خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ پاییز ۹۱ (۲۸۹-۲۸۱)

مقاله پژوهشی

کلونینگ ژن POL ویروس HIV-1 و تعیین زیر گروه‌های آن

رعنا تبار اسد لاله[۱]، زهره شریفی[۲]، احمد قره‌باغیان[۳]

چکیده

سابقه و هدف

شناسایی تنوع ژنتیکی و سیر تکاملی ویروس HIV در کشور، به بررسی مولکولی پیوسته و مداوم نیاز دارد که بتواند اطلاعات مفیدی در راستای طراحی روش‌های درمانی و تشخیصی جدید ارایه دهد. در این مطالعه از روش ژن کلونینگ، جهت ارزیابی توزیع و تنوع ژنتیکی اشکال در حال گردش ویروس HIV-1 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ۵۰ نمونه که با روش الایزا، HIV مثبت بودند، بررسی شدند، تمام موارد معتاد تزریقی بوده و سابقه درمان آنتی رتروویرال نداشتند. ژن ریورس ترانس‌کریپتاز ویروس HIV-1 با روش Nested RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد، سپس با استفاده از وکتور PTZ-57RT کلون شد و چندین کلون از هر بیمار تعیین توالی شد. توالی‌های به دست آمده از ژن ریورس ترانس‌کریپتاز با توالی‌های رفرانس که از بانک اطلاعات جهانی به دست آمده بود، با استفاده از نرم‌افزار ClustalW ۱/۸ مرتب شد. سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار NJplot رسم شد.

یافته‌ها

از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۳۰ نمونه با استفاده از روش Nested RT-PCR تکثیر شدند، آنالیز نوکلئوتیدها بر روی ژن ریورس ترانس‌کریپتاز با استفاده از چندین کلون از هر فرد انجام شد. تمام نمونه‌ها ساب‌تایپ CRF35-AD بودند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که CRF35-AD ، شایع‌ترین تحت گونه نوترکیب در بین بیماران است. اطلاعات پیرامون تنوع ژنتیکی ویروس در افراد و ساب‌تایپ‌های ویروسی در گردش جامعه، می‌تواند در طراحی روش‌های تشخیصی، برنامه‌های کنترل عفونت و درمان، مفید باشد.

کلمات کلیدی: HIV1 ، کلونی‌ها، تنوع ژنتیکی

تاریخ دریافت : ۹۰/۶/۲۸
تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۱/۱۰

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ویروس‌شناسی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

در حال حاضر بیماری ایدز، یکی از معضلات بهداشتی جهان می‌باشد. هم چنان که وارد هزاره جدید می‌شویم، ویروس از بین برنده سیستم ایمنی بدن انسان یا همان Human Immunodeficiency Virus (HIV) در به خطر انداختن سلامتی بشر در سراسر جهان نقش بزرگی دارد. آمارهای ارایه شده اخیر از سوی سازمان ملل نشان می‌دهد که تقریباً ۳۴ میلیون نفر از مردم جهان به این بیماری مبتلا هستند و هر ساله تعداد ۵/۶ میلیون نفر، به این مقدار افزوده می‌گردد.

فاجعه انسانی مربوط به ایدز بی‌مانند است و در حال حاضر، چشم‌انداز روشنی برای تولید واکسن مؤثر علیه ویروس HIV و بیماری ایدز، وجود ندارد(۱). دلایل اصلی و مهمی که باعث شده تاکنون راهی مطمئن برای کنترل این ویروس در دسترس نباشد، وجود جهش‌های فراوان و متنوع در ژنوم ویروس به دلیل فشار سیستم ایمنی بدن، فقدان فعالیت تصحیح در عملکرد آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس و سرعت تکثیر بالای ویروس در هر سیکل تکثیر، هم چنین نوترکیبی ویروس می‌باشد(۲). ایجاد فرم‌های نوترکیب ویروس در اثر عفونت چندگانه در افراد مبتلا، عامل ایجاد تنوع ژنومی بسیار در این ویروس است و منجر به ایجاد سوش‌های نوترکیب جدیدی می‌شود که نقش برخی از این فرم‌های ریکامبیننت، به اندازه ساب تایپ‌های اصلی ویروس در ایجاد پاندمی‌های اخیر گزارش شده است(۳). احتمال دارد سوش غالب، وارد گردش در جامعه شود که باید مورد شناسایی قرار گیرد. به همین دلیل مطالعه‌های زیادی بر روی جهش‌های ژنومی به خصوص جهش‌های ژنومی که منجر به مقاومت دارویی و ایجاد تغییر ویژه‌ای در عملکرد و سیکل زندگی ویروس می‌شود؛ صورت گرفته است. با توجه به مطالعه‌های انجام شده بر روی ژن POL ویروس HIV، ثابت شده است که ژن POL در عملکرد و سیکل زندگی ویروس نقش حیاتی دارد و آنزیم‌های مهم ویروس HIV یعنی پروتئاز(PR)، اینتگراز(IN) وریورس ترانس‌کریپتاز(RT) راکد می‌کند. در نتیجه این تحقیقات ثابت شده است که برخی از جهش‌هایی که در ژن POL ایجاد می‌شوند، منجر به بروز مقاومت دارویی در ویروس HIV می‌گردند.

از آنجایی‌که ویروس‌های موجود در یک فرد به علت موتاسیون‌های فراوان هتروژن بوده و دارای ژنتیک یکسانی نمی‌باشند و با روش تعیین توالی مستقیم فقط ژنتیک یک ایزوله ویروسی مورد بررسی قرار می‌گیرد، در این تحقیق سعی شده با استفاده از چندین کلون، تفاوت‌های ژنومی ویروس‌های موجود در هر فرد مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی تعیین توالی کامل ژن ریورس ترانس کریپتاز و کلون کردن این ژن، می‌تواند منبع اطلاعاتی مفیدی برای مطالعه‌های آتی در مورد جهش‌های ایجاد شده جهت مقایسه سیر تکاملی ویروس ارایه دهد. اطلاعات پیرامون تنوع ژنتیکی ویروس HIV-1 در تشخیص این بیماری هم چنین روش‌های غربالگری اهداکنندگان نیز مؤثر است به این معنی که برای شناسایی افراد مبتلا در طراحی کیت‌های الایزا و PCR ، برای به دست آوردن پاسخ صحیح، طراحی اولیه باید به گونه‌ای باشد که قابلیت شناسایی تمام ساب تایپ‌ها و فرم‌های نوترکیب در حال گردش(=CRFs Criculating Recombinant Forms) شایع را داشته باشد و فقط مخصوص گروه B نباشد، اغلب کیت‌های تجاری بر اساس ژنوتیپ B طراحی شده‌اند که در اروپا و آمریکا شایع می‌باشد(۲). بنابراین شناسایی ساب تایپ اصلی در گردش هر جامعه جهت شناسایی سریع، طراحی آزمایش‌های غربالگری مناسب، سیاست‌گذاری جامعه جهت درمان و بررسی مقاومت در برابر دارو ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با استفاده از ۵۰ نمونه خون EDTA دار تهیه شده از معتادان مراجعه‌کننده به مراکز بهداشت کردستان انجام شد. ۹۲٪ نمونه‌ها مرد و ۸٪ زن بودند. نمونه‌گیری ساده و مطالعه انجام شده تجربی بود.

استخراج RNA ویروسی:

استخراج RNA ویروس HIV-1 از پلاسمای افراد مبتلا به عفونت با این ویروس انجام شد و برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار از کیت High Pure

www.SID.ir

Viral RNA Kit از شرکت رُوش استفاده شد. غلظت RNA با استفاده از بررسی میزان جذب نـور UV در ۲۶۰ نـانومتر محاسبه شـد. بـرای تعیـین میـزان خلـوص RNA ، میـزان جذب آن در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر محاسبه شد.

واکنش RT-Nested PCR :

ساخت cDNA با استفاده از کیت تاکارا بیو (INC) انجام شد. این کیت حاوی مستر میکس آماده متشکل از آنزیم بـا تصحیح خطا(proof reading) و بافر مناسب واکنش PCR ، dNTPs و Loading Buffer اسـت و بـا افـزودن الگـو، آغازگرهای جلوبرنده و معکـوس و ریـورس و آب مقطـر استریل، آماده انجـام واکـنش PCR مـی‌باشـد. واکـنش بـه صـورت Nested PCR و بـا اسـتفاده از دو جفـت آغـازگر خارجی و داخلی در دو مرحله انجام شد.

جدول۱: آغازگرهای ژن ترانس‌کریپتاز معکوس در مرحله اول و دوم

نام آغازگر	سکانس آغازگر
MJ3	5'AGT AGG ACC TAC ACC TGT AC3'
MJ4	5'CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC 3'
A20	5'ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT3'
NE1	5'ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT3'

در مرحله اول PCR ، از cDNA تهیه شده به عنوان الگـو و در مرحله دوم با محصول PCR به دست آمده از مرحلـه اول، بـه عنـوان الگـو بـا اسـتفاده از دسـتگاه ترموسـایکلر اپندورف، طبق برنامه زیر، PCR انجام شد.

جدول ۲: چرخه دمایی واکنش PCR

مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت
دناتوراسیون مقدماتی	۹۸ ºC	۵ ثانیه
دناتوراسیون	۹۸ ºC	۱۰ ثانیه
آنیلینگ	۵۵ ºC	۳۰ ثانیه
اکستنشن	۷۲ ºC	۱ دقیقه
اکستنشن نهایی	۷۲ ºC	۱۰ دقیقه

لازم به ذکر است که سه مرحله دناتوراسیون، آنیلینگ و اکستنشن، ۳۰ سیکل تکرار شد.

بررسی محصول PCR :

معمول‌تـرین روش بررسـی محصـول PCR ، روش ژل الکتروفـورز اسـت کـه در ایـن مطالعـه، بـا اسـتفاده از ژل آگاروز ۱٪ و جریان الکتریسیته به میـزان ۸۵-۸۰ ولـت بـه مـدت ۴۵ دقیقـه انجـام شـد. مشـاهده DNA متعاقـب الکتروفورز روی ژل آگاروز و بـا رنـگ‌آمیـزی بـا اتیـدیوم بروماید امکان‌پذیر خواهد بود.

اتصال قطعات DNA :

برای انجام واکنش اتصـال، ابتـدا محصـول مرحلـه دوم PCR به وسیله کیت High pure PCR product purification) (kit با بر چسب تجاری رُوش تخلیص و سپس در وکتـور PTZ-57RT کلون شد. در این تحقیق به منظـور کلونینـگ ژن ریورس ترانس‌کریپتاز از کیت کلونینگ فرمنتاز، استفاده شد. سپس محصول واکـنش بـه بـاکتری مسـتعد بـه روش کلـرور کلسـیم ترانسـفورم شـد. در نهایـت سـلول‌هـای ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی آنتی‌بیوتیـک، X-Gal و IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopy ranoside) اضـافه گردید. پلیت‌ها بـه طـور شـبانه(h ۱۸-۱۶) در انکوبـاتور ۳۷ ºC قرار داده شد تا کلنی‌های آبی(کلنی فاقـد پلاسـمید نوترکیب) یا سفید(کلنی حاوی پلاسمید نوترکیـب) ظـاهر شود.

روش کلونی PCR :

بـرای اسـتخراج پلاسـمید از کیـت High pure plasmid isolation kit با برچسـب تجـاری رُوش اسـتفاده شـد. بـا استفاده از روش کلونی PCR و آغـازگر اختصاصـی قطعـه مورد نظر، وجود قطعه DNA خارجی در ناقـل پلاسـمیدی تایید شـد. بـه همـین منظـور واکـنش PCR بـه حجـم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شـرایط مـذکور در قسـمت مربـوط بـه واکـنش PCR بـا اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصـی و ۱ میکروگرم پلاسمید استخراج شده از کلنی‌هـای سـفید، بـه عنوان الگو انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

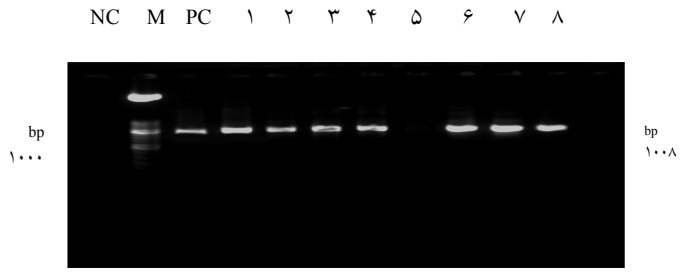
تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing):

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن کلون شده، بایستی باکتری ترانسفورم شده کشت داده شود، پلاسمیدهای نوترکیب عاری از هر گونه آلودگی استخراج شوند و توسط روش خاتمه زنجیره DNA نشاندار با رنگ فلوئورسنت و با استفاده از دستگاه تعیین توالی شوند. در این تحقیق به منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T ، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلنی سفید با استفاده از کیت شرکت رُوش استخراج گردیدند و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شدند. کروماتوگرام‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار کروماس، مورد بررسی قرار گرفتند و برای بررسی توالی‌های به دست آمده با کروماتوگرام رسم شده، نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار sequence analyzer و برنامه Backman ۸۰۰۰ با ژن رفرانس مقایسه شدند و صحت بازهای آن‌ها کنترل شد. برای تعیین ژنوتیپ ویروس با استفاده از برنامه Clastal W ۱/۸۴ ، توالی‌های به دست آمده با ژن‌های رفرانس مرتب شدند و برای رسم درخت فیلوژنتیک، از نرم‌افزار Nj Plot استفاده شد. برای بررسی صحت رسم درخت فیلوژنتیک، رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد. سپس نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده به کمک برنامه NCB1 BLAST از نظر تشابهات و اختلافات با ژن RT ویروس HIV-1 ثبت شده در بانک جهانی مقایسه گردید.

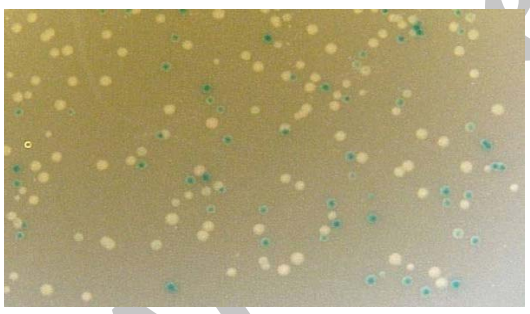
یافته‌ها

برای تعیین میزان خلوص RNA ، میزان جذب آن در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر محاسبه شد، مقدار حاصله بین ۱/۹ تا ۲/۱ به دست آمد که نشانگر خلوص مناسب RNA بود. استخراج RNA ویروس HIV-1 از پلاسمای افراد مبتلا به عفونت با این ویروس انجام شد. پس از ساخت cDNA ، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن ترانس‌کریپتاز معکوس انجام شد و قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۰۸ جفت باز تکثیر گردید(شکل ۱).

حضور قطعه ۱۰۰۸ جفت بازی در کنار نشانگر وزن مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن ترانس‌کریپتاز معکوس، نشان‌دهنده موفقیت در تکثیر ژن ترانس‌کریپتاز معکوس می‌باشد. پس از خالص‌سازی و کلونینگ ژن پروتئاز در وکتور PTZ57R/T ، کلون‌های حاصله مورد بررسی قرار گرفت و کلون‌های سفید رنگ که حاوی قطعه مورد نظر بودند انتخاب شدند(شکل ۲).



شکل ۱: NC کنترل منفی، M مارکر وزن مولکولی، PC کنترل مثبت و ستون‌های شماره ۸-۱ مربوط به نمونه بیمار است.

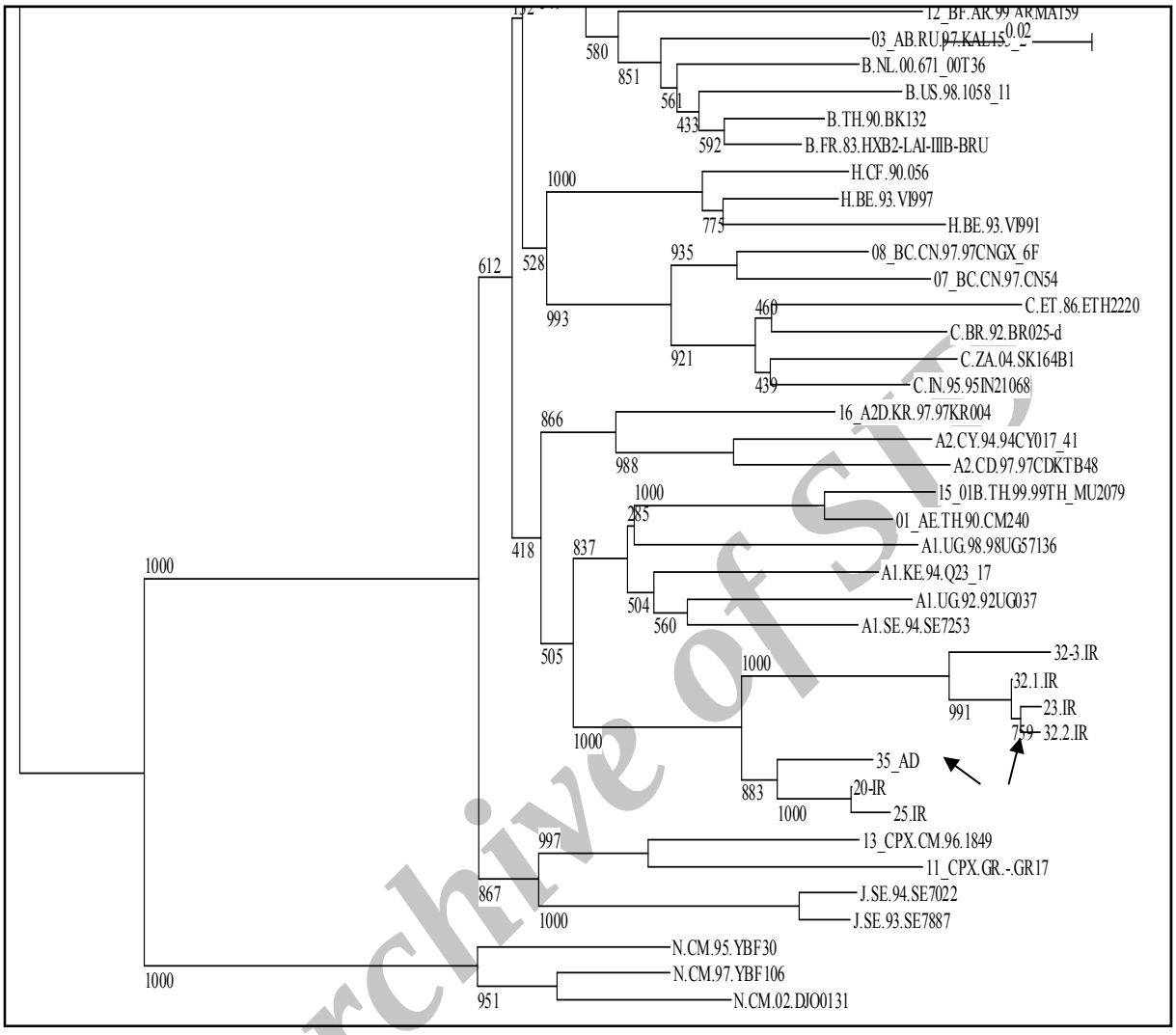


شکل ۲: کلونی‌های سفید رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب

جهت تایید حضور ژن در کلون‌های انتخاب شده، از کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. پس از تایید کلونینگ، برای بررسی تطابق توالی‌های به دست آمده از پلاسمید نوترکیب PTZ-RT با کروماتوگرام رسم شده، نتایج تعیین توالی با ژن رفرانس مقایسه شد و صحت بازهای آن‌ها کنترل گردید. برای تعیین ژنوتیپ ویروس، توالی‌های به دست آمده با ژن‌های رفرانس مرتب شده و برای صحت رسم درخت فیلوژنتیک رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد(شکل ۳).

نتایج به دست آمده از آنالیز فیلوژنتیک ژن RT نشان داد

www.SID.ir



شکل ۳: رسم درخت فیلوژنتیک ژن RT که ایزوله‌های این مطالعه با IR نشان داده شده است و رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد.

که تحت گونه شایع در میان معتادان تزریقی، CRF35A-D می‌باشد که بیشترین تشابه را با ساب تایپ نوترکیب موجود در افغانستان دارد.

بحث

با گذشت قریب به ۲۷سال از اولین گزارش ابتلا به ایدز در جهان و گذشت ۲۵ سال از کشف عامل بیماری، هنوز هم کنترل مؤثر ایدز با شکست مواجه است. ریشه اصلی این چالش به پاتوژنز مولکولی ویروس HIV برمی‌گردد. ویروسی که از مکانیسم‌های مختلفی برای گریز از سیستم ایمنی بدن میزبان بهره می‌گیرد. یکی از شاخص‌ترین راه‌های استفاده ویروس جهت فرار از سیستم ایمنی میزبان، گلیکوزیلاسیون گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌باشد که از خنثی‌سازی اپی‌توپ‌ها توسط آنتی‌بادی جلوگیری می‌کند. از طرفی ورود ویروس به ژنوم سلول میزبان باعث می‌شود که سلول‌های آلوده شده‌ای که از بین نمی‌روند، به طور دایم منبعی برای حفظ ویروس در میزبان باشند. از راه‌های گریز دیگر ویروس که برای ما دارای اهمیت بیشتری است، پتانسیل بالای آن در موتاسیون می‌باشد که به آن فرار موتاسیونی می‌گویند. مکانیسم اخیر

Archive of SID
www.SID.ir

باعث تنوع قابل ملاحظه ویروس HIV-1 شده و منجر به آداپته شدن سریع ویروس در برابر سیستم ایمنی میزبان، هم چنین مقاوم شدن آن در برابر درمان‌های آنتی رتروویرال می‌شود.

اما آن چه که در مورد ویروس HIV-1 از نظر اپیدمیولوژیکی و بالینی اهمیت دارد، تنوع ژنتیکی بسیار بالای ویروس است که باعث ایجاد جمعیت متنوعی از ویروس در یک فرد آلوده(Quasispesies) می‌شود. این تنوع ژنتیکی در نتیجه سرعت همانندسازی بالای ویروس (10^{10} ویریون در روز)، موتاسیون‌های مکرر آن ($10^{-5} \times 3/4$)، در هر سیکل، همانندسازی به دلیل نداشتن عملکرد تصحیح خطا در آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس ویروس HIV-1 ، ایجاد فرم‌های نوترکیب داخل گونه‌ای و بین عفونت چندگانه(multiple infection) و دوگانه(dual infection) در فرد آلوده، انتقال فرم‌های نوترکیب حاصله به سایرین و ایجاد فرم‌های نوترکیب جدید در گردش در جامعه(Circulate- recombinant forms) می‌شود که ممکن است حتی به فرم غالب در گردش در جامعه تبدیل شود. شناسایی ساب تایپ‌ها و CRFs شایع در هر جامعه و هم چنین بررسی تنوع ژنتیکی ویروس در هر فرد مبتلا هم چنین در کل جامعه دارای اهمیت بسیاری است زیرا همان طور که اشاره شد، انواع مختلفی از اشکال نوترکیب بین گونه‌ای از ویروس ایجاد شده است که نقش برخی از آن‌ها در ایجاد پاندمی‌های ویروس HIV-1 ، به اندازه ساب‌تایپ‌های اصلی ویروس می‌باشد به طوری که در مطالعه‌های انجام شده، وفور اشکال نوترکیب بین گونه‌ای در پاندمی‌های اخیر تایید شده است. افزایش CRF03-AB در روسیه، CRF08-BC,CRF07-BC در چین، CRF15-01B در تایلند و CRF35-AD در ایران و افغانستان گزارش شده است، در حالی که تا سال ۲۰۰۵ فرم غالب ساب‌تایپ ویروسی در ایران نوع A گزارش شده بود.

در مطالعه‌ای که توسط زمانی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از نمونه موکوس دهانی به دست آمده از ۶۱۱ معتاد تزریقی(۵۸۸ مرد و ۲۳ زن) مراجعه‌کننده به مراکز درمان اعتیاد در تهران انجام شد، گروه اصلی آلوده به HIV در ایران معتادان تزریقی و فاکتور خطر اصلی در ابتلا به آن، استفاده از سرنگ مشترک در میان آن‌ها گزارش شده بود(۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶توسط نادری و همکارانش با استفاده از نمونه تهیه شده از ۱۲معتاد تزریقی+HIV در مشهد انجام شد، در تمام موارد ساب‌تایپ آلوده‌کننده A گزارش شده بود(۶).

در مطالعه‌ای که توسط سارمی فروشانی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در مورد آنالیز فیلوژنتیک HIV در ایران در دو گروه هموفیلی و معتادان تزریقی با تهیه ۱۲۲ کلون از ژن gag-p17 و ۱۳۱ کلون از ژن(V1-V5) env از ۶۱ بیمار +HIV انجام شد، ساب‌تایپ آلوده‌کننده در افراد هموفیلی B و در معتادان تزریقی A گزارش شد. در این مطالعه نیز اعتیاد تزریقی، عامل اصلی انتقال HIV در ایران و ساب‌تایپ A ، ساب‌تایپ غالب در گردش جامعه گزارش شده بود(۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط موسوی و همکارانش در مورد میزان انتقال ویروس HIV مقاوم به درمان انجام شد، ۷۳ نمونه HIV مثبت از افراد زیر ۲۵ سال از مراکز مشاوره در تهران، قم، اصفهان، لرستان، کرمانشاه، همدان، کردستان، فارس و یزد تهیه شده بود. ۷۲٪ نمونه‌ها مرد و ۲۸٪ زن بودند. ۶۴٪ افراد معتاد تزریقی بودند و تمام افراد انتخاب شده، برای بار اول درمان را آغاز کرده بودند که ساب‌تایپ در تمام نمونه‌ها CRF35-AD و فقط در یک نمونه G و یک نمونه A گزارش شده بود(۶). هم چنین در مطالعه‌ای که توسط سهیلی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد، تعیین توالی ژن‌های پروتئاز، ترانس‌کریپتاز معکوس و انولپ از ۱۸ فرد مبتلا به HIV −1 که تحت درمان نبودند، انجام شد و تمامی نمونه‌ها دارای ساب‌تایپ CRF35-AD گزارش شدند(۷).

در مطالعه همکار و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که بر روی ۴۲ بیمار تحت درمان با داروهای آنتی‌رتروویرال که حداقل یک سال از شروع درمان آن‌ها می‌گذشت انجام شد، ۸۳٪ موارد مرد و ۱۷٪ زن بودند و ۳۶٪ آن‌ها دارای اعتیاد تزریقی بودند. در این مطالعه ساب تایپ CRF35-AD در ۴۸٪ موارد، ساب‌تایپ B در ۴۳٪ موارد، ساب‌تایپ نوترکیب CRF01A-E در ۵٪ موارد و ساب‌تایپ A در ۵٪

Archive of SID
www.SID.ir

موارد گزارش شده بود(۸).

همان طور که مشاهده می‌شود در تمام مطالعه‌هایی که تا به حال انجام شده، درصد مردان آلوده بیش از زنان است و بیشترین درصد آلودگی در افراد مورد مطالعه، گروه معتادان تزریقی می‌باشند.

در مطالعه ما نیز افراد مبتلا به HIV سابقه اعتیاد تزریقی داشتند که ۹۲٪ آن‌ها را مردان و ۸٪ را زنان تشکیل داده بودند، بنابراین می‌توان گفت که میزان ابتلای مردان در ایران از زنان بیشتر است و ساب‌تایپ CRF35-AD در حال حاضر نیز عمده‌ترین و اصلی‌ترین ساب‌تایپ در معتادان تزریقی در انتقال بیماری HIV–1 در ایران می‌باشد. تا سال ۲۰۰۶، ساب‌تایپ A در معتادان تزریقی و ساب‌تایپ B در افراد هموفیلی گزارش شده بود ولی در سال ۲۰۰۹ ، ساب‌تایپ CRF35-AD ساب‌تایپ اصلی آلوده‌کننده در ایران بود. ساب‌تایپ‌های A و G فقط در یک مورد گزارش شده بود و در سال ۲۰۱۰ چهار ساب‌تایپ CRF35-AD ، B ، CRF01A-E و A به ترتیب با فراوانی ۴۸٪ ، ۴۳٪ ، ۵٪ و ۵٪ در ایران گزارش شده است.

طبق گزارش‌های موجود از سال ۲۰۰۵ تا سال ۲۰۰۹، تنوع ساب‌تایپ‌های ویروس HIV-1 هم چنین دامنه گروه‌های آلوده در ایران در حال افزایش است و ممکن است طی سال‌های آینده، ساب‌تایپ اصلی در گردش در جامعه نیز در حال تغییر باشد که نیاز به مطالعه مداوم دارد، به عنوان مثال ساب‌تایپ A در معتادان تزریقی از ۱۰۰٪ موارد در سال ۲۰۰۵ به ۵٪ موارد در سال ۲۰۱۰ کاهش یافته است و ساب‌تایپ CRF35-AD ، به ساب‌تایپ اصلی در گردش در جامعه تبدیل شده است.

یکی از دلایل حضور این ساب‌تایپ‌های نوترکیب در ایران ممکن است مهاجرت و یا مسافرت به کشورهای همسایه و یا ورود مهاجران آن کشورها به ایران و آلودگی افراد به ساب‌تایپ نوترکیب موجود در آن جوامع باشد، البته عامل دیگر ممکن است عفونت چندگانه فرد به دو ساب‌تایپ متفاوت و ایجاد ساب‌تایپ نوترکیب جدید در فرد و انتقال آن به سایرین مطرح باشد، جهت بررسی این دو احتمال مطالعه‌های انجام شده در کشورهای همسایه مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه انجام شده توسط ساندرس در سال ۲۰۰۹ در افغانستان که در دو گروه معتادان تزریقی وSex Workers انجام شد، از ۶۲۳ نمونه معتاد تزریقی در سه شهر هرات، جلال‌آباد، مزار شریف، ۱۱ نمونه HIV مثبت تشخیص داده شده بود که ساب‌تایپ آلوده‌کننده در تمام موارد-CRF35 AD گزارش شد. از ۵۴۴ نمونه تهیه شده از Sex workers، فقط یک مورد مثبت تشخیص داده شد که ساب‌تایپ آلوده کننده A-E بود(۹). در مطالعه انجام شده توسط سعید خان در سال ۲۰۰۶، از ۳۴ معتاد تزریقی HIV مثبت که تعداد کمی از آن‌ها سابقه سفر به کشور امارات را داشته و در آن کشور رابطه جنسی با افراد Sex workers داشتند، تمام موارد آلوده به ساب‌تایپ A در پاکستان گزارش شده بود(۱۰). در مطالعه انجام شده توسط ییلماز در سال ۲۰۰۶ ، از ۲۷ بیمار(۲۶ فرد بالغ و ۱ نوزاد) که متولد ترکیه بودند، ۲۰ نفر در اثر رابطه جنسی با جنس مخالف (هتروسکسوال) آلوده شده بودند، ۲ بیمار در اثر انتقال خون و نوزاد از طریق مادر آلوده به بیماری مبتلا شده بودند، ۴ نفر به ساب‌تایپ A، ۱۹ نفر به ساب‌تایپ B، یک نفر به ساب‌تایپ C و یک نفر به ساب‌تایپ D و دو نفر به ساب‌تایپ F1 آلوده بودند. در این مطالعه ساب‌تایپ غالب آلوده‌کننده در استانبول ترکیه، B گزارش شده بود البته ساب‌تایپ non B نیز دیده شده بود(۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که CRF35-AD شایع‌ترین تحت گونه نوترکیب در بین بیماران معتاد تزریقی است. با توجه به عدم گزارش ژنوتیپ D تاکنون در ایران، احتمال دارد که این فرم ریکامبینت، در نتیجه ابتلای افراد به فرم ریکامبینت در خارج از ایران یا ورود مهاجرین آلوده به فرم ریکامبینت به کشور باشد که باعث گسترش این ساب‌تایپ‌ها در ایران شده است. بنابراین لازم است مطالعه وسیع‌تری در کشور بر روی ژنوم کامل ویروس به عمل آید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی

Archive of SID
www.SID.ir

مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. نویسندگان به این وسیله از آقای شهرام سمیعی و کارکنان محترم بخش‌های کیت‌سازی و ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون، تشکر و قدردانی می‌نمایند. هم چنین از مرکز تحقیقات انتقال خون به دلیل حمایت مالی این پروژه سپاسگزاری می‌گردد.

References :

1- Epidemic Update. UNAIDS Report on the global AIDS epidemic; 2010. Chapter 2. Available From: http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf.
2- Kijak GH, McCutchan FE. HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. Curr Infect Dis Rep 2005; 7(6): 480-8.
3- Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med 2008; 358: 1590-602.
4- Zamani S, Kihara M, Gouya MM, Vazirian M, Ono-Kihara M, Razzaghi EM, *et al*. Prevalence of and factors associated with HIV-1 infection among drug users visiting treatment centers in Tehran, Iran. AIDS 2005; 19(7): 709-16.
5- Naderi HR, Tagliamonte M, Tornesello ML, Ciccozzi M, Rezza G, Farid R, *et al*. Molecular and phylogenetic analysis of HIV1 variants circulating among injecting drug users in Mashhad-Iran. Infect Agent Cancer 2006; 1: 4.
6- Sarrami-Forooshani R, Das SR, Sabahi F, Adeli A, Esmaeili R, Wahren B, *et al*. Molecular analysis and phylogenetic characterization of HIV in Iran. J Med Virol 2006; 78(7): 853-63.
7- Mousavi SM, Hamkar R, Gouya MM, Safaie A, Zahraei SM, Yazdani Z, *et al*. Surveillance of HIV drug resistance transmission in Iran: experience gained from a pilot study. Arch Virol 2010; 155(3): 329-34.
8- Soheilli ZS, Ataiee A, Tootian S, Zadsar M, Amini S, Abadi K, *et al*. Presence of HIV-1 CRF35_AD in Iran. AIDS Res Hum Retroviruses 2009; 25(1): 123-4.
9- Hamkar R, Mohraz M, Lorestani S, Aghakhani A, Truong HM, McFarland W, *et al*. Assessing subtype and drug-resistance-associated mutations among antiretroviral-treated HIV-infected patients. AIDS 2010; 24(Suppl2): 585-91.
10- Sanders-Buell E, Bose M, Nasir A, Todd CS, Stanekzai MR, Tovanabutra S, *et al*. Distinct circulating recombinant HIV-1 strains among injecting drug users and sex workers in Afghanistan. AIDS Res Hum Retroviruses 2010; 26(5): 605-8.
11- Khan S, Rai MA, Khanani MR, Khan MN, Ali SH. HIV-1 subtype A infection in a community of intravenous drug users in Pakistan. BMC Infect Dis 2006; 6: 164.
12- Yilmaz G, Midilli K, Türkoğlu S, Bayraktaroğlu Z, Kuşkucu AM, Ozkan E, *et al*. Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. Int J Infect Dis 2006; 10(4): 286-90.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(3): 281-289

Original Article

Cloning of HIV-1 POL gene and its Subtyping

Tabar Asad Laleh R.[1], Sharifi Z.[1], Gharehbaghian A.[2]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Paramedical Faculty,Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

The identification of the genetic diversity and evolution of HIV-1 in the country needs constant molecular survey which could represent useful information to design new diagnostic and therapeutic strategies. Gene cloning strategy was used to evaluate the distribution and genetic diversity of the HIV-1 circulating forms**.**

Materials and Methods

Overal, 50 HIV-1 seropositive subjects were enrolled in the study. All of them were IDUs and had no history of antiretroviral therapy. The reverse-transcriptase genes of HIV-1 were amplified by nested RT-PCR using specific primers. Then, the RT gene of HIV-1 was cloned into a cloning vector PTZ-57R. Multiple clones from each patient were sequenced. The obtained sequences were aligned with the reference sequences, retrieved from the GenBank database. Multiple sequence alignments were performed by using the ClustalW 1.8 software package. Phylogenetic trees were generated by using the neighbor-joining plot.

Results

Of 50 serum samples, 30 were HIV RNA positive by nested RT-PCR. The nucleotide sequence analysis was performed on the RT genes from multiple clones. All samples were of HIV-1 CRF35-AD strains.

Conclusions

Data showed that CRF35-AD strain is the most prevalent in HIV infected patients. Information on the genetic diversity of viruses in patients and also viruses circulating in the community can be useful in design of diagnostic procedure, infection control programs and treatment.

Key words: HIV-1, Clones, Genetic Diversity

Received : 11 Sep 2011
Accepted: 25 Jan 2012

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052229; Fax : (+9821) 88601555
E-mail: z.*sharifi@ibto.ir*

www.SID.ir