تعیین ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در گروه‌های پر خطر (تالاسمی، همودیالیزی، معتادان تزریقی، هموفیلی) در شهرستان ساری

علیرضا رفیعی[۱]، زهرا حسینی خواه[۲]، محمدرضا حق شناس[۳]، سپیده طاهری*[۴]، مائده درزیانی عزیزی[۵]

۱، ۲، ۳ و ۵- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، صندوق پستی: ۴۸۱۷۵-۸۶۶

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحدلاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

(*عهده‌دار مکاتبات- sepide_taheri14@yahoo.com)

چکیده

ویروس هپاتیت C عامل اصلی بیماری عفونی بین معتادین تزریقی، بیماران تالاسمی، هموفیلی و همودیالیز است که به عنوان جمعیت در خطر پذیری بالای عفونت‌های هپاتیت C شناخته می‌شوند. ویروس هپاتیت C از طریق مصرف داروهای تزریقی یا در کشورهای کمتر توسعه یافته، از طریق تزریق محصولات خونی آلوده وکمتر از طریق والدین گسترش می‌یابد. تعیین ژنوتایپ HCV به لحاظ کیلنیکی ارزشمند است، زیرا اطلاعات مهمی فراهم می‌کند که می‌تواند برای تعیین نوع و دوره درمان و پیش‌بینی نتیجه به کار رود. این مطالعه برای تهیه داده‌های اپیدمیولوژی (همه‌گیرشناسی) بر روی ژنوتایپ ویروس هپاتیت C در بین گروه‌های پر خطر در استان مازندران در شهر ساری انجام شد. این مطالعه روی ۱۳۲ بیمار با عفونت ثابت شده هپاتیت C انجام شد. همه نمونه‌ها برای استخراج RNA، سنتز cDNA باترانس کریپتاز معکوس و PCR GENOTYPE آماده شدند. از پروتکل راهنما برای استخراج RNA استفاده شد. ژنوتیپ‌های HCV به وسیله کیت For PCR Amply sense HCV Genotype تعیین شده بودند. آنالیز ژنوتایپنگ تعیین کرد که نوع 3a (۷۱/۲ درصد) فراوان‌ترین نوع می‌باشد و پس از آن نوع 1b(۸/۳ درصد) و 1a (۸/۳ درصد) و انواع ترکیبی HCV (1a/1b) (۸/۳ درصد) و (3a/2) (۲/۳ درصد) و (1a/1b/ 3a) (۱/۵درصد) یافت شدند. هیچ زیر نوعی از ژنوتیپ نوع ۲ در این جمعیت وجود نداشت. نتایج ما در مقایسه با سایر گزارشات نشان می‌دهد که ژنوتایپ‌های 3a و 1 (1a,1b) در ساری شایع هستند که با اروپا، ایالات متحده و حتی برخی از بخش‌های آسیا متفاوت است. باید توجه شود که ژنوتیپ 3a در ایران بیشترین شیوع را دارد و این ژنوتیپ به درمان واکنش بیشتری نشان می‌دهد و پاسخ ویرولوژیکی بالایی به درمان کوتاه مدت، نسبت به ژنوتیپ ۴،۱ دارد. اما میزان عود در بیماران مبتلا به ژنوتیپ ۳ نسبت به کسانی که آلوده به ژنوتیپ ۲ هستند بیشتر است. علت شیوع بالای ژنوتیپ ۳ در ایران ممکن است به دلیل شرایط جغرافیایی یا ویژگی‌های نژادی و قومی باشد. فراوانی ژنوتیپ ۳ در ایران با بخش‌های مختلف هند و قسمت‌های جنوب غربی آسیا شباهت دارد. این شباهت احتمالاً بواسطه مجاورت جغرافیایی و تاریخچه‌ی طولانی مسافرت، تجارت و ارتباط بین افراد این منطقه است.

کلمات کلیدی: HCV ژنوتایپ، شیوع، تزریق خون، اپیدمی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

عفونت ویروس هپاتیت C (HCV) با مبتلا کردن تقریباً ۱۷۰ میلیون نفر به عنوان مشکل بهداشت جهانی در نظر گرفته می‌شود. میزان شیوع سرمی مثبت در کشورهای غربی و آمریکای شمالی تقریباً ۱ درصد، در برخی کشورهای مدیترانه‌ای و آسیایی ۳ تا ۴ درصد و در بخش‌هایی از آفریقای مرکزی ۱۰- ۲۰ درصد و در مصر ۱۹-۶۰ درصد است (۵). میزان ابتلا همچنین می‌تواند بین گروه‌های مختلف در یک کشور تغییر کند. HCV یک ویروس کوچک، غلاف دار، تک رشته‌ای، RNA مثبت با میزان بالای هتروژنیتی ژنتیک است (۱۹). ویروس‌های ایزوله شده به حداقل ۱۱ ژنوتایپ اصلی، بر مبنای تفاوت توالی نوکلئوتیدی از ۳۰ تا ۳۵ درصد طبقه‌بندی شده‌اند (۸). ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ و ۳ این ویروس در سراسر دنیا در گردش هستند، در حالی که سایر ژنوتیپ‌ها اساساً به حوزه‌های جغرافیایی خاصی محدود می‌شوند (۱۸). مدارک زیادی وجود دارد که بیماران مبتلا به ژنوتایپ‌های مختلف HCV مقاطع کلینیکی متفاوت، شدت بیماری کبدی و واکنش مختلفی نسبت به درمان آلفا - انترفرون دارند. برای اکثر بیماران مبتلا در مرحله حاد (۶ ماه پس از ابتلا) بعید به نظر می‌رسد که بیماری‌شان زود تشخیص داده شود. در حالی که برخی از افراد مبتلا، از بین رفتن خود بخودی بیماری را خواهند داشت. اکثر حاملین ویروس (۸۵- ۷۵٪) عفونت HCV شان به صورت مزمن تا مرحله مرگ همراه آن‌ها خواهد بود (۲۲). به دلیل طولانی بودن عفونت HCV بین دوره کمون و پیشرفت علایم، پیش‌بینی می‌شود که شیوع بیماری و هزینه‌های اجتماعی در ارتباط با HCV در دنیا به طور ثابت در طول سال‌های آینده افزایش یابد (۷). از آن‌جا که ابتلا به هپاتیت ویروسی از راه خون است، انتقال ویروس هپاتیت C از طریق تزریق خون در گذشته، هنوز یک نگرانی اصلی بهداشتی در این بیماران باقی مانده است. خطرپذیری انتقال HCV از طریق خون در برخی ازکشورهای کمتر توسعه یافته به دلیل کمبود منابع برای عملکرد مناسب نظارتی بر روی خون اهدایی به طور کامل از بیین نرفته است. قبل از ۱۹۹۲، بیماران هموفیلی فاکتورهای انعقادی را که پاتوژن‌های ویروسی آن‌ها به طور کامل غیرفعال نشده بود دریافت کردند. از دهه ۱۹۶۰ به بعد، بیماران هموفیلی برای درمان، فاکتور VII و IX دریافت کرده‌اند (۱۷). در سال‌های بعد معلوم شد که در ۹۸٪ موارد ویروس‌هایی نظیر ویروس نقص دستگاه ایمنی انسان HIV و ویروس هپاتیت C به دلیل تزریق محصولات خونی آلوده به این بیماران منتقل شده بود (۱۲). با بهبود بخشیدن محصولات خونی بیماران تالاسمی و هموفیلی و دیالیزی، حیات کلی آن‌ها بهبود یافته است، اما تا حدودی خطرپذیری وجود دارد که می‌تواند به عوامل متعددی نظیر تزریقات مکرر خون، عدم پیروی از اعمال کنترل عفونت در واحدهای دیالیز، انتقال از طریق دستگاه‌های دیالیز و تصفیه کننده خون (اولترافیلتراسیون) نسبت داده شود (۹).

سایر مسیرهای انتقال این ویروس، شامل جراحت‌های تصادفی (فرو رفتن سوزن آلوده) و انتقال عمودی (از مادر به جنین) انجام تزریق نا ایمن نظیر سوزن‌ها و سرنگ‌های آلوده مشترک، سوزن مشترک خال کوبی که در زندان رواج دارد، آمیزش حفاظت نشده و وسایل ریش تراشی مشترک می‌باشد(۶). از آنجا که در کشورهای توسعه یافته، محصولات خونی به عنوان یک منبع انتقال، اساسا از رده خارج شده‌اند،

Archive of SID

www.SID.ir

تمرکز اولیه شیوع HCV روی مصرف داروی تزریقی قرار گرفته است (۱۱). همچنین مصرف داروی تزریقی عامل اصلی ابتلا به HCV در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (۱). بنابراین، شناسایی ژنوتیپ‌های HCV، در گروه‌های مختلف با خطرپذیری بالا برای اهداف اپیدمیولوژی وکنترل بیماری حیاتی است (۲۳). از آن‌جا که هیچ واکسن و پیشگیری قبل از ابتلا برای HCV وجود ندارد، تمرکز روی اولین علایم شیوع، ذخیره خونی ایمن‌تر در جهان سوم، اعمال تزریقی ایمن در مراقبت بهداشتی و سایر مجموعه‌ها و کاهش تزریق در معتادین و مشاوره روانی بالینی با آن‌ها باید انجام شود (۴).

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری

این مطالعه توصیفی-کاربردی، با هدف تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C درجمعیت پر خطر (بیماران هموفیلی، تالاسمی، همودیالیزی و معتادان تزریقی) مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C انجام شد. نمونه‌گیری به روش پیاپی در فاصله تابستان سال ۱۳۸۹ انجام شد. در کل ۱۳۲ بیمار (۳۴ بیمار تالاسمی، ۳۱ بیمار دیالیزی، ۳۰ بیمار هموفیلی و ۳۷ معتاد تزریقی) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی بیماران دارای آنتی‌بادی ضد HCV بوده و از نظر HCV-RNA مثبت بودند (اطلاعات منتشر نشده) و از مراکز ترک اعتیاد (شهید زارع) – مرکز هموفیلی (درمانگاه هموفیلی) – مرکز تالاسمی (بیمارستان بوعلی) – مرکز دیالیزی (بیمارستان فاطمه زهرا) در شهرستان ساری در استان مازندران جمع‌آوری شدند. مشخصات بیماران شامل سن، طول مدت بیماری، جنس، شغل، داشتن عفونت همزمان با ویروس‌های HAV, HBV, HIV، داشتن روابط جنسی بی قید و شرط، سابقه داشتن تزریق خون مکرر و...، یافته‌های آزمایشگاهی آن‌ها ثبت شد و بعد از مشاوره آن‌ها و با کسب رضایت کامل، نمونه‌گیری انجام شد. از بیماران مورد مطالعه، ۵ سی سی خون در لوله‌های استریل حاوی ۶۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد و سپس لوله‌ها داخل فلاسک حاوی یخ قرار داده شدند و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج RNA از نمونه خون بیماران (RNA Extraction)

۱) در داخل میکروتیوپ ۱/۵*ml* ، ۱۰۰میکرولیتر از نمونه خون را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول RNX-plus (Cinnagen) سرد (به منظور لیزکردن سلول و استخراج RNA از ویروس‌های درون سلولی) مخلوط کرده. در این مرحله باید سلول‌ها کاملاً لیز شده و اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و کلیه محتویات سلول‌ها آزاد شود.

۲) ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم سرد به مخلوط اضافه کرده پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد (طبق پروتکل و بر اساس تجربه برای تفکیک بهتر)، نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰۰ rpm، ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. کلروفرم ۲ فاز ایجاد می‌کند: یک فاز آلی درپایین تیوپ و یک فاز آبی در بالا. فاز آلی حاوی پروتئین‌ها و ناخالصی‌ها ست و فاز آبی حاوی RNA مد نظر ماست (سنتز CDNA به صورت جنرال با استفاده از Random Hexamer بدست می‌آید و با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی

Archive of SID
www.SID.ir

هر تیپ به شناسایی وجود یا عدم وجود آن ژنوتیپ در نمونه پرداخته می‌شود).

۳) در این مرحله فاز آبی حاوی RNA به تیوپ جدید منتقل شد و هم حجم آن (۵۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانل اضافه شد. تیوپ‌ها را به آرامی تکان داده و در ۱۲۰۰۰۰ rpm، ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۴) مایع رویی را به طور کامل خارج کرده و رسوب با ۷۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵٪ شستشو داده شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد.

۵) تیوپ‌ها را در ترمو بلاک در دمای ۷۰-۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گذاشته تا اینکه اتانل خشک شود. سپس رسوب در ۳۵ میکرولیتر آب مقطر استریل (DNase, RNase free) حل شد و در نهایت به منظور بهتر حل شدن رسوب، در بن ماری با دمای ۶۰-۵۰ درجه انکوبه شد.

در میکروتیوپ، ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر پرایمر[1]، ۸ میکرولیتر آب مقطر و ۳ میکرولیتر RNA استخراج شده را مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموبلاک در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۶ میکرولیتر از محلول بافر RT[2] به مخلوط اضافه و کاملاً مخلوط شد (بافر RT، از مخلوط ۲ میکرولیتر از محلول dNTP 10 mM، ۴ میکرولیتر بافر RT فرمنتاز و ۱ میکرولیتر Riboluck[3] تهیه شد). بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۱میکرولیتر آنزیم RT[4] اضافه کرده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموبلاک قرار داده شد. و به این ترتیب CDNA سنتز شد.

تعیین مقدار DNA با نانو اسپکتو فتومتر UV

جذب DNA در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm در دستگاه نانواسپکتوفتومتر UV اندازه‌گیری شد و نسبت $\frac{260}{280}$ OD محاسبه شد. غلظت (Consenfration) از فرمول زیر محاسبه شد . C = OD26O × عکس رقت × ۵۰

روش انجام PCR

ژنوتایپ‌های ویروس هپاتیت C توسط کیت Amplysens HCV- genotype، با پرایمرهای خاص ژنوتایپ‌های 1a, 1b, 2,3a ویروس هپاتیت C تعیین شد. در این مطالعه از تکنیک Hot start - PCR استفاده شد که اساس آن بر جدا کردن فیزیکی مواد واکنش تا زمان رسیدن به دمای بالا می‌باشد. معمولاً ابتدا dNTP، پرایمرها، Mg^{+2} در میکروتیوپ ریخته می‌شود. طبق دستورالعمل کیت ۱۰ میکرولیتر از PCR-mix-2 (حاوی بافر و Taq DNA پلیمراز) به میکروتیوپ حاوی PCR-mix-1 (حاوی پرایمرهای خاص ژنوتایپ‌های 1a,1b و dNTPs) و یا به میکروتیوپ حاوی PCR-mix-1 (حاوی پرایمرهای خاص ژنوتایپ‌های 2,3a و dNTPs)، بر روی پارافین جامد که از قبل در میکروتیوب‌های آماده کیت وجود داشت، اضافه شد. سپس یک قطره روغن معدنی اضافه کرده و در نهایت ۱۰-۵ میکرولیتر از نمونه cDNA سنتز شده، درست در زیر روغن اضافه شد.

---

1 - Random Hexamer primer
2- 5x reaction M-Mulv RT buffer
3 - Riboluck RNase inhibitor
4 - Reverse transcriptase 200u/ml 1000u

Archive of SID

www.SID.ir

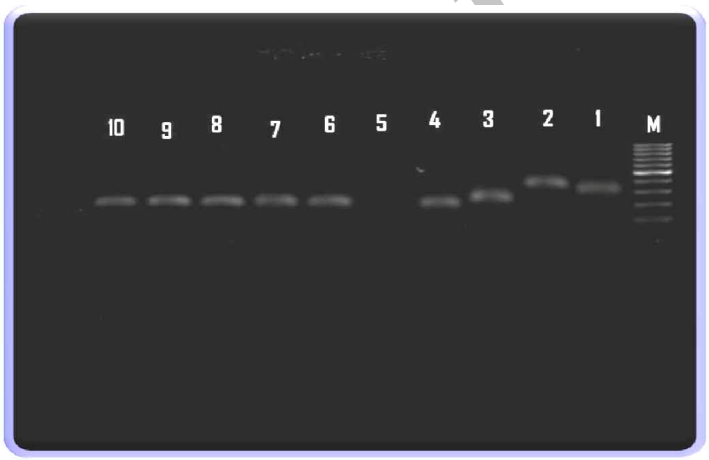
برنامه دمایی ترموسایکلر برای واکنش PCR به صورت زیر بود:

دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون (Denaturation) در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر (Annealing) در دمای ۶۸/۵°C به مدت ۱ دقیقه، گسترش (Extention) در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. با توجه به موقعیت هر باند و بر اساس موقعیت Ladder، با استفاده از نرم‌افزار مربوطه اندازه هر قطعه تعیین گردید.

طول قطعات DNA مورد انتظار برای ژنوتایپ 1a: 338bp، ژنوتایپ 1b: 395bp، ژنوتایپ 2: 286bp، ژنوتایپ 3a: 227bp بود.

روش انجام الکتروفرز

پس از اتمام PCR ۱۰میکرولیتر از محصول تکثیر یافته PCR با ۵ میکرولیتر از Loading buffer (ماده رنگی نشاندار) مخلوط گردید و به چاهک‌های ژل منتقل شد. الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت و در مدت زمان ۴۰-۳۰ دقیقه انجام شد.



نتایج

جدول ۱ نشان می‌دهد که در بین بیماران زن و مرد هموفیلی ۱۰۰ درصد بیماران داری ژنوتایپ 3a بوده‌اند. در بین زنان مبتلا بین معتادان تزریقی، ۲۵درصد ژنوتایپ 1b، ۲۵ درصد ژنوتایپ 3a و۵۰ درصد ژنوتایپ میکس شده 1a/1b مشاهده گردیده است.

بررسی نشان داد که ژنوتایپ‌های مشاهده شده در معتادان تزریقی مرد ۲۴/۲ درصد ژنوتایپ 1a، ۲۷/۳ درصد ژنوتایپ 1b، ۲۱/۲ درصد ژنوتایپ 3a بودند و مابقی معادل ۲۷/۳ درصد از بیماران ژنوتایپ 1a/1b داشته‌اند.

A. of SID

www.SID.ir

جدول۱: بررسی وجود ژنوتیپ‌های مختلف به تفکیک جنسیت و گروه بیماران

ژنوتیپ	جنسیت	گروه بیماران				کل بیماران
		هموفیل	تالاسمی	معتادان تزریقی	همودیالیزی	
		n(٪)	*n*(٪)	*n*(٪)	*n*(٪)	*n*(٪)
1a	مرد	۰(۰/۰)	۲(۱۱/۸)	۸(۲۴/۲)	۰(۰/۰)	۱۰(٪۱۱)
	زن	۰(۰/۰)	۱(۵/۹)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۲/۴)
1b	مرد	۰(۰/۰)	۱(۵/۹)	۹(۲۷/۲)	۰(۰/۰)	۱۰(٪۱۱)
	زن	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(٪۲۵)	۰(۰/۰)	۱(۲/۴)
3a	مرد	۲۸(٪ ۱۰۰)	۱۲(۷۰/۶)	۷(۱۲/۲)	۱۲(۹۲/۳)	۵۹(۶۴/۸))
	زن	۲(٪۱۰۰)	۱۴(۷۲/۴)	۱(٪۲۵)	۱۸(٪۱۰۰)	۳۵(۸۵/۴)
1a/1b	مرد	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۹(۲۷/۳)	۰(۰/۰)	۹(۹/۹)
	زن	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۲(٪۵۰)	۰(۰/۰)	۲(۴/۹)
1a/1b/3a	مرد	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۷/۷)	۱(۱/۱)
	زن	۰(۰/۰)	۱(۵/۹)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۲/۴)
2/3a	مرد	۰(۰/۰)	۲(۱۱/۸)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۲(۲/۲)
	زن	۰(۰/۰)	۱(۵/۹)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۲/۴)
آماره کااسکوار :۹۲/۹۲۴		درجه آزادی :۱۵		مقدار احتمال :کمتر از ۰/۰۰۰۱		

در بررسی بیماران هموفیلی و همودیالیزی زن ملاحظه گردید ۱۰۰ درصد بیماران دارای ژئوتیپ 3a بوده‌اند. و همین بررسی در بیماران همودیالیزی مرد نشان داد که ۹۲/۳ درصد ژنوتایپ 3a بوده و ۷/۷ درصد نیز دارای ژنوتایپ میکس شده 1a/1b/3a بوده‌اند.

در بررسی بیماران زن تالاسمی نیز ملاحظه گردید ۸۲/۴ درصد دارای ژنوتایپ 3a بوده‌اند همچنین در ۵/۹ در صد از بیماران زن تالاسمی ژنوتایپ 2/3a مشاهده شده است در ۵/۹ درصد از بیماران زن تالاسمی ژنوتایپ 1a نیز مشاهده شده است. بررسی بیماران تالاسمی مرد نشان داده که در ۱۱/۸ درصد از موارد ژنوتایپ 1a، ۵/۹ درصد دارای ژنوتایپ 1b، ۷۰/۶ درصد دارای ژنوتایپ 3a بوده‌اند و هم چنین در ۱۱/۸ در صد از این گروه از بیماران ژنوتایپ 2/3a مشاهده گردیده است آزمون کااسکوار نشان داد که در سطح اطمینان ۹۵ درصد جنسیت در نوع ژنوتیپ اثر نداشته است ولی گروه بیماران در نوع ژنوتیپ اثر داشته است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: بررسی وجود ژنوتیپ‌های مختلف در صورت وجود عفونت همزمان

ژنوتیپ	عفونت همزمان			کل بیماران دارای عفونت همزمان
	HIV $n(\%)$	HBV $n(\%)$	HIV/HBV $n(\%)$	$n(\%)$
1a	۱(٪۲۵)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۸/۳)
3a	۲(٪۵۰)	۷(٪۱۰۰)	۱(٪۱۰۰)	۱۰(۸۳/۳)
1b/1a	۱(٪۲۵)	(۰/۰)	۰(۰/۰)	۱(۸/۳)
آماره کااسکوار : ۴/۸۰۰		درجه آزادی :۴		مقدار احتمال: ۰/۳۰۸

جدول ۲ نشان می‌دهد که که در بیمارانی که عفونت همزمان به HIV داشته‌اند ۵۰ درصد ژنوتیپ 3a، ۲۵ درصد ژنوتیپ 1a و ۲۵ درصد ژنوتیپ 1a/1b مشاهده شده است. در بین بیمارانی که عفونت همزمان به HBV داشته‌اند ۱۰۰ درصد ژنوتیپ 3a مشاهده شده است و در ۱۰۰ درصد بیماران با عفونت HIV/HBV ژنوتیپ 3a مشاهده شده است و در حالت کلی برای کسانی که عفونت همزمان داشته‌اند ۸۳/۳ درصد ژنوتیپ 3a مشاهده شده است. بررسی آزمون کااسکوار نشان می‌دهد که نوع عفونت همزمان در نوع ژنوتیپ تأثیر ندارد.

جدول۳: بررسی وجود ژنوتیپ‌های مختلف به تفکیک طول مدت بیماری

ژنوتیپ	طول دوره بیماری				کل بیماران $n(\%)$
	زیر ۵ سال $n(\%)$	۵-۱۰ $n(\%)$	۱۰-۱۵ $n(\%)$	بیشتر از۱۵ $n(\%)$	
1a	۷(۱۴/۶)	۰(۰/۰)	۱(۵/۶)	۰(۰/۰)	۸(۷/۴)
1b	۶(۱۲/۵)	۰(۰/۰)	۱(۵/۶)	۰(۰/۰)	۷(۶/۵)
3a	۲۹(۶۰/۴)	۳۶(۹۲/۳)	۱۵(۸۳/۳)	۲(۶۶/۷)	۸۲(۷۵/۹)
1a/1b	۶(۱۲/۵)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۶(۵/۶)
1a/1b/3a	۰(۰/۰)	۱(۲/۶)	۱(۵/۶)	۰(۰/۰)	۲(۱/۹)
2/3a	۰(۰/۰)	۲(۵/۱)	۰(۰/۰)	۱(۳۳/۳)	۳(۲/۸)
آزمون کااسکوار (۳۷/۶۰۰)		درجه آزادی :۱۵		مقدار احتمال : ۰/۰۰۱	

جدول ۳ نشان می‌دهد در بیمارانی که طول بیماری شان کمتر از ۵ سال بوده ۶۰/۴ درصد دارای ژنوتیپ 3a بوده‌اند و در بین بیمارانی که طول مدت بیماری شان ۵ الی ۱۰ سال بوده ۹۲/۳ درصد دارای ژنوتیپ 3a بوده‌اند. در بین بیمارانی که بین ۱۰ الی ۱۵ سال سابقه بیماری داشته‌اند ۸۳/۳ درصد ژنوتیپ 3a مشاهده شده

Archive of SID

www.SID.ir

است. با این وجودبررسی آزمون کا اسکوار نشان داد که ظهور ژنوتیب‌های مختلف در طول مدت بیماری تأثیر دارد (مثلاً 1b به درمان سخت جواب می‌دهد و در زمان طولانی‌تری در بدن می‌ماند).

بحث

نتایج ما در هماهنگی با سایر گزارشات محققان دیگر در ایران که در پایین به ذکر آن‌ها می پردازیم، شیوع ژنوتیپ‌های 3a (۷۱/۲ درصد) و 1a (۸/۳ درصد) و ژنوتایپ 1b (۸/۳ درصد) و ژنوتایپ مختلط 1a/1b (۸/۳ درصد) و ژنوتایپ مختلط 1a/1b/3a (۵/۱ درصد) و ژنوتایپ مختلط 2/3a را در ساری ثابت کرده‌اند که متفاوت از اروپا، ایالات متحده و حتی بخش‌هایی از آسیاست. در مطالعه ما بر روی ۱۳۲ بیمار تحت بررسی بعضی از آن‌ها تحت درمان با داروهای ضد ویروس هپاتیت C بودند ولی بیشترآن‌ها به علت گرانی هزینه‌های درمان هنوز درمان را شروع نکرده بودند، تعدادی از آن‌ها به علت عوارض این داروها و همچنین به خاطر دریافت خون آلوده در طی چند سال گذشته هیچ تمایلی به درمان نداشتند، با توجه به این که 3a به درمان زود جواب می‌دهد ولی چون اکثر بیماران تحت بررسی درمان نداشتند می‌تواند خود علت شیوع آن در این نواحی باشد. تاکنون نوع ژنوتایپ‌های تعیین شده توسط محققین در ایران، مشابه بوده است. همگی آن‌ها بیشتر ژنوتایپ‌های 1a, 1b, 3a را در جمعیت بیماران مورد مطالعه خود شناسایی کردند اما تفاوت‌هایی از نظر فراوانی نوع ژنوتایپ‌های غالب در میان گروه‌های مختلف بیماران مشاهده می‌شود. در مطالعه اولیه از ایران که بر روی تعداد محدود بیماران مبتلا به هپاتیت C انجام شد، ژنوتایپ‌های غالب، 1a، 3a گزارش شد (۲۸).

۴ سال بعد مطالعه دیگری، بر روی بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت C در تهران و پنج شهر دیگر ایران انجام شد و به ترتیب از چپ به راست، ژنوتایپ‌های 1a, 3a, 1b غالب گزارش شدند (۲۱). در مطالعه امینی و همکارانش، نمونه‌های بیماران از ۶ ناحیه جغرافیایی متفاوت در ایران جمع‌آوری شده بود که ژنوتایپ‌های 3a و 1a غالب بود (۲۰). Hajia و همکارانش، برای تعیین ژنوتیپ، نمونه خون ۲۰۶ بیمار ایرانی مبتلا به HCV را که از بیش از ۳۰۰ آزمایشگاه در ۶ استان جمع‌آوری شده بودرا آنالیز کردند و ژنوتایپ 3a (۴۶/۶٪) و ژنوتایپ ۱ (شامل 1a، 1bبه ترتیب با ۲۵/۷۳٪ و ۱۷/۴۷٪) به عنوان ژنوتایپ‌های غالب معرفی شدند (۱۳). در کل نتیجه‌ی مطالعه ما، مشابه یافته‌های مطالعات قبلی از ایران است. ژنوتایپ غالب در این مطالعه، به ترتیب 3a (غالب در بیماران هموفیلی، تالاسمی و دیالیزی) و بعد از آن 1a/1b (غالب در معتادان تزریقی) بود. ژنوتایپ 3a در همه بیماران مورد مطالعه ما یافت شد.

در این مطالعه درمیان بیماران همو دیالیزی (n=۳۱)، تنها یک مورد عفونت همزمان با ژنوتایپ‌های 1a/1b/3a یافت شد و ما بقی ژنوتایپ 3a بود. در مطالعه داور پناه و همکارانش (۲۰۰۹) نیز ژنوتایپ 3a در میان بیماران همودیالیزی بسیار فراوان گزارش شد. در حالی که ژنوتایپ 1a در دیگر گروه‌ها (بیماران هموفیلی، تالاسمی) فراوان گزارش شد (۱۶).

ژنوتایپ 3a در گروه بیماران تالاسمی (n=۳۴) ما، غالب بود. در این گروه از بیماران عفونت مختلط با ژنوتایپ‌های 2/3a در۳ بیمار، عفونت مختلط با

Archive of SID

www.SID.ir

ژنوتایپ‌های ۱a/۱b/۳a در یک بیمار، ۱b در یک نفر و ۱a در ۳ بیمار یافت شد. یک تحقیق جدید برای بررسی ژنوتایپ‌های HCV در بیماران ایرانی نشان داد که ژنوتایپ ۱ و ۳ فراوان‌ترین نوع کشف شده در بیماران تالاسمی هستند (۲). همچنین یک گزارش از هند، غالبیت ژنوتیپ‌های ۳ و ۱ رادر بین بیماران تالاسمی نشان داد (۲۵). در گروه بیماران هموفیلی (n=۳۰)، تنها ژنوتایپ ۳a یافت شد. ژنوتایپ‌های دیگر و نیز هیچ عفونت ترکیبی در این گروه از بیماران یافت نشد. در حالی که داورپناه و همکارانش (۲۰۰۹)، ژنوتیپ ۱a را به عنوان شایع‌ترین نوع در سایر بیماران تالاسمی و هموفیلی گزارش کردند. از آن‌جا که تمام گزارشات در ایران تأئید می‌کند که غالب‌ترین ژنوتیپ‌ها ۳ و ۱ هستند محققان باور دارند که الگوی ژنوتایپینگ بیماران ایرانی مشابه انگلستان و استرالیا، اسکاتلند، اروپا و کشورهای آمریکای شمالی است. اما توزیع این زیرگونه‌ها در هر منطقه و گروه متفاوت هستند، که احتمالاً نشانه آن است که سرایت HCV تا حدی از طریق دریافت خون یا محصولات خونی از این کشورها در گذشته رخ داده است. در مطالعه ما از میان ۳۷ معتاد تزریقی، ژنوتایپ غالب ۱a/۱b بود. ۱۰ نفر ۱b و ۱۱ نفر انواع ترکیبی ۱a/۱b و ۸ نفر ۱a و ۸ نفر ۳a بودند. داورپناه و همکارانش به ترتیب ژنوتایپ‌های ۱a، ۳a و ۱b را در هر دو گروه بیماران مبتلا به عفونت منفرد HCV و نیز عفونت همزمان HIV/HCV فراوان گزارش کردند. در این مطالعه ژنوتایپ ۱a در معتادان تزریقی با داشتن سابقه زندان و خالکوبی فراوان گزارش شد. در مطالعه‌ای از لبنان ماهفود و همکاران (۲۰۱۰)، ۱۰۶ معتاد تزریقی را معاینه کردند و ژنوتیپ نوع ۳ شایع بود (۵۷/۱٪) و پس از آن ژنوتیپ ۱ (۲۱٪) بود (۲۹). در حالی که در یافته‌های اولیه بین بیماران لبنانی ژنوتیپ ۴ نوع غالب بود (۴۷/۵٪) (۲۴). از آن‌جا که معتادان تزریقی در مراحل اولیه اعتیاد به HCV مبتلا می‌شوند و از طریق استفاده مکرر از سوزن مشترک در معرض بیشترین ابتلا به ویروس بودند، پیش بینی می‌شود که در معرض ابتلا به بیش از یک ژنوتیپ خواهند بود (۲۶). در اروپا و آمریکای شمالی، ژنوتایپ‌های ۱a , ۳a ژنوتایپ‌های مرتبط با اعتیاد به داروهای تزریقی معرفی شده‌اند. این موضوع بایافته اخیر احمدی پور و همکارانش از ایران همخوانی دارد (۱۴). و نیز میزان بالای عفونت مختلط با (۱a/۳a) در میان معتادان تزریقی شرکت کننده در مطالعه آن‌ها یافت شد. محققان مختلفی بیان کرده‌اند که ژنوتیپ ۳a در ارتباط با مصرف کنندگان داروی تزریقی است (۳). نتیجه تحقیق موریس و همکاران برای درک بهتر از مکانیزم‌های اپیدمی جهانی HCV3a در معتادین تزریقی مطرح می‌کند که ژنوتایپ ۳a ویروس هپاتیت C از آسیا سرچشمه می‌گیرد و به طور گسترده‌ای بین معتادان تزریقی و سایر گروه‌های بیمار در کشورهای صنعتی پراکنده شده است (۲۷). بر اساس تحقیقات اسمیت و همکاران در سال ۱۹۹۷ تعداد زیادی از زیر نوع ژنوتایپ HCV 3a جدا شده در آسیا، نشان دهنده‌ی وجود همه‌گیری ژنوتیپ ۳a در جمعیت‌های آسیایی در چندین کشور است. بر مبنای تحقیقات پایبوس و همکاران (۲۰۰۵) روش‌های مولکولی بر مبنای تئوری پیوسته نشان می‌دهد که دوره رشد همه‌گیری HCV3a در طول چند دهه اول قرن بیستم، تقریباً همزمان با همه‌گیری HCV1a آغاز شد. شیوع HCV3a در مصرف کنندگان داروی تزریقی بیان می‌دارد که HCV3a از یک مبدا مشترک از

Archive of SID

www.SID.ir

طریق یک همه‌گیری جهانی که به سرعت بین جوامع مصرف کننده دارو گسترش می‌یابد منتقل شده است. این نشان می‌دهد که انتقال HCV3a اغلب بین جوامع مصرف کننده داروی تزریقی از مناطق مختلف جغرافیایی و احتمالاً به طور اساسی از طریق سوزن یا سرنگ مشترک رخ می‌دهد (۲۷). در ایران، ژنوتیپ ۲ به ندرت کشف شده یا اصلاً کشف نشده بود. ۳ بیمار از ۳۱ بیمار تالاسمی در مطالعه ما مبتلا به ژنوتیپ ۲ یافت شده بودند. این تعداد معدود نوع ۲ با نوع ۳a ترکیب شده بودند (۲/۳a). ما در سایر گروه‌ها (همودیالیز، هموفیلی) هیچ ژنوتیپ ۲ دیگری نداشتیم. این در تقابل با فراوانی بالای ژنوتیپ ۲ در بیماران همودیالیز و بیماران غیر مبتلا به اورمی (اوره بالای خون) در لبنان، عربستان و اروپای جنوبی است که نوع ۲ نوع اصلی در آن‌جا است. حجازی و عمرانی (۲۰۰۷) در شمال غربی ایران زیر نوع ۲a (در ۷/۱٪)، ۲b (در ۲۱/۹٪) و ۲*a*/*C* (در ۱۱/۹٪) در بیمارا نشان یافتند (۱۰و۱۵). آیا این تفاوت به دلیل تفاوت جغرافیایی یا قومی بیماران مطالعه شده است؟ یا به دلیل روش‌های متفاوت به کار رفته برای ژنوتایپینگ HCV؟ ایران کشور پهناوری با جمعیتی از ویژگی‌های قومی گوناگون است. بنابراین پیش بینی می‌شود که یک تنوع گسترده در فراوانی‌های ژنوتایپ‌های ویروس هپاتیت *C* رخ دهد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ... جهت حمایت مالی از این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

1. Alavian, S. M. and Fallahian, F., 2009. Epidemiology of Hepatitis C in Iran and the World Shiraz E Medical Journal. 10(4).
2. Alavian, S. M., Miri, S. M., Keshvari, M., Karimi, P., and et al., 2009. Distribution of hepatitis C virus genotype in Iranian multiply transfused patients with thalassemia. Transfusion Today. 49(10): p. 2195-9.
3. Bourliere, M. B. J., Rotily, M., Guagliardo, V., Portal, I., Lecomte, L., Benali, S. and et al., 2002. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France evidence in intravenous drug users. J Viral Hepat. 9: p. 62-70.
4. Colin W Shepard, Lyn Finelli, Miriam J Alter, 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis. 5: p. 558–67.
5. Darwish, M.A. F.R. Darwish, N. Shouman, A. Gadallah, M. El- Sharkawy, MS. Edelman, R. et al., 2001. Hepatitis C and cirrhotic liver disease in the Nile delta of Egipt: a community-based study. Am J Trop Med Hyg. 64: p. 147-53.
6. Driesel, G. W.D. Stark, K. Baumgarten, R. Sucker, U. Schreier, E., 1994. Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. Arch Virol, 139(3-4): p. 379-88.
7. Haydon, E., Krajden, M., Hepatitis C Virus (HCV) infection and illicit drug use. Canadian Centre on Substance Abuse (CCSA).
8. Farci, P. A., Shimoda, A., Coiana, G., Diaz, G., Peddis, J. C., Melpolder, A., Strazzera, D. Y., Chien, S. J., Munoz, A., Balestrieri, R. H., Purcell, H. J., Alter., 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. Science. 288: p. 339-344.
9. Griveas, I. G. G., Visvardis, G. and et al., 2007. Acute hepatitis C in patients receiving hemodialysis. Ren Fail. 29: p. 731–6.
10. Hejazi, M. S. G. R. Hagh, M. F. et al., 2007. Genotyping of Hepatitis C Virus in Northwest of Iran. Biotechnology. 6(3): p. 302-8.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Kamal, S. M., 2008. Acute Hepatitis C: A Systematic Review. Am J Gastroenterol (103): p. 1283–1297.
12. Mauser-Bunschoten, EP. B.D. van Drimmelen, A. A. Roosendaal, G. Cuypers, HT. Reesink, HW. et al., 1995. Hepatitis C infection and viremia in Dutch hemophilia patients. J.Med.Virol, 45: p. 241-46.
13. Hajia, M. and Khedma, H. T., 2010. Shahrokh, N. Farzanehkhah, M. Ghorish, SM. Biglari,S.etal.: A Sarafnejad Genotyping Pattern among Iranian HCV Positive Patients. Iranian J Publ Health. 39(2): p. 39-44.
14. Ahmadi Pour, M. H., Sabahi, F. and Alavian, S. M., 2006. Determination of HCV Genotypes, in Iran by PCR-RFLP. Iranian J Publ Health. 35(4): p. 54-61.
15. Omrani, M. D., 2009. Hepatitis c virus genotyping by melting curve analysis in west azerbaijan, northwest of IRAN. Hepatitis Monthly. 9(2): p. 133-136.
16. Davarpanah, M. A., Bagheri, K., Lankarani, D., Mehrabani, A., Behzad-Behbahani, A., Serat, M. and et al., 2009. Hepatitis C virus genotypes in shiraz, southern Iran. Hepatitis Monthly. 9(2): p. 122-127.
17. Nilsson, I. M., Lofqvist, T., Pettersson, H., 1992. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. J. Intern. Med, 232: p. 25-32.
18. Nunez, M., Soriano, V., 2005. Hepatitis C virus genotypes and disease progression in HIV/HCV-coinfected patients. J Infect Dis. 191(1):1-3.
19. P. Simmonds., 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. J Gen Virol (85): p. 3173-3188.
20. Amini, S., Alavian, S. M., Joulaie, M., Ahmadipour, M. H., 2009. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Iran:A Population-Based Study. Hepatitis Monthly. 9(2): p. 95-102.
21. Samimi-Rad, K., Nategh, R., Malekzadeh, R., Norder, H., Magnius, L., 2004. Molecular epidemiology of hepatitis C virus in Iran as reflected by phylogenetic analysis of the NS5B region. J Med Virol; 74(2): 246-52.
22. Seeff, L. B., 1997. Natural history of hepatitis C. Hepatology, 1997. 26(Suppl 1): p. 21S-28S.
23. Hosseini-Moghaddam, S. M. M., Kasir, H., Kazemeyni, S. M., Basiri, A., Aghel, N. and Alavian, S. M., 2006. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes Among Hemodialysis Patients in Tehran— A Multicenter Study J. Med. Virol. 78: p. 569–573.
24. Sharara, A. R. S., Ramlawi, F., Eid-Fares, J., Klayme, S. and Naman, R., 2007. Genotypes of hepatitis C virus (HCV) among positive Lebanese patients: comparison of data with that from other Middle Eastern countries. Epidemiology and Infection. 135: p. 427-432
25. Siagris, D. G. N., Christofidou, M. and et al. 2004. Virological, immunological and histological aspects in adult beta thalassemic patients with chronic hepatitis C virus infection. Liver Int. 24(3): p. 204-9.
26. Silini, E. B. F., Cividini, A., Cerino, A., Maccabruni, A., Tinelli, C., Bruno, S., Bellobuono, A. and Mondelli, M., 1995. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. J Hepat. 22: p. 691-695.
27. Morice, Y., Beaucourt, S., Barbotte, L., DeGendt, S., Goncales, F. L., Butterworth, L. and et al., 2006. Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus Subtype 3a in Injecting Drug Users. J. Med. Virol. 78: p. 1296–1303.
28. Zali, M. R., Raoufi, M. and Nowroozi, M., 2000. Hepatitis C virus genotypes in the Islamic Republic of Iran:Apreliminary study. East Mediterr Health J. 6(372–377).
29. Mahfoud, Z., Kreidieh, K., Shamra, S. and Ramia, S., 2010. Distribution of hepatitis C virus genotypes among injecting drug users in Lebanon. 7(96).

Archive of SID

www.SID.ir