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به متفاوت بودن پاسخ به درمان ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت C، ژنوتایپینگ نقش مهمی در مدیریت درمان هپاتیت ناشی از این ویروس دارد. ژنوتیپ 1a از شایع ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در گیلان می‌باشد. شناسایی جهش‌ها یا پلی مورفیسم مرتبط با مقاومت در این ژنوتیپ ویروس هپاتیت C می‌تواند در بهینه‌سازی درمان مفید باشد. همچنین این داده‌ها در تعیین کارایی داروها در درمان هپاتیت C بسیار حائز اهمیت هستند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری در اجرای این پروژه کمال امتنان را دارند.

جمله Y452H و Y448H، M426L، V321I نیز در ۱۲/۵٪ بیماران وجود دارد. این جهش‌ها C316N، V321I، L159F، Y452H، M426L و R465G، V499A بودند (۲۰).

اگرچه هیچ‌یک از جهش‌های این مطالعه در تحقیق حاضر مشاهده نشد، اما علاوه بر مشاهده جهش شایع Q309R، چندین جهش بد معنی دیگر نیز دیده شد. مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که جانشینی‌های آمینواسیدی در NS5B نقش مهمی در عملکرد ویروس دارند.

در این مطالعه، جهش مقاومت شایع Q309R در دو نمونه مشاهده شد. همچنین جهش‌های بد معنی دیگری مانند S254T، K304R، R250K مشاهده شد که در مطالعات دیگر گزارش شده بودند. بنابراین به منظور بررسی اهمیت جهش‌های جدید، باید مطالعات گسترده‌تری به عمل آید.

References

1. Von Delft A, Donnison TA, Lourenço J, Hutchings C, Mullarkey CE, Brown A, Pybus OG, Klenerman P, Chinnakannan S, Barnes E. The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes. *Vaccine*. 2018; 36(2): 313-321.
2. Chantratita W, Song KS, Gun Ho C, Pongthanapisith V, Thongbaipheth N, Wongtabtim G, Pasomsub E, Angkanavin K, Nimse SB, Sonawane MD, Warkad SD. 6 HCV genotyping 9G test and its comparison with VERSANT HCV genotype 2.0 assay (LiPA) for the hepatitis C virus genotyping. *J Virol Methods*. 2017; 239: 1-8.
3. Ali N, Allam H, May R, Sureban SM, Bronze MS, Bader T, Umar S, Anant S, Houchen CW. Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts. *J Virol*. 2011; 85(23): 12292-12303.
4. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015; 61(1): 77-87.
5. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *New Engl J Med*. 2001; 345(1): 41-52.
6. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and practice of infectious diseases. Elsevier Health Sci; 2014; 1: 1336-1356.
7. Ranjith-Kumar CT, Kao CC. Biochemical activities of the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatitis C viruses: Genomes and molecular biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience. 2006: 293-310.
8. Pockros PJ. New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection.

- Therap Adv Gastroenterol. 2010; 3(3): 191-202.
9. Motawi TM, Rizk SM, Shaker OG, Mokhtar OZ. MicroRNAs as predictor markers for response to interferon treatment of chronic hepatitis C genotype-4 in Egyptian patients. PloS one. 2015; 10(3): 1-12.
 10. Castilho MC, Martins AN, Horbach IS, Perez RD, Figueiredo FA, Pinto PD, Nabuco LC, Lima DB, Tanuri A, Porto LC, Júnior F. Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(8): 968-975.
 11. Huang T, Wang J, Cai YD, Yu H, Chou KC. Hepatitis C virus network based classification of hepatocellular cirrhosis and carcinoma. PLoS One. 2012; 7(4): e34460.
 12. Hosseini Moghaddam SM, Keyvani H, Kasiri H, Kazemeyni SM, Basiri A, Aghel N, Alavian SM. Distribution of hepatitis C virus genotypes among hemodialysis patients in Tehran: a multicenter study. J Med Virol. 2006; 78(5): 569-573.
 13. Verma V, Chakravarti A, Kar P. Genotypic characterization of hepatitis C virus and its significance in patients with chronic liver disease from Northern India. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61(4): 408-414.
 14. Haghshenas MR, Babamahmoodi F, Rafiei AR, Vahedi V. The correlation between HCV genotypes and liver damage in HCV patients. J Mazandaran Uni Med Sci. 2011; 21(85): 76-83.
 15. Samimi Rad K, Nategh R, Malekzadeh R, Norder H, Magnus L. Molecular epidemiology of hepatitis C virus in Iran as reflected by phylogenetic analysis of the NS5B region. J Med Virol. 2004; 74(2): 246-252.
 16. Makhloogh A, Aezinia N, Haghshenas MR, Tirgar-fakheri H, Maleki I, Taghvaei T. Comparison of Hepatitis C Virus Genotypes in Hemodialysis and Nonuremic Patients. Armaghane Danesh. 2010; 15(3): 283-292. [In Persian]
 17. Hejazi MS, Ghotaslou R, Farshdoosty Hagh M, Mohammadzadeh Sadigh Y. Genotyping of hepatitis C virus in northwest of Iran. Biotechnol. 2007; 6(3): 302-308.
 18. Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH. Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. Virol J. 2012; 9(1): 214.
 19. Kim DW, Lee SA, Kim H, Won YS, Kim BJ. Naturally occurring mutations in the nonstructural region 5B of hepatitis C virus (HCV) from treatment-naïve Korean patients chronically infected with HCV genotype 1b. PLOS One. 2014; 9(1): e87773.
 20. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Bruno R, Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients. Virol J. 2013; 10(1): 355.



Study of *NS5B* gene mutations in hepatitis C virus genotype 1a in Guilan Province

Leila Asadpour¹, Hamdollah Rahimi Dogahneh², Mahnaz Houshmand Rad²

¹Assistant Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

²M.Sc., Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Hepatitis C virus is the main cause of chronic hepatitis, resulting in a thousand deaths every year. NS5B protein is an RNA-dependent RNA polymerase that is encoded by the *NS5B* gene and involved in virus replication. One of the most effective drugs in the treatment of infections caused by this virus are NS5B protein inhibitors. The emergence of the strains resistant to these drugs is a major obstacle to the success of treatment. The aim of this study was to investigate possible mutations in the NS5B region of hepatitis C virus genotype 1a in Guilan province.

Materials & Methods: HCV genomic RNA was extracted from the plasma samples of 225 anti-HCV positive patients and its molecular identification and genotyping was carried out by RT-PCR and product Sequencing. Then, the *NS5B* gene was amplified in 10 strains with genotype 1a and subsequently sequenced to determine mutations in this region.

Results: Genotypes 3a (53.3%) and 1a (36.9%) were the most abundant genotypes identified in Guilan. According to sequencing results, out of 10 investigated genotype 1a strains, 5 strains showed 7 types of missense mutations in codons Q309, A327, S254, K304, N307, R250, and A334.

Conclusions: Genotype 1a is one of the common genotypes of hepatitis C virus in Guilan. Identifying mutations or polymorphisms associated with resistance in hepatitis C virus can be useful in optimizing the treatment and determining the efficacy of drugs in treating hepatitis C virus.

Keywords: Hepatitis C, Drug resistance, NS5B mutation.

Correspondence to: Leila Asadpour

Tel: +98 9113383860

E-mail: asadpour@iaurasht.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 11(4): 332-339.