خون
دوره ۶ شماره ۴ زمستان ۸۸ (۲۵۶-۲۴۸)
مقاله پژوهشی

شیوع ژنوتیپ ویروس هپاتیت B با روش تعیین توالی در اهداکنندگان خون کرمان، اصفهان و یزد

زهره شریفی[۱]، احمد قره‌باغیان[۲]، مژگان نوروزی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

هپاتیت B یکی از عمده‌ترین بیماری‌هایی است که می‌تواند از طریق خون و فرآورده‌های خونی منتقل شود. اهمیت بالینی ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B و ارتباط آن با موتاسیون‌ها تشخیص داده شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی حضور و میزان شیوع ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B در میان اهداکنندگان خون مراکز انتقال خون کرمان، اصفهان و یزد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، سرم ۱۲۰ نفر از اهداکنندگان خون که از نظر حضور آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBs Ag) با روش الایزا مثبت تشخیص داده شده بودند، به طور تصادفی ساده انتخاب شده و مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از استخراج DNA ویروس، سکانس ژن P به وسیله nested-PCR تکثیر و ژنوتیپ ویروس هپاتیت B با روش sequencing تعیین شد. توالی‌های به دست آمده و توالی‌های رفرانس به وسیله برنامه Clustal W مرتب شدند و درخت فیلوژنتیکی آن به وسیله روش Neighbor-joining (NJ) ترسیم گردید. آنالیز آماری با استفاده از آزمون فیشر و نرم افزار SPSS۱۱/۵ انجام شد.

یافته‌ها

از ۱۲۰ نمونه HBsAg مثبت، ۶۹ نمونه(۵۷/۵٪ با فاصله اطمینان ۶۶/۳۴٪ - ۴۸/۶۵٪) که با روش nested-PCR مثبت بودند، بر روی نمونه‌های مثبت تعیین توالی شدند. ژنوتیپ D در میان اهداکنندگان داوطلب خون آلوده به ویروس هپاتیتB ۱۰۰٪ تعیین گردید.

نتیجه گیری

شیوع ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B در اهداکنندگان خون در این مطالعه ۱۰۰٪ بود. این نتیجه می‌تواند در تهیه کیت‌های تشخیصی ویروس هپاتیت B هم چنین تهیه پانل‌های کنترل کیفی جهت ارزیابی روش‌های تشخیصی ویروس مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت B ، اهداکنندگان خون، ژنوتیپ

تاریخ دریافت : ۸۷/۱۲/ ۴
تاریخ پذیرش : ۸۸/ ۷/۱۱

۱ـ PhD ویروس‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هپاتیت B یکی از مشکلات سلامت عمومی در جهان می‌باشد. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، حدود ۲ بیلیون نفر در سراسر جهان با ویروس هپاتیت B آلوده شده‌اند و حدود ۳۵۰ میلیون نفر عفونت‌های مزمن دارند. سالانه ۴ میلیون هپاتیت بالینی حاد جدید روی می‌دهد و یک میلیون ناقل هر سال از هپاتیت فعال مزمن، سیروز یا سرطان کبدی اولیه می‌میرند(۱). ویروس هپاتیت B یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده هپاتیت حاد، مزمن و سرطان کبد در آسیا، آفریقا و کشورهای اروپای جنوبی می‌باشد. ژنوم ویروس هپاتیت B ، DNA دو رشته‌ای است که به طور کامل حلقوی نمی‌باشد و دارای ۴ فریم خواندنی(ORF)C,S,X,P می‌باشد(۲). چون این ویروس می‌تواند از طریق خون و فرآورده‌های آن منتقل شود، به آن هپاتیت سرمی نیز می‌گویند. راه‌های دیگر انتقال آن از مادر به جنین، تماس جنسی، تماس با سر سوزن و سرنگ آلوده به خصوص در معتادین تزریقی است. آلودگی به ویروس هپاتیت B به سه حالت متفاوت عفونت حاد، عفونت مزمن و ناقلین بی‌علامت دیده می‌شود. فرم مزمن هپاتیت B می‌تواند منجر به سرطان سلول‌های کبد گردد(۳). در سال ۱۹۸۸ اوکاموتو و همکاران برای اولین بار ۴ ژنوتیپ A-D را بر اساس انشعاب ۸ درصدی یا بیشتر ژنوم کامل تعیین کردند(۴). در سال ۱۹۹۲ ، نوردر و همکاران ژن S ویروس هپاتیت B را که قبلاً توسط اوکاموتو طبقه‌بندی شده بود مورد مقایسه قرار دادند و آن‌ها نشان دادند که کمترین تفاوت‌های توالی ژن S میان ژنوم‌ها ۴/۱٪ می‌باشد(۵). ژنوتیپ‌های جدید F و E با استفاده از تفاوت‌های حداقل ۴ درصدی در سطح ژن S تعیین شدند. سپس ژنوتیپ‌های G و H از کشورهای کالیفرنیا و آمریکای مرکزی گزارش داده شدند، بنابراین کلاً ۸ ژنوتیپ HBV تاکنون مشخص شده‌اند(۶).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تصویر بالینی، پیش‌آگهی دراز مدت بیماری و پاسخ به درمان به ژنوتیپی بستگی دارد که بیمار به آن آلوده می‌شود(۷). هم چنین ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B از توزیع جغرافیایی ویژه‌ای برخوردارند. ژنوتیپ A در آمریکای شمالی، اروپای شمالی، هند و آفریقا فراوان می‌باشد. ژنوتیپ‌های B و C در آسیا فراوان هستند و ژنوتیپ D در اروپای جنوبی، خاورمیانه، منطقه مدیترانه و هند یافت می‌شود. ژنوتیپ E در آفریقای غربی و جنوبی و ژنوتیپ F در آمریکای جنوبی و مرکزی فراوان می‌باشد. ژنوتیپ G در ایالات متحده آمریکا و اروپا و ژنوتیپ H در آمریکای مرکزی و کالیفرنیا فراوان است(۹، ۸).

دوره بالینی بیماری HBV به سن بیمار، پاسخ ایمنی، هم چنین سوشی که افراد را آلوده می‌کند وابسته است. کمتر از یک درصد عفونت حاد، منجر به هپاتیت مرگ‌آسا می‌شود(۱۰). ژنوتیپ C در بیماران سیروزی معمول است. ژنوتیپ A اغلب منجر به مزمن شدن بیماری می‌شود و اغلب در بیماران مزمن مشاهده می‌گردد. ژنوتیپ D در بیماران هپاتیتی مصرف‌کننده مواد مخدر تزریقی در غرب مشاهده شده است(۱۱). افراد مبتلا به ژنوتیپ C ، پاسخ کمتری به اینترفرون می‌دهند. پاسخ آنتی‌بادی علیه HBsAg و HBeAg منجر به تغییر ژنوتیپ افراد آلوده می‌شود(۱۲). الگوی توزیع جغرافیایی ژنوتیپ ویروس هپاتیت B نیز با افزایش مهاجرت‌ها در حال تغییر است(۱۳).

برای تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B ، از روش‌هایی مانند توالی‌یابی Line-PCR-RFLP، PCR Probe-Assay با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش الایزا استفاده می‌شود که در حال حاضر تعیین توالی دقیق‌ترین روش بوده و کشف و آشکارسازی جهش‌های شایع و غیر شایع با آن امکان‌پذیر است.

ژن انولپ(S) ویروس هپاتیتB به طور کامل با ژن پلی‌مراز هم‌پوشانی دارد، بنابراین ویروس‌هایی که بر اثر داروهای ضد ویروسی در ژن پلی‌مراز آن‌ها تغییراتی به وجود آید، ممکن است این تغییرات بر روی ژن S نیز تاثیر بگذارد و باعث کاهش اتصال anti-HBs به HBsAg شود. بعضی موتاسیون‌ها در ژن پلی‌مراز مرتبط به مقاومت به لامی وودین، ممکن است باعث کدون خاتمه زودرس در ژن S و در نتیجه عدم ترشح HBsAg شود. عدم شناسایی HBsAg در حضور HBV–DNA می‌تواند به دلیل موتاسیون در ژن پلی‌مراز باشد. به این دلایل، در این مطالعه ژن پلی‌مراز ویروس هپاتیت B مورد مطالعه قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

هدف از این مطالعه تعیین شیوع و ژنوتایپینگ ویروس هپاتیت B در اهداکنندگان خون پایگاه‌های کرمان، یزد و اصفهان بود.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده یک مطالعه مقطعی بود. نمونه‌ها از افرادی که جهت اهدای خون به سه پایگاه کرمان، یزد و اصفهان مراجعه کرده بودند و آزمایش آنان از نظر HBsAg مثبت بود، جمع‌آوری گردید. پس از فراخوان اهداکننده و خونگیری مجدد، نمونه‌هایی که از نظر anti-HCV و anti-HIV منفی بودند و HBsAg آن‌ها با آزمایش تاییدی مانند آزمایش خنثی‌کنندگی مثبت بودند به صورت تصادفی ساده جهت مطالعه انتخاب شدند.

نمونه‌های سرم ۱۲۰ اهداکننده خون جمع‌آوری و در دمای ۷۰ ºC- نگهداری شدند. جمعیت مورد مطالعه شامل ۹۵ مرد و ۲۵ زن در فاصله سنی بین ۶۵ – ۲۰ سال بودند. همه ۱۲۰ نمونه سرم با روش الایزا از نظر آنتی‌ژن سطحی ویروسHBsAg مثبت بودند.

جدول۱: مواد مورد استفاده در تهیه آمیزه PCR

مواد	مقدار	غلظت
بافر PCR	۲/۵ µL	۱۰ X
dNTP	۰/۵ µL	۱۰ mM
$MgCl_2$	۲/۵ µL	۲۵ mM
Taq پلی‌مراز	۰/۲ µL	۵ U
$d.H_2O$	۱۳/۳ µL	–
آغازگر F_1	۰/۵ µL	۱۰ µM
آغازگر R_1	۰/۵ µL	۱۰ µM

از کیت استخراج اسید نوکلئیک با خلوص بالای (High pure nucleic acid kit) رُوش برای استخراج HBV DNA استفاده شد. این کیت برای خالص‌سازی اسید نوکلئیک ویروس از سرم طراحی شده است و مطابق دستورالعمل کیت، مراحل آزمایش انجام شد. در آخرین مرحله اسیدهای نوکلئیک خالص شده به وسیله بافر تخلیص، باز یافت شدند.

پس از استخراج HBV DNA ، به منظور تولید انبوه ژنوم ویروس، از روش nested PCR استفاده شد. ۲۰ µL از آمیزه PCR به ۵ µL DNA استخراج شده افزوده شد.

در مرحله اول nested PCR ، از آغازگر F_1 که ۲۰ نوکلئوتید از ژنوم HBV در فواصل nt ۷۶–۵۶ با توالی 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3' بود و آغازگر R_1 که از ۲۱ نوکلئوتید از ژنوم کامل هپاتیت B در فواصل nt ۱۴۱۶–۱۳۹۵ و با توالی 5'- CGT CCC GCG ACA GGAT CCA GTT-3' تشکیل شده بود، استفاده شد که قطعه pb ۱۳۶۰ را ایجاد می‌کرد.

در مرحله دوم ۲۳ µL از آمیزه PCR ، به ۲ µL محصول مرحله اول PCR افزوده شد. در مرحله دوم nested PCR ، از آغازگرهای F_2 و R_2 دارای ۲۲ نوکلئوتید(۳۲۰nt – ۲۹۸) با توالی 5'-CYT GGC CWA AAT TCG CAG TCCC-3' و۲۲ نوکلئوتید (۹۹۷–۱۰۱۹nt) با توالی 5'-GCA AAN CCC AAA AGA CCA CAAT-3' از ژنوم کامل هپاتیت B به ترتیب استفاده شد که قطعه pb ۷۲۱ را ایجاد می‌کرد(جدول ۱).

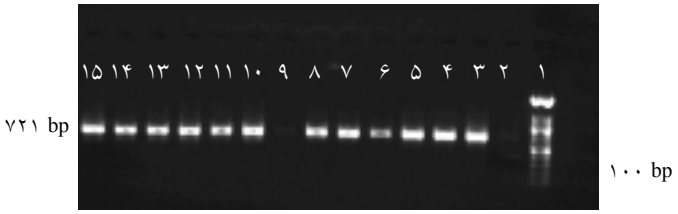
چرخه دمایی در مرحله اول nested PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. سپس واکنش طی ۳۵ سیکل تکثیر شامل دناتوره‌شدن به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در دمای۶۳ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت طویل شدن سنتز رشته‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ادامه یافت. چرخه دمایی در مرحله دوم nested PCR با همان سیکل دمایی مرحله اول انجام شد وفقط دمای اتصال آغازگرها به۵۶ درجه سانتی‌گراد تغییر یافت.

برای آشکارسازی نتایج مرحله دوم nested PCR از الکتروفورز روی ژل آگاروز و از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰pb در کنار نمونه‌ها استفاده شد.

۱۰۰ µL از محصول مرحله دوم PCR به وسیله کیت (High pure PCR product purification kit) رُوش تخلیص شد و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. آنالیز توالی با استفاده از ژن رفرانس و به کمک نرم

www.SID.ir
Archive of SID

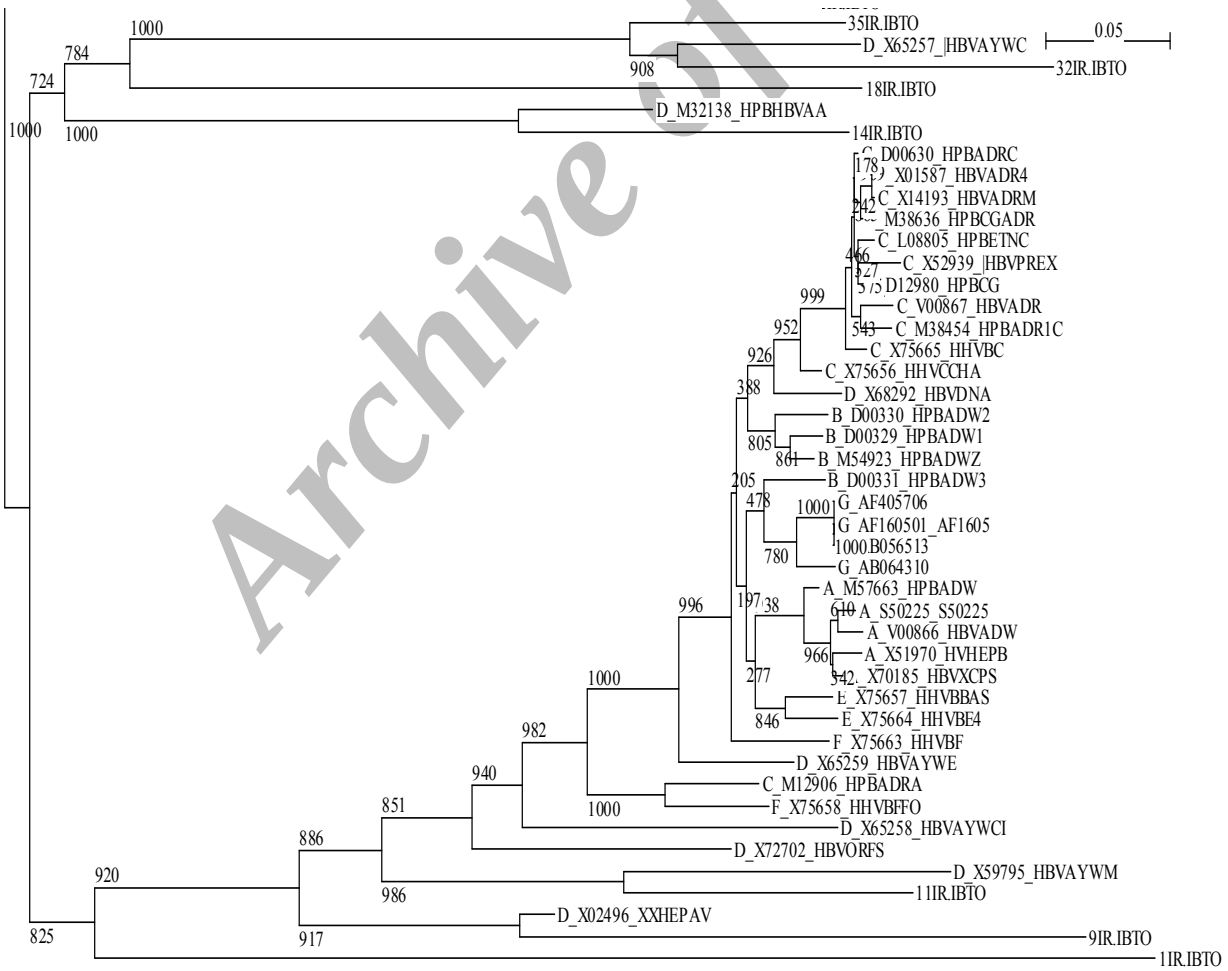
افزار CEQ8000 انجام شد. سپس با استفاده از نرم افزار CLUSTAL W، توالی به دست آمده با توالی‌های ژن رفرانس از ژنوتیپ‌های مختلف مرتب شد. به وسیله روش Neighbor-joining (NJ) ، درخت فیلوژنتیکی رسم شد و برای اعتبار درخت فیلوژنتیک، ۱۰۰۰ بار رسم درخت تکرار شد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول nested-PCR بر روی ناحیه ژن پلی‌مراز ویروس هپاتیت B با آغازگرهای اختصاصی بر روی ژل آگاروز ۱٪ . ستون شماره ۱ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی است(Roche). ستون شماره ۲، سرم کنترل منفی. ستون شماره ۳، سرم کنترل مثبت. ستون‌های شماره ۸ – ۴ و ستون‌های شماره ۱۵– ۱۰ سرم اهداکنندگانی است که HBV- DNA در آن‌ها یافت شده است. ستون شماره ۹ مربوط به سرم اهداکننده‌ای است که HBV-DNA در آن یافت نشده است.

یافته ها

۱۲۰ نمونه(۴۰ نمونه از هر استان) از اهدا کنندگان خون پایگاه‌های یزد، اصفهان و کرمان که از لحاظ سرولوژی HBsAg مثبت بودند، جهت استخراج DNA ویروسی استفاده شدند. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، بر روی ناحیه ژن پلی‌مراز ویروس هپاتیت B آزمایش



شکل ۲: ترسیم درخت فیلوژنتیکی. بررسی آنالیز فیلوژنتیک ایزوله‌های HBV اهداکنندگان خون نشان می‌دهد که تمامی ایزوله‌های این مطالعه با سایر ایزوله‌های ژنوتیپ D ، ویروس هپاتیت B که به عنوان ژن رفرانس از آن‌ها در این مطالعه استفاده شد، در یک گروه قرار می‌گیرند. برای صحت درخت فیلوژنتیکی رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شده که نتایج تکرار رسم درخت در کنار ایزوله‌ها نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

nested PCR انجام شد. پس از انجام nested PCR بـرروی نمونـه‌هـا، ۶۹ نمونـه(۵۷/۵٪ ، ۶۶/۳۴- ۴۸/۶۵ = ۹۵٪ CI) یعنی ۲۲ نمونه از استان اصفهان، ۲۸ نمونه از استان کرمـان و ۱۹ نمونـه از اسـتـان یـزد از نظـر HBV-DNA مثبـت شدند(شکل ۱).

۱۷ نمونه از هراستان جهت تعیین توالی انتخـاب شـدند. پس از تعیین توالی، ۳۰ نمونه(۱۰ نمونه از هـر اسـتان) کـه کروماتوگرام آن‌ها واضح بود و تعیین توالی آن‌ها به خـوبی انجام شـده بـود، آنـالیز شـدند. بررسـی آنـالیز فیلوژنتیـک ایـزوله‌هـای HBV اهـداکنندگان خون نشان داد که تمامی این مطالعه با سایر ایزوله‌های ژنوتیپ D ، ویروس هپاتیـت B که به عنوان ژن رفرانس از آن‌ها در این مطالعـه اسـتفاده شد، در یک گروه قرار مـی‌گیرنـد. بـرای صـحت درخـت فیلوژنتیکی، رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد(شکل ۲).

تمامی ۳۰ ایزوله با استفاده از نرم‌افزار BLAST دربانـک ژن مـورد بـــررسی قرار گرفتند. با استفاده از بالاترین نمره بر اساس جفت شدن(matching) بازها، تـوالی ایزولـه‌هـای HBV اهداکنندگان با ایزوله‌هـایی از کـشورهای بـلاروس، قزاقستان، ازبکستان، هند و چـین بـه طـور نزدیکـی یعنـی حدود ۹۹٪-۹۸٪ از نظر توالی نوکلئوتیدها شباهت داشـتند و در گروه ژنوتیپ D ، ساپ ژنوتیپ D1 قرار گرفتند.

بحث

این تحقیق اولین مطالعه در ایران است که جهت تعیـین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در جمعیت اهداکننـدگان خـون پایگاه‌های کرمان، اصـفهان و یـزد بـه روش تعیـین تـوالی (sequencing) بر روی ژن پلی‌مراز ویروس هپاتیت B انجام شده است. عفونت مزمن ویروس هپاتیت B ، یک بیمـاری وسیع و گسترده می‌باشد که بیش از ۵٪ از جمعیـت جهـان را آلـوده کـرده و یکـی از بزرگتـرین مـشکلات بهداشـتی جهـان و کـشور مـا محـسوب مـی‌شـود. ایـران در منطقـه خاورمیانـه قـرار دارد و بر طبق گزارش‌های CDC (Center for Disease Control) ؛ شیوع عفونت مزمن هپاتیـت B در آن، در سطح متوسط قرار دارد. میزان شیوع HBsAg مثبـت در سال ۱۳۵۷در ایران ۳/۴٪ گـــزارش شـــده اســـت(۱۴). میـزان شیوع HBsAg مثبـت در افـراد معمـولی ۱/۷٪ و در بیـن اهداکننـدگـــان خون ۰/۵٪ گزارش شده است(۱۵). ۳۵٪ ایرانیان در معرض HBV قرار گرفتـه‌انـد و ۳٪ آن‌هـا ناقل مزمن ویروس هپاتیت B می‌باشند(۱۶). در مقایـسه بـا ایالات متحده که عفونت HBV مسؤول ۲۵٪ هپاتیـت‌هـای مزمن گزارش شـده، در ایـران HBV مـسؤول ۷۰٪ تـا ۸۰٪ موارد هپاتیت‌های مـزمن مـی‌باشـد و نـشان داده شـده کـه ویروس هپاتیت B علت اصلی بیماری‌های کبدی در ایـران است(۱۷).

ژنوتیـپ‌هـای ویـروس هپاتیـت B از توزیـع جغرافیـایی ویژه‌ای برخوردارنـد .ژنوتیـپ D ظـاهراً در حـوزه دریـای مدیترانه و خاورمیانه فراوان یافت می‌شود و این مـساله بـا محل جغرافیایی ایـران در جهـان منطبـق مـی‌باشـد. تعیـین ژنوتیـپ HBV بـرای روشـن سـاختن سـیر بیمـاری و بیماری‌زایی ویروس مهم است زیـرا ژنوتیـپ‌هـا از لحـاظ بیماری‌زایـی و عکـس‌العمـل در برابـر درمـان بـا یکـدیگر تفاوت دارند.

روش‌های مختلفی برای تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیـت B مورد استفاده قرار می‌گیرد که یکی از این روش‌ها تعیین تـوالی مـی‌باشـد. در ایـن مطالعـه جهـت تعیـین شـیوع ژنوتیپ‌های HBV از روش تعیـین تـوالی اسـتفاده شـد. از ۱۲۰ نمونه HBsAg مثبت، ۶۹ نمونـه از نظـر HBV-DNA مثبت و ۵۱ مورد منفی بودند کـه ایـن نتـایج مـی‌توانـد بـه دلایل مختلف باشد. ممکـن اسـت افـرادی HBsAg مثبـت باشـند ولـی HBV-DNA در آنهـا منفـی باشـد، چـون روش‌هایی که برای تـشخیص و شناسـایی HBV-DNA بـه کار می‌رود، ممکن اسـت حـساسیت لازم را نداشـته و بـه دلیل پایین بودن بار HBV-DNA ، علی‌رغم مثبت بـودن از نظر HBsAg ، HBV-DNA در نمونـه هـا قابـل شناسـایی نباشد.

مواردی نیز وجود دارد که تکثیر ویروس متوقف شده و فرد در مرحلـه آشکارسـازی anti-HBs اسـت ولـی هنـوز HBsAg آن از سرم حذف نشده است(۱۸).

هم چنین ممکن اسـت DNA ویـروس در داخـل ژنـوم سلول‌های کبدی قـرار گرفتـه اسـت و بنـابراین در سـلول کبـدی، DNA آزاد ویروسـی یـا HBc Ag ، قابـل شناسـایی نیست. این گروه از بیماران ذرات کامـل ویـروس را تولیـد

www.SID.ir
Archive of SID

نکرده یا بسیار کم تولید می‌کنند و ژنوم ویروس که در داخل ژنوم سلول کبدی قرار گرفته است، فقط HBsAg را تولید می‌کند(۱۹).

مطالعه‌هایی که جهت تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در ایران انجام شده، بیشتر در بیماران و بر روی ژن‌های S و C ویروس هپاتیت B بوده است. مطالعه‌ای که توسط گودرزی و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۱۰ بیمار HCC (Hepato Cellular Carcinoma) با روش تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیکی در ناحیه Pre S انجام شد، آشکار نمود که تمام واریته‌های جدا شده به ژنوتیپ D تعلق داشتند(۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط علویان و همکاران بر روی ۱۰۹ ایرانی که از نظر HBs Ag مثبت بودند انجام گرفت، ژنوتیپ D تنها ژنوتیپی بود که در این افراد شناخته شد(۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط امینی باویل و همکاران بر روی نمونه ۲۵ بیمار هپاتیت مزمن B با استفاده از روش تعیین توالی بر روی ژن C انجام شد، ژنوتیپ D در میان ایزوله‌ها ژنوتیپ غالب بود(۲۱). در مطالعه‌ای که بر روی ۵۵ اهداکننده خون در تهران صورت گرفت، با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی ژن S مشخص شد که همگی واریته‌ها دارای ژنوتیپ D بودند(۲۲). ژنوتیپ شناسایی شده در این مطالعه (ژنوتیپD)، با نتایج مطالعه‌های قبلی در ایران مطابقت دارد.

در کشورهای همسایه هم چون ترکیه، پاکستان، افغانستان و روسیه شایع‌ترین ژنوتیپ، D گزارش شده است. در کشورهای هند، عربستان و مصر نیز شایع‌ترین ژنوتیپ D می‌باشد. بنابراین شایع‌ترین ژنوتیپی که در منطقه مدیترانه شرقی گزارش شده، ژنوتیپ D است که با مطالعه ما مطابقت دارد(۲۴، ۲۳).

توالی ایزوله‌های HBV اهداکنندگان خون در مقایسه با توالی‌های موجود در بانک ژنی در جستجوی بلاست، بهترین انطباق‌ها و بالاترین امتیازها را با کشورهای قزاقستان، بلاروس و ازبکستان هم چنین کشورهای هند و چین نشان داد.

در مطالعه‌ای که قبلاً بر روی ۱۰ بیمار HCC انجام شده، بیشترین شباهت ایزوله‌ها با سوش Swedish (AF121240SW) گزارش گردیده است(۲۰). در مطالعه امینی باویل و همکاران، شباهت بالایی بین توالی ایزوله‌های HBV بیماران ایرانی با توالی ایزوله‌های HBV کشورهای ترکیه و عربستان سعودی گزارش شده و در مطالعه دیگری که بر روی بیماران مزمن و بر روی ژن‌های S و C انجام شده بود، ارتباط نزدیکی بین ایزوله‌های ایرانی با سوش‌هایی از کشورهای لیتوانی، آلمان و فرانسه گزارش شده است(۲۱). در مطالعه اخیر، بیشترین شباهت بین ایزوله‌های ایران با کشورهای تازه استقلال یافته شوروی از قبیل قزاقستان، ازبکستان، بلاروس و ایزوله‌های هند و چین مشاهده گردید.احتمال دارد شباهت بین ایزوله‌های اصفهان، کرمان و یزد با ایزوله‌های کشورهای تازه استقلال یافته، به دلیل افزایش مسافرت‌ها و داد و ستد با کشورهای همسایه باشد. از طرف دیگر به دلیل این که در مطالعه‌های قبلی، از ژن های S و C ویروس هپاتیت B برای تعیین ژنوتیپ استفاده شده بود ودر این مطالعه ناحیه ژن پلی‌مراز مورد مطالعه قرار گرفته است، شاید ناحیه ژن‌های مورد مطالعه و طول قطعات با سوش‌های در گردش مناطق مختلف شباهت نشان دهد که تنها با تعداد کافی نمونه و توالی کامل تمام ژن‌های ویروس هپاتیت B می‌توان به نتیجه قطعی دست یافت.

مهاجرت انسان‌ها و مسافرت‌های بین کشورها ممکن است منجر به تغییر ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیتB شود. در مطالعه کومار در هند، ژنوتیپ ویروس هپاتیت B به طور اولیه در جمعیت هند، ژنوتیپ D گزارش شده که در طول زمان به علت مهاجرت افراد از اروپا به هند به خصوص در هند شمالی به طور نسبی با ژنوتیپ A ویروس هپاتیتB جایگزین شده است(۲۵).

به دلیل هم پوشانی ژن‌های هپاتیت B با یکدیگر، ممکن است بعضی موتاسیون‌ها در یک ژن بر روی بیان ژن‌های دیگر مثل sAg مؤثر باشد و در نتیجه این ویروس در نمونه‌های خون افراد اهداکننده خون با کیت‌های سرولوژیکی تجاری قابل شناسایی نباشد. بنابراین بررسی موتاسیون‌ها بر روی ژن‌های C ، S و P به خصوص در ایران که این ویروس به شکل آندمیک وجود دارد، می‌تواند

Archive of SID
www.SID.ir

در ارزیابی روش‌های سرولوژیک در غربالگری خون اهداکنندگان مهم باشد(۲۶). یافته‌های این مطالعه اهمیت ژنوتایپینگ HBV را نشان می‌دهد که می‌تواند جهت تهیه پانل‌های کنترل کیفی برای ارزیابی روش تشخیصی و هم چنین خرید کیت‌های تشخیصی، تکمیل و بهبود برنامه‌های غربالگری در کشور ما، بسیار مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

بررسی آنالیز فیلوژنتیک ایزوله‌های HBV اهداکنندگان خون نشان داد که تمامی ایزوله‌های این مطالعه در ژنوتیپ D ، HBV قرار دارند. این نتایج می‌تواند در تشخیص ایمونولوژیکی و ژنتیکی ویروس هپاتیت B به منظور تهیه کیت‌های تشخیصی ویروس هپاتیت B هم چنین تهیه پانل‌های کنترل کیفی جهت ارزیابی روش‌های تشخیصی ویروس مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

References :

1- Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus. Infectius diseases. 2006; 10(2): 77-91.
2- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, *et al.* Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. Gastroenterology 2003; 125 (2): 444-51.
3- Alam MM, Zaidi SZ, Malik SA, Shaukat S, Naeem A, Sharif S, *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis B virus genotypes in Pakistan. BMC Infect Dis 2007; 7: 115.
4- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, *et al*. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol 1988; 69(Pt 10): 2575-83.
5- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. Virology 1994; 198(2): 489-503.
6- Arauze-Ruiz P, Norder H, Roberston BH. Genotpye H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. Journal of General Virology 2002; 83: 2059-73.
7- Moraes MT, Niel C, Gomes SA. A polymerase reaction based assay to identify genotype f of hepatitis B virus. BrazJ Med Biol Res 1999; 32 (1): 45-9.
8- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. J General Virol 2002; 83(6): 1267-80.
9- Ozdemir FT, Duman D, Ertem D, Avşar E, Eren F, Ozdoğan O, *et al.* Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. Turk J Gastroenterol 2005;16(4):183-7.
10- Kato H, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Gish RG, Usuda S, *et al*. Determination of hepatitis B virus genotype G by polymerase chain reaction with hemi-nested primers. Journal of Virological Methods 2001; 98(2): 153-9.
11- Blackberg J, kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. J Hepatol 2000; 33(6): 992-7.
12- Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. J Hepatol 2000; 33(6): 998-1002.
13- Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, Sim JG. Unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolation from south Africa. J Gen Virol 1997; 78(Pt 7): 1719-29.
14- Farzadegan H, Harbour C, Ala F. The prevalence of hepatitis B surface antigen and its antibody in blood donors and high risk groups in Iran. Vox Sang 1979; 37(3): 182-6.
15- Merat Sh, Malekzadeh R, Rezvan H, Khatibian M. Hepatitis B in Iran. Arch Iran Med 2000; 3(4): 192-201.
16- Alavian SM, Fallahian F, Lankarani KB. The changing epidemiology of viral hepatitis B in Iran. J Gastrointestin Liver Dis 2007; 16(4): 403-6.
17- Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N, Sadeghi HM. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. World J Gastroenterol 2006; 12(32): 5211-3.
18- Robinson SW. Hepatitis B virus and hepatitis D virus . In; Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Living stone; 2000. p.1406-39.
19- Crow Ford MJ. The liver and the billiary. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic Basis of

www.SID.ir

Disease. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 831-67.
20- Goodarzi Z, Malekzadeh R, Montazeri G, Alavian SM, Qurbanalizadgan M, Daram M, *et al*. Phylogenetic Analysis of HBV Based on PreS Region in Iranian Hepatocellular Carcinoma Patients. Hepatitis Monthly 2007; 7(4): 201-5.
21- Amini Bavil-Olyaee S, Sarrami-Forooshani R, Adeli A, Sabahi F, Abachi M, Azizi M, *et al.* Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates from Iran. J Med Virol 2005; 76 (3) : 31-26.
22- Milani S, Sharifi Z, Hosseini M, Mahmoodian Shooshtari M. Determination of HBV genotypes among HBs Ag positive blood donors in Tehran, Iran using PCR-RFLP. Iranian J Publ Health 2009; 38(1): 41-7.
23- Amini-Bavil-Olyaee S, Alavian SM, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, et al. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus genotyping, core promoter, and precore/core mutations among Afghan patients infected with hepatitis B: A preliminary report. J Med Virol 2006; 78(3): 358-64 .
24- Alam MM , Zaidi SZ, Malik SA, Shaukat S, Naeem A, Sharif S. Molecular epidemiology of Hepatitis B virus genotypes in Pakistan. BMC Infect Dis 2007; 7:115.
25- Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. Indian J Gastroenterol 2005; 24(1): 19-22.
26- Gutiérrez C, Devesa M, Loureiro CL, León G, Liprandi F, Pujol FH. Molecular and Serological evaluation of surfaces antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. J Med Virol 2004; 73(2): 200-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Prevalence of hepatitis B virus genotypes to be determined by sequencing in blood donors in Kerman, Esfahan and Yazd

Sharifi Z.[1](PhD), Gharehbaghian A.[1](PhD), Noroozi M.[1](MS)

[1]Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Hepatitis B is one of the major diseases that has the potential to be transmitted by blood transfusion. Specific genotypes of hepatitis B virus are increasingly recognized for their clinical significance and association with particular viral mutations. The aim of this study was to investigate the prevalence of hepatitis B virus genotypes in blood donors of Kerman, Yazd and Isfehan Blood Centers.

Materials and Methods

Sera of 120 blood donors, who were positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) using ELISA method, were selected. HBV DNA was extracted from sera using commercial kits and the p gene sequences were amplified by nested-PCR. HBV genotypes were determined by direct sequencing of the polymerase gene of HBV. The obtained sequences were aligned with Clustal W programme. Phylogenetic trees were constructed by the Neighbor-joining (NJ) method. The data were analyzed with Fisher test by SPSS 11.5

Results

Out of 120 HBsAg positive volunteer blood donors, 69 (57.5% , CI 95% = 48.65-66.34)) were positive for HBV DNA sequence. Sequence analysis was done on the positive samples. Genotype D was detected among 100% of HBV infected volunteer blood donors.

Conclusions

The prevalence rate of genotype D was found to be 100%. These findings may have an impact on the immunological and genetic diagnosis of HBV as well as on the selection of diagnostic kits and viral quality control panels.

Key words: Hepatitis B virus, Blood Donors, Genotype
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 6(4): 248-256

Received: 22 Feb 2009
Accepted: 3 Oct 2009

Correspondence: Gharehbaghian A., PhD of Clinical Immunohematology. Associate Professor of Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *gharehbaghian@ibto.ir*

Archive of SID
www.SID.ir