Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۷ شماره ۱ بهار ۹۹ (۱۱-۱)

مقاله پژوهشی

به روز رسانی ژنوتیپ‌های شایع ویروس هپاتیت C در اهداکنندگان خون ایران

فهیمه رنجبر کرمانی[۱]، صدیقه امینی کافی‌آباد[۲]، کامران موسوی حسینی[۳]، مهتاب مقصودلو[۴]، زهره شریفی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

عفونت با ویروس هپاتیتC (HCV)، یکی از عوامل اصلی بیماری مزمن کبدی در سراسر جهان است. HCV یک ویروس انتقال یابنده از طریق خون و در نتیجه تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است. تعیین ژنوتیپ‌های HCV نقش مهمی را در بررسی راه‌های انتقال عفونت ایفا می‌نماید. این پژوهش با هدف بررسی وجود تغییر در الگوی ژنوتیپ‌هایHCV در اهداکنندگان ایرانی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی از آذر ماه سال ۱۳۹۴ تا خرداد ماه ۱۳۹۶، ۲۳۹ اهداکننده از سراسر کشور که دارای نتیجه مثبت در آزمایش تأییدی ویروسHCV بودند، مورد بررسی قرارگرفتند. از روش Semi nested PCR جهت تکثیر قسمتی از ناحیه NS5B ژنوم ویروس استفاده شد. محصول PCR، توالی‌یابی و ژنوتیپHCV با استفاده از نرم‌افزار(Basic Local Alignment Search Tool (BLAST تعیین شد. با استفاده از رسم درخت فیلوژنتیک، ژنوتیپ‌ها تأیید شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری ۱۳ STATA استفاده شد.

یافته‌ها

از ۲۳۹ شرکت‌کننده، در ۱۰۶ فرد(۶/۳٪ ± ۴۴/۳۵٪) ژنوتیپ تعیین و تأیید شد. در درخت فیلوژنتیک، تمامی توالی‌های مورد مطالعه، ۳ کلاستر جداگانه تشکیل دادند. سه ژنوتیپ 3a ، 1a و 1b به ترتیب ژنوتیپ‌های رایج در اهداکنندگان ایران بودند.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد طی دهه گذشته، اپیدمیولوژی مولکولی عفونت HCV در اهداکنندگان ایران از نظر تنوع ژنوتیپ تغییری نداشته است ولی تغییر در فراوانی ژنوتیپ‌ها و در نتیجه جابه‌جایی ژنوتیپ شایع 1a توسط ژنوتیپ 3a رخ داده است.

کلمات کلیدی: **هپاتیت C ، ژنوتیپ، اهداکنندگان خون**

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۳
تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲

۱- دکترای تخصصی خون‌شناسی آزمایشگاهی و انتقال خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی تشریحی و بالینی 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- دکترای تخصصی شیمی دارویی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- متخصص پزشکی اجتماعی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- دکترای تخصصی ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

www.SID.ir

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

مقدمه

عفونت با ویروس هپاتیت C (HCV) مشکل سلامت عمومی و یکی از عوامل اصلی بیماری مزمن کبدی در سراسر جهان و به طور خاص یکی از عوامل مهم ناخوشی و مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است. شایع‌ترین راه انتقال ویروس، تماس با خون آلوده است که از راه‌های مختلفی نظیر استفاده تزریقی مواد مخدر(Intravenous drug use: IDU)، مراقبت‌های درمانی غیر بهداشتی و دریافت خون و فرآورده‌های خونی غربالگری نشده امکان‌پذیر می‌باشد(۲، ۱). در کشورهای پیشرفته، IDU و در کشورهای در حال توسعه، قبل از به کارگیری روش‌های غربالگری ویروسHCV در اهداکنندگان، انتقال خون هم‌چنان یکی از راه‌های اصلی انتقال عفونت است. در کشورهای در حال توسعه که از غربالگری اهداکنندگان استفاده می‌کنند، عوامل مرتبط با اقدامات بیمارستانی، مراقبت‌های بهداشتی(Nosocomial) نظیر بستری شدن در بیمارستان و تزریق وریدی-عضلانی-زیرپوستی دارو، از راه های اصلی انتقال عفونت شناخته شده‌اند(۴، ۳، ۱). در ایران IDU ، استفاده غیر تزریقی مواد مخدر، مجروحیت جنگی، زندگی با فرد IDU، داشتن سابقه زندان، استفاده از تیغ مشترک، اقدامات پزشکی و دندانپزشکی، اهدای بار اول، سطح پایین تحصیلات، جنسیت مرد و متأهل بودن از جمله عوامل خطرساز در انتقال عفونت و ساب تیپ‌های 1a، 3a و 1b شایع‌ترین ژنوتیپ‌های HCV گزارش شده‌اند(۹-۵).

انباشت جهش‌های ایجاد شده در ویروس، منجر به ایجاد زیر گروه‌ها یا ساب‌تیپ‌ها و در نهایت تنوع در ژنوم یا ژنوتیپ ویروس می‌شود. در حال حاضر، با استفاده از تحلیل فیلوژنتیکی ویروس HCV ، ۷ ژنوتیپ اصلی با تفاوت توالی بیش از ۳۰٪ و ۸۶ ساب‌تیپ با تفاوت توالی ۳۰٪-۱۵٪ شناسایی شده است(۱۱، ۱۰). شیوع ژنوتیپ‌های مختلف و توزیع آن‌ها با منطقه جغرافیایی مرتبط می‌باشد. بررسی‌های متعدد درخصوص توزیع جهانی ژنوتیپ، حاکی از این است که به طور کلی ترتیب شیوع ژنوتیپ‌ها به صورت ژنوتیپ‌های ۱ ، ۳ ، ۴ ، ۲ ، ۶ و ۵ می‌باشند. ژنوتیپ‌های ۱، ۲ و ۳ در آمریکا، اروپا، ژاپن، استرالیا و نیوزیلند، ژنوتیپ ۴ در آفریقای شمالی و خاورمیانه، ژنوتیپ ۵ در آفریقای جنوبی و ژنوتیپ ۶ در آسیای جنوب شرقی شایع می‌باشند(۱۳، ۱۲). بررسی‌های انجام شده در ایران بیانگر شایع بودن ساب‌تیپ‌های 1a ، 3a و 1bدر نقاط مختلف کشور و با فراوانی‌های متفاوت است(۱۶-۱۴). تعیین ژنوتیپ برای شناسایی ژنوتیپ/ ساب‌تیپ‌های جدید اهمیت فراوانی دارد(۱۷). به نظر می‌رسد هر گونه تغییر در توزیع ژنوتیپ می‌تواند بیانگر تغییر احتمالی در عواملی نظیر راه انتقال عفونت، تغییر در وضعیت بهداشت جامعه و سبک زندگی آن جامعه باشد که در مناطق جغرافیایی مختلف با یکدیگر تفاوت دارد.

روش‌های مولکولی رایج جهت تعیین ژنوتیپ به طور کلی شامل روش تشخیص چند شکلی طول قطعات حاصل از برش (RFLP: Restriction fragment length polymorphism)، تکثیر با آغازگرهای اختصاصی(Primer specific) هر ژنوتیپ، دو رگه‌سازی محصول تکثیر با پروب اختصاصی(Hybridization with specific probes)، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب(Melting curve analysis) و توالی‌یابی(Sequencing) نواحی مختلف ژنوم ویروس است(۱۸). روش استاندارد طلایی(Gold standard) برای تعیین ژنوتیپ ویروس، روش توالی‌یابی ژنوم در نواحی Core/E و NS5B ژنوم ویروس است(۱۹). در حال حاضر با توجه به اهمیت تعیین ژنوتیپ با روش توالی‌یابی ژنوم ویروس در بررسی‌های اپیدمیولوژی و بالینی عفونت، این روش‌ها به سرعت در حال پیشرفت می‌باشند(۲۰). انتخاب ناحیه مناسب برای تعیین توالی بر اساس هدف مورد نظر است. ناحیه NS5B با داشتن یک جایگاه (Motif) مخصوص ساب تیپ بهترین ناحیه ژنوم ویروس برای توالی‌یابی در مطالعه‌های اپیدمیولوژی معرفی شده است(۲۲، ۲۱).

امروزه سلامت خون از نظر عفونت HCV با به کارگیری رویکرد چند لایه‌ای از جمله غربالگری خون‌های اهدایی با انجام آزمایش‌های تشخیص عفونت HCV با استفاده از کیت‌های دارای حساسیت مناسب افزایش یافته است(۲۴, ۲۳). تعیین ژنوتیپ‌های شایعHCV و اطلاع از چگونگی الگو، توزیع و تنوع ژنوتیپ ویروس و شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

موارد جدید ژنوتیپ/ساب‌تیپ آن، نقش مهمی را در روند انتخاب کیت‌های مناسب غربالگری اهداکنندگان جهت عفونت HCV ایفا می‌نماید. این پژوهش با هدف بررسی تغییر در الگوی ژنوتیپ‌های HCV از نظر نوع ژنوتیپ و فراوانی آن‌ها در اهداکنندگان ایرانی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

برابر استانداردهای سازمان انتقال خون ایران، اهداکنندگانی که نتیجه آزمایش تأییدی آن‌ها در آزمایش غربالگری جهت ویروس HCV مثبت باشد، جهت مشاوره و بررسی مجدد به مرکز خونگیری مربوطه فراخوان می‌شوند و علاوه بر مشاوره، از هر نفر یک نمونه خون دریافت می‌گردد.

در این مطالعه مقطعی، ۲۳۹ اهداکننده دارای نتیجه مثبت در آزمایش تأییدی جهت ویروسHCV ، که از آذر ماه سال ۱۳۹۴ تا خرداد ماه ۱۳۹۶ به فراخوان و شرکت در پژوهش پاسخ مثبت داده و به مراکز انتقال خون برگشته بودند، مورد بررسی قرارگرفتند. لازم به ذکر است که این اهداکنندگان در سایر آزمایش‌های غربالگری دارای نتیجه منفی بودند. هم‌زمان با مراجعه اهداکنندگان به مراکز انتقال خون در سراسر کشور، از افراد مایل به شرکت در این پژوهش، هنگام خونگیری یک نمونه خون اضافی جهت اجرای این طرح در لوله ژل‌دار دریافت گردید. نمونه ها پس ازجمع آوری در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ وپس از آن به مدت دو ساعت در یخچال ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. نمونه‌های خون در شرایط انجماد و اطلاعات دموگرافیک جمع‌آوری شده همراه با نامه رسمی از پایگاه‌های سراسر کشور، به محل استقرار تیم تحقیقاتی ارسال گردید. پس از دریافت نمونه‌ها، نمونه‌هایی که واجد شرایط انجام آزمایش‌های مولکولی بودند (نظیر عدم همولیز، لخته نبودن، انجام سانتریفوژ پس از دریافت خون، نمونه‌گیری در لوله ژل‌دار، حجم نمونه مناسب و یا مخدوش نبودن اطلاعات ثبت شده روی لوله)، تا قبل از جداسازی سرم آن‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و تکثیر RNA HCV :

این واکنش با استفاده از محلول Rnasol و سایر محلول‌های آماده شده در سازمان انتقال خون ایران، مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. به طور کلی همان گونه که قبلاً ذکر شد، روش استاندارد و مرجع در مطالعه‌های همه‌گیر شناسی برای تعیین ژنوتیپ HCV ، تعیین توالی ناحیه NS5B و به دنبال آن آنالیز فیلوژنتیک است (۲۵، ۱۹). تهیه نمونه جهت تعیین توالی، با روش Semi-nested PCR و با استفاده از محلول‌های تهیه شده در سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفت. برای انجام روش Semi-nested PCR ، ابتدا از RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر رفت، cDNA ساخته و سپس آزمایش Semi-nested PCR انجام شد. در مرحله اول Semi-nested PCR با استفاده از cDNA ساخته شده و آغازگرهای رفت و برگشت، یک قطعه ۳۸۸ جفت بازی و در مرحله دوم Semi-nested PCR با استفاده از محصول واکنش مرحله اول Semi-nested PCR و آغازگرهای رفت و برگشت، یک قطعه ۳۸۰ جفت بازی مربوط به بازهای ۸۶۳۶-۸۲۵۶ ژنوم ویروس HCV تکثیر شد (۲۶).

تعیین ژنوتیپ HCV :

الف ـ تعیین توالی:

محصول واکنش مرحله دوم Semi-nested PCR به همراه آغازگرهای همان مرحله، جهت تعیین توالی دو طرفه ارسال و نتایج بعد از چند روز دریافت و توسط نرم‌افزار کروماس استخراج و در فرمت FASTA ذخیره گردید.

ب ـ بررسی توالی‌ها در سایت NCBI:

یکی از بزرگترین سایت‌های مورد استفاده در مطالعه‌های بیوانفورماتیک، سایت NCBI به آدرس اینترنتی http://ncbi-nlm.nih.gov می‌باشد. تمامی داده‌های حاصل از تعیین توالی برای هر دو طرف با استفاده از نرم افزار Blast جهت تعیین ژنوتیپ اولیه مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

ج ـ ویرایش توالی‌ها:

برای ویرایش توالی‌ها از نرم‌افزار Beckman Coulter CEQ 8000 DNA Sequencer استفاده شد و توالی‌های ویرایش شده در فرمت seq ذخیره شدند.

د- هم‌تراز کردن توالی‌ها:

جهت تشخیص و تأیید دقیق ژنوتیپ نمونه‌ها، توالی‌های ویرایش شده نمونه‌های به دست آمده در این مطالعه با قسمتی از ناحیه NS5B ژنوم HCV (بازهای ناحیه ۸۶۳۶ – ۸۲۵۶) توالی‌های مرجع از ۷ ژنوتیپ و ۸۶ ساب‌تیپ مربوطه که به صورت کامل از مارس ۲۰۱۸ در سایت http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp قابل دسترسی و استخراج بود، با استفاده از نرم‌افزار Clustal W مقایسه و هم‌تراز شدند(جدول ۱).

جدول ۱: ژنوتیپ و ساب‌تیپ‌های مرجع از ۷ ژنوتیپ و ۸۶ ساب‌تیپ مربوطه

ژنوتیپ	ساب‌تیپ
۱	a b c d e g h i j k l m n
۲	a b c d e f I j k i m q r t u
۳	a b d e g h i k
۴	a b c d e f g k l m n o p q r s t v w
۵	a
۶	a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w xa xb xc xd xe xf
۷	a b

هـ- رسم درخت فیلوژنتیکی:

با استفاده از نرم‌افزار Mega ۷ و روش Maximumlikelihood مدل Jukes-Cantor از توالی‌های هم‌تراز شده برای رسم درخت فیلوژنتیکی و تعیین نهایی ساب‌تیپ‌های HCV استفاده شد(۲۷).

و- ثبت ژن‌های تعیین توالی شده در بانک جهانی:

توالی‌های به دست آمده که طول آن‌ها حداقل ۲۰۰ bp بود، از طریق نرم‌افزارSequin به بانک جهانی ژن در آمریکا ارسال شد و پس از تأیید آن مرکز، به آن‌ها شماره‌های دسترسی MG704694–MG704794 اختصاص داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

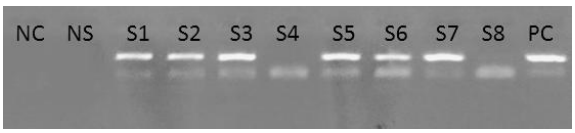
برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از پژوهش از نرم‌افزار آماری(STATA Crop ، College Station TX ، STATA 13) استفاده شد. اطلاعات توصیفی به صورت میانگین ± انحراف معیار در متغیرهای کمی و یا فراوانی (درصد) در متغیرهای کیفی بیان شد.

رعایت نکات اخلاقی:

این مطالعه توسط کمیته اخلاق مؤسسه علمی- پژوهشی طب انتقال خون با کد IR.TMI.REC.1394.1800 مورد تصویب قرار گرفت.

یافته‌ها

۲۳۹ اهداکننده در این مطالعه شرکت کردند. میانگین سنی آن‌ها ۸/۷۴ ± ۳۷/۵۸ سال بود. اکثریت شرکت‌کنندگان را مردان تشکیل می‌دادند (۲۳۳، ۹۸/۴۹٪). متأهلین بیشتربن فراوانی را داشتند(۱۷۹، ۷۵٪). بیشتر شرکت‌کنندگان دارای تحصیلات زیر دیپلم بودند (۶۰/۶۷٪). از ۲۳۹ نمونه خون جمع‌آوری شده، ۱۰۶ نمونه (۶/۳٪ ± ۴۴/۳۵٪) دارای نتیجه مثبت(باند ۳۸۰ جفت بازی) در آزمایش Semi nested PCR و نمونه مورد نیاز برای تعیین ژنوتیپ با روش توالی‌یابی بودند(شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز مرحله دوم آزمایش Semi nested PCR چند نمونه اهداکننده و کنترل‌ها.
در این شکل کنترل منفی مرحله اول آزمایش Semi Semi nested PCR به صورت NC^1 ، کنترل منفی مرحله دوم آزمایش Semi Semi nested PCR به صورت NC^2 کنترل مثبت به صورت PC و نمونه‌ها با علامت S و شماره نشان داده شده است.

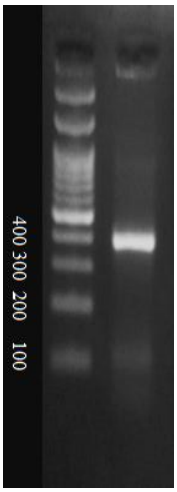
www.SID.ir

Archive of SID

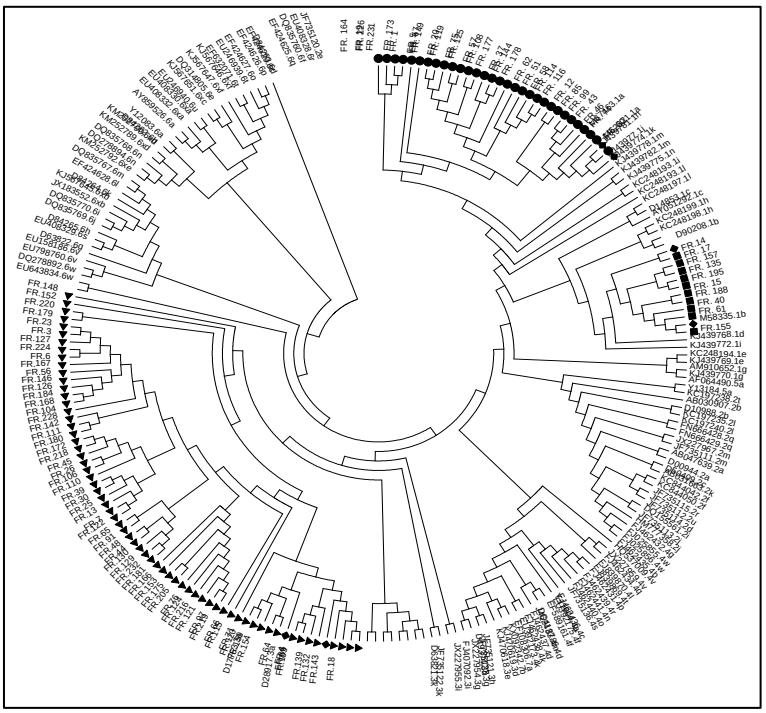
Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

ژنوتیپ HCV در تمامی ۱۰۶ نمونه تعیین شد. درخت فیلوژنتیکی ۱۲۱ توالی مرجع از ۸۶ ساب تیپ HCV و نمونه‌های اهداکنندگان این مطالعه در شکل داده شده است(شکل ۳). تمامی نمونه‌های اهداکنندگان در سه گروه ژنوتیپ ۳a، ۱a و ۱b قرار گرفتند. به منظور وضوح بیشتر، درخت فیلوژنتیکی توالی‌های مرجع این سه ژنوتیپ و نمونه‌های اهداکنندگان این مطالعه، با روش ذکر شده در بالا رسم شده است(شکل ۴).

همان طور که در دو شکل ۲ و ۳ نمایش داده شده است، تمامی توالی‌های مربوط به ژنوتیپ‌های 1a، 1b و 3a که در این مطالعه به دست آمد، در کلاسترهای جداگانه مربوط به هر ژنوتیپ قرار گرفتند. ژنوتیپ a ۳ در ۶۵ نمونه(۹/۶٪ ± ۶۱/۳٪) دارای بیشترین فراوانی بود و پس از آن ژنوتیپ a ۱ در ۳۱ نمونه (۹/۱٪ ± ۲۹/۳٪) و ژنوتیپ b ۱ در ۱۰ نمونه (۶/۱٪ ± ۹/۴٪) گزارش شد.



شکل ۲: نتیجه الکتروفورز آزمایش مرحله دوم Semi nested PCR یک نمونه به عنوان کنترل مثبت به همراه شاخص تعیین اندازه DNA. در این شکل باند ۳۸۰ جفت بازی مربوط به بازهای شماره ۸۶۳۶ – ۸۲۵۶ منطقه ژنوم ویروس نشان داده شده است.

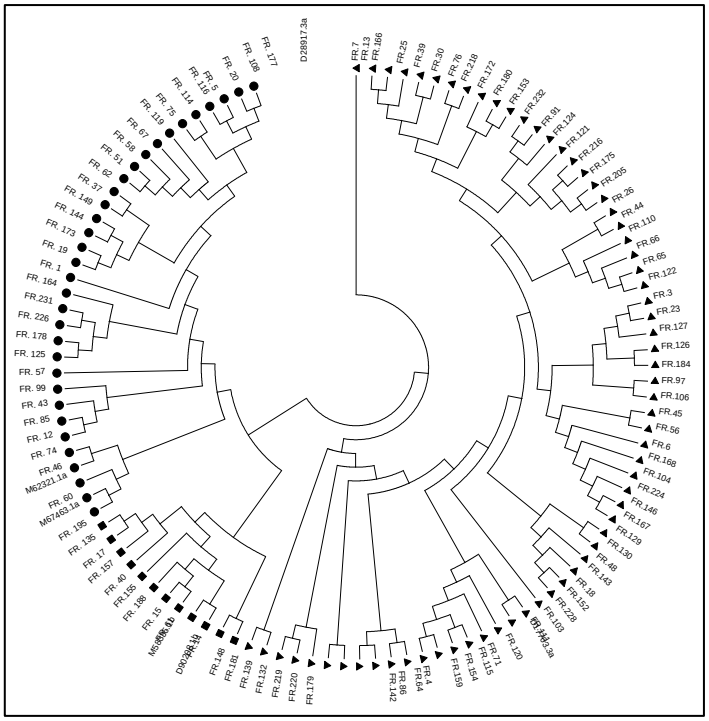


شکل ۳ درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های اهداکنندگان و ۱۲۱ توالی مرجع ژنوتیپ HCV . روی دندروگرام توالی‌های بررسی شده در این مطالعه به صورت FR و ژنوتیپ 1a با علامت دایره توپر ژنوتیپ 1b با علامت مربع توپر و ژنوتیپ 3a با علامت مثلث توپر، توالی‌های مرجع این سه ژنوتیپ‌ها با علامت لوزی توپر و شماره دسترسی و سایر ژنوتیپ‌ها با شماره دسترسی مشخص شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020



شکل ۴ : درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های اهداکنندگان و توالی‌های مرجع سه ژنوتیپ HCV . روی دندروگرام، توالی‌های بررسی شده در این مطالعه به صورت FR و ژنوتیپ 1a با علامت دایره توپر ژنوتیپ 1b با علامت مربع توپر، ژنوتیپ 3a با علامت مثلث توپر و توالی‌های مرجع ژنوتیپ‌ها با علامت مرتبط و شماره دسترسی مشخص شده است.

بحث

مطالعه‌های تعیین ژنوتیپ با فواصل زمانی مشخص بر روی اهداکنندگان توصیه می‌شود تا ورود ژنوتیپ/ساب‌تیپ جدید و یا هرگونه تغییر در توزیع ژنوتیپ‌ها در جامعه را مشخص نماید(۱۷, ۱۳). بر اساس آنالیز فیلوژنتیک انجام شده، ساب‌تیپ‌های رایج در بین اهداکنندگان ایران شامل ۳a ، ۱a و ۱b بود که در سه کلاستر بزرگ مربوط به هر ساب‌تیپ قرار گرفتند. ساب‌تیپ ۳a با فراوانی ۶۱/۳۲٪ ساب‌تیپ غالب بود و پس از آن ساب تیپ‌های ۱a با فراوانی ۲۹/۲۵٪ و ۱b با فراوانی۹/۴۳٪ قرار داشتند. سه ساب‌تیپ ۱a، ۱b و ۳a که در این مطالعه به عنوان ساب‌تیپ‌های رایج در اهداکنندگان ایران شناخته شدند، در بررسی یک دهه قبل شریفی و همکاران روی ۱۰۳ اهداکننده خون از سراسر کشور با تفاوت در فراوانی از ساب‌تیپ‌های رایج در اهداکنندگان گزارش شدند، به گونه‌ای که ساب‌تیپ ۱a با فراوانی ۵۱/۵٪ ساب‌تیپ غالب بود و پس از آن ساب‌تیپ‌های ۳a با فراوانی ۳۷/۹٪ و ۱ b با فراوانی ۳/۹٪ قرار داشتند(۲۸). به نظر می‌رسد در الگوی ژنوتیپ(نوع ژنوتیپ) تغییری نسبت به دهه قبل به وجود نیامده است. در مقایسه بین نتایج این دو مطالعه، کاهش در فراوانی ژنوتیپ ۱ a و افزایش در فراوانی ژنوتیپ‌های ۳a و ۱ b به چشم می‌خورد. روند تغییر در ژنوتیپ غالب در جمعیت بیماران در ایران در مطالعه‌های قبلی نشان داده شده است. مطالعه جهان بخش سفیدی و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی ۱۵۶۱ بیمار هپاتیت مزمن که طی سال‌های ۲۰۱۳-۲۰۱۱ به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات بقیه‌اله مراجعه کرده و با روش RFLP تعیین ژنوتیپ شده بودند، بیانگر شایع بودن ژنوتیپ ۱a با فراوانی۴۴/۶٪، ۳a با فراوانی۳۹/۶٪ و ۱b با فراوانی ۲/۵٪ بود. در این مطالعه در حال تغییر بودن توزیع ژنوتیپ‌ها در بیماران با افزایش در فراوانی ژنوتیپ‌های ۳a و ۴ و کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

در فراوانی ژنوتیپ‌های ۱a و۱b گزارش شد(۲۹). مرور سازمان یافته و فراتحلیل انجام شده توسط خدابنده‌لو و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۵۳ مقاله منتشر شده در سال‌های ۲۰۱۴-۱۹۹۹ درخصوص وضعیت ژنوتیپ HCV در ایران نشان داد که به طور کلی ژنوتیپ‌های a ۱ با فراوانی ۳۹٪، a ۳ با فراوانی۳۲٪ و b ۱ با فراوانی ۱۳٪، شایع ترین ژنوتیپ‌ها در ایران بودند که در استان‌های مختلف فراوانی آن‌ها تفاوت داشت. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌ها در طول زمان دستخوش تغییر بوده و افزایش در فراوانی ژنوتیپ ۳a و رسیدن آن به بالاترین میزان آن نسبت به قبل مشاهده شده است(۱۴). در مرور سازمان یافته و فراتحلیل انجام شده اخیر در سال ۲۰۱۸ توسط محمود و همکاران در کشورهای حوزه خاورمیانه و شمال آفریقا، ژنوتیپ ۱ ژنوتیپ غالب در اکثر کشورهای مورد بررسی از جمله ایران و ژنوتیپ ۳ ژنوتیپ غالب در کشورهای افغانستان و پاکستان بود. بر طبق این بررسی اگر چه ژنوتیپ ۳ در افغانستان و پاکستان ژنوتیپ غالب بود ولی در بعضی مناطق در ایران نیز ژنوتیپ غالب ژنوتیپ ۳ اعلام شد و به طور کلی وجود تغییر در توزیع ژنوتیپ‌ها در ایران به سمت غالب بودن ژنوتیپ ۳ مورد تأیید قرار گرفت(۳۰). در مطالعه حاضر الگوی ژنوتیپ شبیه کشورهای همسایه شرقی(پاکستان و افغانستان) و کشورهای آسیای دور مانند نپال است و با الگوی رایج در کشورهای غربی و حتی خاورمیانه که در آن‌ها ژنوتیپ غالب ۱ می‌باشد تفاوت دارد. تداخل توالی‌های ویروس بین ایران وکشورهای همسایه شرقی می‌تواند یکی از دلایل تغییر در الگوی ژنوتیپ(فراوانی ژنوتیپ) به سمت غالب بودن ژنوتیپ ۳a که ژنوتیپ غالب در آن کشورها است، به حساب آید. از طرفی تغییر در توزیع ژنوتیپ‌ها می‌تواند بیانگر تغییر در همه‌گیرشناسی HCV به دلیل عوامل خطرساز عفونت HCV در جمعیت باشد. به نظر می‌رسد به دلیل افزایش در سلامت خون و توسعه بهداشت در مداخلات پزشکی و جایگزین شدن نقش آن‌ها توسط IDU به عنوان اصلی‌ترین عامل خطرساز عفونت، می‌تواند دلیل احتمالی دیگر تغییر در توزیع ژنوتیپ به نفع ژنوتیپ مرتبط با IDU به صورت شایع شدن ژنوتیپ‌هایی که قبلاً شایع نبوده و یا شیوع آن کم بوده است باشد. به طور کلی در بیشتر مناطق جهان و از جمله ایران ژنوتیپ 3a، ژنوتیپ مرتبط با IDU اعلام شده است(۳۴-۳۱، ۱۳). تغییر در توزیع ژنوتیپ به نفع ژنوتیپ مرتبط با IDU در بسیاری از کشورها پیشنهاد شده است. این پدیده در کشورهای اروپایی مانند فرانسه، ایتالیا، اسپانیا، لهستان و هلند به صورت تغییر از ژنوتیپ ۱b و ۲ به ژنوتیپ ۳a و در شرق آسیا در کشورهایی نظیر چین به صورت تغییر از ژنوتیپ‌های ۱b و ۲a به ژنوتیپ‌های ۳ و ۶ و ژاپن از ۱b به ۲b گزارش شده است(۴۵-۳۵). در پاکستان افزایش در فراوانی ژنوتیپ ۳a دیده شده است(۴۷, ۴۶). نشان داده شده است که در ایران ساب‌تیپ ۱a، ساب‌تیپ غالب در میان دریافت‌کنندگان خون و فرآورده‌های آن است(۵۰-۴۸). افزایش سلامت خون در سال‌های اخیر می‌تواند کاهش مشاهده شده در ژنوتیپ ۱a در این مطالعه را توضیح دهد.

در این پژوهش با استفاده از روش تعیین توالی قسمتی از ناحیه NS5B ژنوم HCV و رسم درخت فیلوژنتیک، در ۱۰۶ اهداکننده، ژنوتیپ قابل تعیین بود. پایین بودن بار ویروس می‌تواند یکی از دلایل غیرقابل تعیین بودن ژنوتیپ در بقیه موارد باشد. علاوه بر این با توجه به این که ناحیه NS5B ژنوم HCV کاملاً حفاظت شده نیست، وجود جهش‌های فراوان در این ناحیه و عدم وجود شباهت بین توالی نمونه‌ها با آغازگرهای استفاده شده که باعث انجام نشدن واکنش Semi nested PCR با وجود بالا بودن بار ویروس می‌شود، می‌تواند دلیل دیگر غیر قابل تعیین بودن ژنوتیپ به ویژه در مواردی که بار ویروس بالا است، باشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تغییر در اپیدمیولوژی مولکولی عفونت HCV در اهداکنندگان آلوده به این ویروس در ایران، به صورت کاهش در فراوانی ژنوتیپ ۱a و افزایش در فراوانی ژنوتیپ‌های ۳a و ۱b باشد که در دهه قبل رخ داده است. با توجه به شیوع بالای ژنوتیپ ۳a در اهداکنندگان، بررسی ارتباط بین ژنوتیپ ویروسHCV و عوامل خطرساز آن و نیز بررسی فیلوژنتیک HCV در اهداکنندگان برای شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

راه انتقال و منشأ ویروس با ژنوتیپ ۳a و جهش‌های احتمالی موجود در توالی ژنوم ویروس، توصیه می‌شود. هم چنین با توجه به نیاز به بررسی مرتب و منظم تعیین ژنوتیپ در اهداکنندگان برای افزایش سلامتی خون، پیشنهاد می‌شود هنگام فراخوان اهداکنندگان و انجام مشاوره، از ایشان نمونه‌گیری به عمل آمده و ذخیره گردد تا نمونه مورد نیاز جهت بررسی‌های آزمایشگاهی نظیر تعیین ژنوتیپ در فواصل زمانی منظم در اختیار باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی دکترای تخصصی- پژوهشی در مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می باشد. بدین وسیله از این مؤسسه به خاطر پشتیبانی‌های مادی و معنوی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. هم چنین نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از تمام همکاران در پایگاه‌های انتقال خون سراسر کشورکه در جمع‌آوری و ارسال نمونه و پی‌گیری‌های مربوطه از هیچ‌گونه کمکی دریغ ننمودند و نیز از همکاران بخش کیت‌سازی سازمان به دلیل پشتیبانی‌های فنی اعلام می‌دارند.

References:

1- WHO. Hepatitis C Fact Sheet, update July 2019. Geneva: World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c; 2019.
2- European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. J Hepatol 2018; 69(2): 461-511.
3- WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. USA: World Health Organization; 2018.
4- Lanini S, Easterbrook PJ, Zumla A, Ippolito G. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. Clin Microbiol Infect 2016; 22(10): 833-8.
5- Alavian SM, Gholami B, Masarrat S. Hepatitis C risk factors in Iranian volunteer blood donors: A case-control study. J Gastroenterol Hepatol 2002; 17(10): 1092-7.
6- Kasraian L, Tavassoli A. Prevalence of hepatitis C and its risk factors in blood donors at Shiraz transfusion center. Koomesh 2008; 10(1): 7-12. [Article in Farsi]
7- Rezaei N, Amini-Kafiabad S , Maghsudlu M, Abolghasemi H. Risk factor analysis of hepatitis C virus seropositivity in Iranian blood donors: a case-control study. Transfusion 2016; 56(7): 1891-8.
8- Vossoughinia H, Taghi Shakeri M, Mokhtari Amirmajdi E, Abedini S. Risk Factors for Hepatitis B and C in 400 Blood Donor Volunteers in Mashhad During 2003-2007: A Case-control Study. The Horizon of Medical Sciences 2010; 15(4): 68-75. [Article in Farsi]
9- Ghaderi-Zefrehi H, Gholami-Fesharaki M, Sharafi H, Sadeghi F, Alavian SM. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Middle Eastern countries: a systematic review and meta-analysis. Hepat Mon 2016; 16(9): e 40357.
10- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, *et al*. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. J Gen Virol 2017; 98(1): 2-3.
11- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, *et al*. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology 2014; 59(1): 318-27.
12- Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J Hepatol 2014; 61(1 Suppl): S45-57.
13- Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, *et al*. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2015; 61(1): 77-87.
14- Khodabandehloo M, Roshani D. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Iranian patients: a systematic review and meta-analysis. Hepat Mon 2014; 14(12): e22915.
15- Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, Almasi-Hashiani A, Gholami-Fesharaki M, Pakzad R, Alavian SM. Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes Among Patients in Countries of the Eastern Mediterranean Regional Office of WHO (EMRO): A Systematic Review and Meta-Analysis. Hepat Mon 2016; 16(4): e35558.
16- Sali S, Alavian S, Alavi I, Laali A. Chronic Hepatitis C, Genotyping, Metabolic Status and Body Mass Index in Iranian Population. J Clin Gastroenterol Hepatol 2018; 2(1): 3.
17- Nakano T, Lu L, Liu P, Pybus OG. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. J Infect Dis 2004; 190(6): 1098-108.
18- Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. World J Hepatol 2015; 7(10): 1377-89.
19- Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5′ untranslated region sequences. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1102-12.
20- Dirani G, Paesini E, Mascetra E, Farabegoli P, Dalmo

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

B, Bartolini B, *et al*. A novel next generation sequencing assay as an alternative to currently available methods for hepatitis C virus genotyping. J Virol Methods 2018; 251: 88-91.

21- Cantaloube JF, Laperche S, Gallian P, Bouchardeau F, de Lamballerie X, de Micco P. Analysis of the 5′ noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2051-6.

22- Jacka B, Lamoury F, Simmonds P, Dore GJ, Grebely J, Applegate T. Sequencing of the hepatitis C virus: a systematic review. PloS One 2013; 8(6): e67073.

23- Leparc GF. Safety of the Blood Supply. Cancer Control 2015; 22(1): 7-15.

24- US Food & Drug Administration. Keeping blood transfusions safe: FDA's multi-layered protections for donated blood; 2015. Available from: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/keeping-blood-transfusions-safe-fdas-multi-layered-protections-donated-blood.

25- Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. Antivir Ther 2005; 10(1): 1-11.

26- Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. J Virol Methods 2003; 109(2): 187-93.

27- Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. Mammalian protein metabolism III. New York: Academic Press; 1969. p. 21-132.

28- Sharifi Z, Shooshtari MM, Kermani FR. Identification of HCV genotypes in HCV infected blood donors. Indian J Microbiol 2010; 50(3): 275-9.

29- Sefidi FJ, Keyvani H, Monavari SH, Alavian SM, Fakhim S, Bokharaei-Salim F. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Iranian chronic infected patients. Hepat Mon 2013; 13(1): e7991.

30- Mahmud S, Al-Kanaani Z, Chemaitelly H, Chaabna K, Kouyoumjian SP, Abu-Raddad LJ. Hepatitis C virus genotypes in the Middle East and North Africa: Distribution, diversity, and patterns. J Med Virol 2018; 90(1): 131-41.

31- Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, *et al*. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. J Infect Dis 1995; 171(6): 1607-10.

32- Samimi-Rad K, Toosi MN, Masoudi-nejad A, Najafi A, Rahimnia R ,Asgari F, *et al*. Molecular epidemiology of hepatitis C virus among injection drug users in Iran: a slight change in prevalence of HCV genotypes over time. Arch Virol 2012; 157(10): 1959-65.

33- Kermani FR, Sharifi Z, Ferdowsian F, Paz Z, Zamanian M. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes Among Chronic Infected Inject-ing Drug Users in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2013; 6(3): 265-8.

34- Roman F, Hawotte K, Struck D, Ternes AM, Servais JY, Arendt V, *et al*. Hepatitis C virus genotypes distribution and transmission risk factors in Luxembourg from 1991 to 2006. World J Gastroenterol 2008; 14(8): 1237-43.

35- Bourliere M, Barberin J, Rotily M, Guagliardo V, Portal I, Lecomte L, *et al*. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France: evidence in intravenous drug users. J Viral Hepat 2002; 9(1): 62-70.

36- Dal Molin G, Ansaldi F, Biagi C, D'Agaro P, Comar M, Croce L, *et al*. Changing molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in Northeast Italy. J Med Virol 2002; 68(3): 352-6.

37- Cantaloube JF, Gallian P, Attoui H, Biagini P, De Micco P, de Lamballerie X. Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3624-9.

38- Van De Laar TJ, Koppelman MH, Van Der Bij AK, Zaaijer HL, Cuijpers HTM, Van Der Poel CL, *et al*. Diversity and origin of hepatitis C virus infection among unpaid blood donors in the Netherlands. Transfusion 2006; 46(10): 1719-28.

39- Chlabicz S, Flisiak R, Kowalczuk O, Grzeszczuk A, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D, *et al*. Changing HCV genotypes distribution in Poland--relation to source and time of infection. J Clin Virol 2008; 42(2): 156-9.

40- Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. J Hepatol 2008; 48(1): 148-62.

41- Fernández DA, Iglesias MJF, Pujolràs MB, Nuñez CL, Matamala IS, Molés XQ, *et al*. Changes in the epidemiology and distribution of the hepatitis C virus genotypes in North-Eastern Spain over the last 35 years. Gastroenterol Hepatol 2018; 41(1): 2-11.

42- Zhou Y, Wang X, Mao Q, Fan Y, Zhu Y, Zhang X, *et al*. Changes in modes of hepatitis C infection acquisition and genotypes in southwest China. J Clin Virol 2009; 46(3): 230-3.

43- Toyoda H, Kumada T, Takaguchi K, Shimada N, Tanaka J. Changes in hepatitis C virus genotype distribution in Japan. Epidemiol Infect 2014; 142(12): 2624-8.

44- Chen W, Liao B, Hu F, Nie J, Lan Y, Li H, *et al*. Changing Epidemiology of Hepatitis C Virus Genotype among Patients with Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus Co-Infection in China. PloS One 2016; 11(9): e0161844.

45- Li W, Xi L, Cai Q, Kang Y, Zeng Q, Ding R, *et al*. Changes in the distribution of hepatitis C virus genotypes and their association with shifts in transmission routes in Henan, China. J Public Health 2018; 26: 157-62.

46- Butt S, Idrees M, Akbar H, ur Rehman I, Awan Z, Afzal S, *et al*. The changing epidemiology pattern and frequency distribution of hepatitis C virus in Pakistan. Infect Genet Evol 2010; 10(5): 595-600.

47- Afridi SQ, Khan N, Akmal M, Ali S, Attaullah S, Bahadar S, *et al*. Distribution of HCV Genotypes and RNA Viral Load Along with Hemato-Biochemical Analysis of HCV Patients in Rahim Yar Khan, Okara and Toba Tek Singh Districts of Punjab, Pakistan. Hepat Mon 2017; 17(7): e58442.

48- Hosseini - Moghaddam SM, Keyvani H, Kasiri H, Kazemeyni SM, Basiri A, Aghel N, *et al*. Distribution of hepatitis C virus genotypes among hemodialysis

www.SID.ir

Archive of SID

patients in Tehran--a multicenter study. J Med Virol 2006; 78(5): 569-73.

49- Samimi-rad K, Shahbaz B. Hepatitis C virus genotypes among patients with thalassemia and inherited bleeding disorders in Markazi province, Iran. Haemophilia 2007; 13(2): 156-63.

50- Alavian SM, Miri SM, Keshvari M, Elizee PK, Behnava B, Tabatabaei SV, *et al*. Distribution of hepatitis C virus genotype in Iranian multiply transfused patients with thalassemia. Transfusion 2009; 49(10): 2195-9.

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020;17(1): 1-11

Original Article

Update on HCV genotypes among Iranian blood donors

Ranjbar Kermani F.[1], Amini Kafi-Abad S.[1], Mousavi Hosseini K.[1], Maghsudlu M.[1], Sharifi Z.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Hepatitis C (HCV) infection is one of the main causes of chronic hepatitis diseases all over the world. HCV is a transfusion transmitted virus and a serious threat to general health. HCV genotyping has an important role in tracing routes of infection. This study aimed at investigating the changes in distribution pattern of HCV genotypes among Iranian blood donors.

Materials and Methods

In this cross sectional study, 239 HCV confirmed blood donors from Jun. 2015 to Nov. 2017 were included. Semi nested PCR method was used for amplifying the NS5B region of HCV genome. PCR products were sequenced and HCVgenotypes were determined by searching the sequences in Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic tree was constructed to confirm HCV genotypes. STATA 13 software was used for data analysis.

Results

In 106 (44.35% ± 6.3%) out of 239 participants, HCV genotype was determined and confirmed. In phylogenetic tree, studied sequences formed three separated clusters. Genotype 3a, 1a and 1b were the common genotypes.

Conclusions

It seems that molecular epidemiology of HCV infection did not change based on variability of genotypes but changes in the frequency of genotypes have been occurred as a result of replacement of genotype 1a by genotype 3a during the last decade among Iranian blood donors.

Key words: Hepatitis C, Genotype, Blood Donors

Received: 25 Aug 2019
Accepted: 23 Nov 2019

Correspondence: Amini Kafi-Abad S., MD. Pathologist. 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) 88601558; Fax: (+9821) 88601542
E-mail: *s.amini@ibto.ir*

www.SID.ir

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020