مقاله پژوهشی

ژنوتیپ های ویروس هپاتیت C در افراد Anti–HCV مثبت به روش RT–PCR در استان گلستان

عبدالوهاب مرادی[۱]، شهریار سمنانی[۲]، عباسعلی کشتکار[۳]، بهناز خدابخشی[۴]، وحیده کاظمی نژاد[۵]، علی اصغر مولانا[۶]، غلامرضا روشندل[۷]، سیما بشارت[۸]

[۱] دانشیار، گروه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی گرگان، گلستان، ایران
[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی گرگان، گلستان، ایران
[۳] استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی گرگان، گلستان، ایران
[۴] دانشیار، ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی گرگان، گلستان، ایران
[۵] استادیار، دانشکده پزشکی گرگان، گلستان، ایران
[۶] پژوهشگر، سازمان انتقال خون گلستان، گلستان، ایران
[۷] پژوهشگر، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، گلستان، ایران

چکیده

زمینه و هدف

ویروس هپاتیت C از عوامل اصلی ایجاد کننده بیماری های کبدی است که در ۸۰٪ موارد منجر به بیماری هپاتیت C مزمن می شود. ژنوتیپ های ویروس هپاتیت C در سرتاسر دنیا پراکندگی جغرافیایی ویژه خود را دارد. هدف این مطالعه تعیین ژنوتیپ های این ویروس در افراد Anti-HCV مثبت در استان گلستان است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی ۹۵ سرم بیمار که از نظر ویروس هپاتیت C به روش(RIBA (Recombinant strip immunoblot assay مثبت بودند مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا از نمونه ها با استفاده از کیت استخراج RNA کمپانی روچ، RNA(Roche) ویروسی استخراج و با استفاده ازکیت cDNA کمپانی فرمنتاز (Fermentase)، سنتز cDNA ژنوم ویروس با استفاده از راندوم هگزامر (Random Hexamer) صورت گرفت. سپس تمام نمونه ها با یک جفت پرایمر عمومی ویروس هپاتیتC، واکنش زنجیره ای پلی مراز[۱] (PCR) شدند. از محصول PCR اولیه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ، PCR مرحله دوم صورت گرفت و بعداز الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید در ژل داکومنتیشن قرائت گردیدند.

یافته ها

در مرحله PCR با پرایمر عمومی، ۹۱ نمونه مثبت شدند و در مرحله تعیین ژنوتیپ نیز ۱۴ نمونه با پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ شناسایی نشده و نهایتا ژنوتیپ ۷۷ نمونه مشخص گردید. نتایج از این قرار بود: ژنوتیپ ۱ و ۳ [۱a (۱۹/۵٪)، ژنوتیپ ۱b (۱۹/۵٪)، ژنوتیپ ۳a (۱۵/۶٪)، ژنوتیپ ۳b (۲۴/۷٪)]، ژنوتیپ ۲a (۲/۶٪)، ژنوتیپ ۴ (۷/۸٪) و بقیه مخلوطی از ژنوتیپ های ۱ و ۳ بودند(۶/۵٪).

نتیجه گیری

ژنوتیپ های غالب در استان گلستان ۱ و ۳ می باشند که فراوانی آنها با دیگر مناطق ایران متفاوت است ولی فراوانی ژنوتیپ ۴ با دیگر مناطق ایران هم خوانی دارد. با توجه به یافته ها در این مطالعه از نظر ژنوتیپ های شایع در استان و تفاوت فراوانی ژنوتیپ ها در قومیت های مختلف، پیشنهاد می شود این نوع مطالعات با تعداد نمونه های بیشتر و در سطح وسیع تری صورت گیرد.

کلیدواژه: هپاتیت C، ژنوتیپ، RT-PCR ، استان گلستان، ایران

گوارش/ دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ۷-۱۳

نویسنده مسئول:
گرگان، خیابان ۵ آذر، کوچه آذر چهارم، پلی کلینیک شهید نبوی، طبقه سوم، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، گلستان، ایران
تلفن و نمابر: ۰۱۷۱-۲۲۴۰۸۳۵
پست الکترونیک: s_besharat_gp@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۱
تاریخ اصلاح نهایی: ۸۹/۵/۹
تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۰

زمینه و هدف

ویروس هپاتیت C در سرتاسر دنیا ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلیون نفر را آلوده کرده است (۳-۱) و بیش از یک میلیون نفر سالانه به این ویروس آلوده می شوند. (۴)، آلوده شدن به این ویروس در ۸۰٪ موارد منجر به بیماری هپاتیت C مزمن می گردد و در ۲۰٪ این موارد سیر بیماری به سوی هپاتیت مزمن شدید و سیروز کبدی است که در دهه دوم و سوم بعد از عفونت

1-Polymerase Chain reaction

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR.

Primer b	PCR round c	Sequence (5 –3) d	Nucleotide position
Sc2	1	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG	24–3
Ac2	1	GAG(AC)GG(GT)AT(AG)TACCCCATGAG(AG)TCGGC	417–391
S7	2s	AGACCGTGCACCATGAGCAC	12–8
A5	2s	TACGCCGGGGGTCA(TG)T(GA)GGGCCCCA	343–319
Mix 1			
S7	2g	AGACCGTGCACCATGAGCAC	12–8
S2a	2g	AACACTAACCGTCGCCCACAA	40–60
G1b	2g	CCTGCCCTCGGGTTGGCTA(AG)	222–203
G2a	2g	CACGTGGCTGGGATCGCTCC	178–159
G2b	2g	GGCCCCAATTAGGACGAGAC	325–306
G3b	2g	CGCTCGGAAGTCTTACGTAC	164–145
Mix 2			
S7	2g	AGACCGTGCACCATGAGCAC	12–8
G1a	2g	GGATAGGCTGACGTCTACCT	1 96–177
G3a	2g	GCCCAGGACCGGCCTTCGCT	220–211
G4	2g	CCCGGGAACTTAACGTCCAT	87–58
G5a	2g	GAACCTCGGGGGGAGAGCAA	308–289
G6a	2g	GGTCATTGGGGCCCCAATGT	334–315

به ویروس هپاتیت C قابل تشخیص است و نهایتا ۳ تا ۸٪ بیماران دچار هپاتوسلولارکارسینوما می شود.(۱)، ویروس هپاتیت C بر اساس ردیف ژنوم دارای ۱۱ ژنوتیپ اصلی و بیش از ۷۰ زیر گروه می باشد(۵) ولی در سرتاسر دنیا روی شش تیپ اصلی مطالعات زیادی صورت گرفته است زیرا ژنوتیپ های دیگر بسیار نادر هستند. ژنوتیپ های ویروس هپاتیت C در سرتاسر دنیا پراکندگی جغرافیایی ویژه ای دارند، چنانچه ژنوتیپ های ۱،۲و۳ در همه جای دنیا، ژنوتیپ های ۴ در شمال آفریقا و خاورمیانه و ژنوتیپ های ۵ و ۶ در جنوب آفریقا و آسیا شیوع دارند.(۶)، ژنوتیپ های ۱ و ۲ بیشتر در آمریکا و اروپای غربی، ژنوتیپ ۴ در خاورمیانه و ژنوتیپ های ۵ و ۶ در جنوب آفریقا و آسیای جنوب شرقی شیوع بیشتری دارند.(۷)، مطالعه بر روی ژنوتیپ و مشخص کردن آن می تواند نگاه ما را متوجه وضعیت اپیدمیولوژیک ، پاتولوژیک و ویژگی های ویروس کند و آگاهی زمینه ای لازم را در مورد سیر بیماری، شدت بیماری و میزان پاسخ دهی به درمان فراهم آورد. نتیجه این که رژیم درمانی مناسبی برای درمان بیماری می شود به کار گرفت.(۸)، بسیاری از محققین معتقدند تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C در یک فرد آلوده در پیش آگهی بیماری، تعیین طول درمان مناسب، مانیتورینگ تاثیر دارو و نتیجه درمان از اهمیت خاصی برخوردار است(۶ و ۱۱-۹) با توجه به موارد ذکر شده، هدف این مطالعه تعیین ژنوتیپ های ویروس هپاتیت C در افراد Anti-HCV مثبت در استان گلستان بوده است.

روش بررسی

جامعه مورد مطالعه افراد Anti-HCV مثبت در استان بودندکه برای آزمایش آنتی بادی برعلیه HCV به مراکز سازمان انتقال خون مراجعه می کردند. در طی حدود ۱۴ ماه از سراسر استان به تعداد تقریبی ۳۰۰ نمونه که به روش الیزا از نظر آنتی بادی علیه HCV مثبت شده بودند به آزمایشگاه سازمان انتقال خون مرکز استان (گرگان) برای تائید آزمایش به روش RIBA آورده شد که از بین آنها ۱۱۵ بیمار به روش RIBA از نظر آنتی بادی HCV مثبت شدند که نهایتا تعداد ۹۵ نمونه برای مطالعه انتخاب گردیدند. نمونه ها بعداز تحویل گرفتن از آزمایشگاه سازمان انتقال خون تا زمان انجام آزمایش در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. از نمونه های سرم توسط کیت High pure viral RNA extraction kit ساخت کمپانی روچ (Roche) اسید نوکلئیک ویروسی استخراج گردید. سپس RNA استخراج شده با استفاده از کیت cDNA Kit ساخت کمپانی فرمنتاز (Fermentas) با استفاده از راندوم هگزامر (Random Hexamer) به cDNA تبدل گردید. با استفاده از پرایمرهای تهیه شده PCR انجام گردید. لیست پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.(۱۲)

داده های جمع آوری شده در برنامه SPSS به رایانه وارد و یافته های توصیفی با مشخص کردن شاخص های پراکندگی و مرکزی در جداول

جدول ۲: توزیع فراوانی عفونت به ژنوتیپ ها و زیرگروه های مختلف HCV بر حسب جنس در استان گلستان در سال ۱۳۸۶

متغیرها		جنس		جمع
		مذکر تعداد (٪)	مونث تعداد (٪)	تعداد (٪)
ژنوتیپ ها و زیرگروه ها	1a	(۲۰)۱۴	(۱۴/۳) ۱	(۱۹/۵)۱۵
	1b	(۱۷/۱) ۱۲	(۴۲/۹) ۳	(۱۹/۵)۱۵
	2a	(۲/۹) ۲	۰	(۲/۶) ۲
	3a	(۱۷/۱) ۱۲	۰	(۱۵/۶) ۱۲
	3b	(۲۵/۷) ۱۸	(۱۴/۳) ۱	(۲۴/۷) ۱۹
	4	(۷/۱) ۵	(۱۴/۳) ۱	(۷/۸) ۶
	1b, 3a	(۲/۹) ۲	(۱۴/۳) ۱	(۳/۹) ۳
	1a, 3b	(۲/۹) ۲	۰	(۲/۶) ۲
	3a, 3b	(۲/۹)۲	۰	(۲/۶) ۲
	1a, 1b	(۱/۴)۱	۰	(۱/۳) ۱
جمع		۷۰ (۹۰/۹)	۷ (۹/۱)	۷۷ (۱۰۰)

نمایش داده شد. برای بررسی معنادار بودن رابطه بین پراکندگی ژنوتیپ های ویروس هپاتیتC با برخی از متغیرهای مورد مطالعه مانند سن، جنس، سابقه اعتیاد و وضعیت تاهل از آزمون های آماری کای اسکوار و فیشر دقیق استفاده شد.

یافته ها

این بررسی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی گلستان بر روی ۹۵ نمونه سرم بیمار مبتلا به HCV که RIBA مثبت بودند صورت گرفت. بعداز RT-PCR نتایج نشان داد که در ۹۱ نمونه با پرایمرهای Sc_2 و Ac_2 محصولی با طول ۴۴۱ جفت باز تولید گردید.

در دور دوم PCR با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی که به نام MIX_1 و MIX_2 بر روی نمونه ها انجام شد. نتایج نشان داد با پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه ۷۷ نمونه مثبت بوده و ۱۴ نمونه غیرقابل بررسی از نظر تعیین ژنوتیپ بودند و آنالیز بر روی ۷۷ نمونه صورت گرفت. میانگین سنی ۷۷ نفر مورد بررسی ۸/۷ ± ۳۵ سال بودکه از بین آنها ۷۰ نفر (۹۰/۹٪) مرد و بقیه زن بودند. تعداد ۵۶ نفر از آنها (۷۲/۷٪) متاهل و بقیه مجرد بودند. نتایج مطالعه نشان داد ۳۱ نفر (۴۰/۳٪) افراد آلوده به ژنوتیپ یک ویروس هپاتیت C، دو نفر (۲/۶٪) آلوده به ژنوتیپ دو، ۳۳ نفر(۴۲/۹٪) آلوده به ژنوتیپ سه و ۶ نفر (۷/۸٪) آلوده به ژنوتیپ چهار و ۵ نفر (۶/۵٪) نیز هم زمان آلوده به ژنوتیپ یک و سه هستند. توزیع فراوانی عفونت HCV براساس زیر گروه ها نیز در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

نتایج مطالعه نشان داد در استان گلستان ژنوتیپ های ۱ و ۳ به ترتیب با ۴۰/۳٪ و ۴۲/۹٪ بالاترین میزان شیوع را دارند و اگر موارد عفونت هم زمان با ژنوتیپ های ۱ و ۳ را نیز به آن اضافه کنیم موارد عفونت با این دو ژنوتیپ ۸۹/۶٪ موارد را تشکیل می دهد.

در جدول شماره ۲ توزیع فراوانی ژنوتیپ ها و زیرگروه های مختلف HCV در افراد مورد مطالعه بر حسب جنس نشان داده شده است. نتایج مطالعه نشان می دهد ژنوتیپ ۱ و ۳ در خانم ها بیشتر است. با توجه به p-Value=۰/۵۰۱ از نظر عفونت به ژنوتیپ های HCV و جنس اختلاف آماری معناداری مشاهده نمی گردد. در بین مردان بالاترین میزان شیوع متعلق به ژنوتیپ ۳b با ۲۵/۷٪ و در بین زنان مربوط به ژنوتیپ ۱b با ۴۲/۹٪ می باشد. بررسی نشان داد۰/۶۳۲= p -Value بوده و ارتباط معناداری بین عفونت به ژنوتیپ یا زیرگروه خاصی با جنس دیده نمی شود.

هم چنین این بررسی نشان داد ارتباط معناداری بین عفونت به ژنوتیپ یا زیرگروه خاصی با سن بیماران وجود ندارد (p -Value >۰/۰۵) اما ژنوتیپ ۱a بیشتر در افراد کمتر از ۵۰ سال دیده می شود. عفونت هم زمان با دو ژنوتیپ نیز بیشتر در گروه سنی ۳۱ تا ۴۰ سالگی شیوع دارد.

با آزمون آماری کای دو اختلاف آماری معناداری از نظر پراکندگی بین دو جنس مشاهده نشد ولی عفونت با ژنوتیپ یک، بین مجردین و عفونت با ژنوتیپ ۳ بین متاهلین بیشتر بود. عفونت هم زمان نیز فقط در متاهلین دیده شد. از نظر پراکندگی ژنوتیپ ها و زیرگروه ها با تاهل ارتباط آماری معناداری دیده نشد (p -Value =۰/۲۰۶).

هم چنین اختلاف معناداری از نظر پراکندگی ژنوتیپ های مختلف در بین

قومیت ها دیده نشد اما با توجه به نتایج می توان گفت، ژنوتیپ یک در بین سیستانی ها و ژنوتیپ ۳ در بین ترکمن ها بیشتر از دیگر قومیت ها بوده و ژنوتیپ ۴ نیز فقط در بین فارس ها دیده می شود.

بـا توجه به تعداد کم بیماران دارای قومیت ترکمن و سیستانی، و این که ۷۲ نفر (۹۳/۵٪) کل بیماران قومیت فارس داشتند، مقایسهٔ آماری بین قومیت‌های مختلف انجام نشد. دو بیمار ترکمن دارای ژنوتیپ های ۱a و ۳b بودند، و از میان سه بیمار سیستانی، یک نفر عفونت توام۱a ، ۱b و بقیه ژنوتیپ های۱b ، ۲a داشتند. در بین قومیت فارس تمام ژنوتیپ های شناسایی شده در این مطالعه مشاهده شد.

از نظر آماری بین اعتیاد و ابتلا به ژنوتیپ خاص ارتباط معناداری دیده نشد. نتایج این بررسی نشان داد که افراد معتاد بیشتر به ژنوتیپ یک آلوده بودند ارتباط آماری معناداری بین اعتیاد و عفونت به نوع خاصی از ژنوتیپ یا زیرگروه مشاهده نشد.

بحث

مطالعه بر روی ژنوتیپ و مشخص کردن آن می تواند نگاه ما را متوجه وضعیت اپیدمیولوژیک، پاتولوژیک و ویژگی های ویروس کند و آگاهی زمینه ای لازم را در مورد سیر بیماری، شدت بیماری و میزان پاسخ دهی به درمان فراهم سازد تا رژیم درمانی مناسبی برای درمان بیماری تجویز شود(۸)، بسیاری از محققین معتقدند تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C در یک فرد آلوده در پیش آگهی بیماری، تعیین طول درمان مناسب، مانیتورینگ تاثیر دارو و نتیجه درمان از اهمیت خاصی برخوردار است.(۶ و۱۱-۹)

نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ ۱ و ۳ بیشترین میزان را در افراد مورد بررسی در استان گلستان دارند که در این میان، ژنوتیپ ۱a (۱۹/۵٪)، ژنوتیپ ۱b (۱۹/۵٪)، ژنوتیپ ۲a (۲/۶٪)، ژنوتیپ ۳a (۱۵/۶٪)، ژنوتیپ ۳b (۲۴/۷٪)، ژنوتیپ ۴ (۷/۸٪) و بقیه مخلوطی از ژنوتیپ های ۱، ژنوتیپ های ۳ و ژنوتیپ های ۱ و ۳ بودند.

مطالعه ای که بر روی ۱۲۵ نمونه جمع آوری شده از جنوب، شمال غرب ایران و تهران صورت گرفت نشان داد ژنوتیپ ۱a (۴۷٪)، ژنوتیپ ۳a (۳۶٪)، ژنوتیپ ۱b (۸٪) و ژنوتیپ ۴ (۷٪) بوده است. از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ غالب در جنوب ایران ۱a(۷۰٪) و در شمال غرب ایران ۳a (۸۳٪) بوده و انتقال ژنوتیپ ۱a در ۵۷٪ موارد از طریق دریافت خون بوده است. در میان معتادان تزریقی در تهران ژنوتیپ ۳a، ۵۴٪ یافت شد و ژنوتیپ ۴ نیز در میان دیالیزی ها در تهران یافت شد.(۱۳)

یافته های مطالعه ما در مقایسه با یافته های فوق نشان می دهد در هر دو مطالعه فراوانی ژنوتیپ ۴ با همدیگر هم خوانی دارند و در مطالعه ما در بین معتادان تزریقی ژنوتیپ یک، ژنوتیپ غالب بوده است و تنها در یک نمونه دیالیزی مطالعه ما ژنوتیپ یافت شده ژنوتیپ ۱a بود. در مورد بقیه ژنوتیپ ها نیز اختلاف ممکن است وابسته به تفاوت منطقه جغرافیایی مورد مطالعه، اختلاف فرهنگی و عادات بهداشتی مناطق مورد بررسی باشد به هر صورت در مطالعه ما ژنوتیپ غالب یافت شده ژنوتیپ ۱ و ۳ بوده است.

مطالعه دیگری در ایران بر روی ۱۵ نمونه صورت گرفته که ژنوتیپ ۱a در هفت مورد(۴۶/۷٪)، ژنوتیپ ۳a در چهار نمونه (۲۶/۷٪)، ژنوتیپ ۱b در سه نمونه (۲۰٪) و ژنوتیپ ۴ در یک نمونه (۶/۷٪) دیده شد.(۱۴)

نتایج مطالعه ما در مورد ژنوتیپ ۴ با نتیجه مطالعه فوق هم خوانی دارد ولی به دلیل نمونه کم مطالعه مذکور کمتر می توان این مقایسه را انجام داد. مطالعه ای در آذربایجان شرقی بر روی ۵۵ بیمار صورت گرفته و نتایج آن نشان داد ژنوتیپ ۱ در۷/ ۸۳ ٪ موارد و ژنوتیپ ۳ در ۵/۵٪ موارد یافت شده و ژنوتیپ غالب نیز ۱a بوده است.(۱۵)، مطالعه حاضر نشان داد که نمونه های مورد مطالعه در ۴۰/۲٪ موارد به ژنوتیپ ۱ و در ۴۲/۹٪ موارد به ژنوتیپ ۳ مربوط بوده و ژنوتیپ غالب نیز ژنوتیپ ۳a بوده است. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه آذربایجان شرقی هم خوانی ندارد که به نظر می رسد با توجه به ویژگی پراکندگی جغرافیایی HCV این مسئله طبیعی باشد.

در ایران مطالعه ای بر روی ۲۲۳۱ بیمار مبتلا به هپاتیت C برای تعیین ژنوتیپ صورت گرفته و ژنوتیپ ۱a در ۳۹/۷٪ ژنوتیپ ۳a (۲۷/۵٪) و ژنوتیپ ۱b (۱۲/۱٪) بوده است. این مطالعه نتیجه گیری کرده که ژنوتیپ غالب در ایران ۱a است.(۱۶)، در بررسی ما فراوانی ۱a (۱۹/۵٪)، فراوانی ۳a (۱۵/۶٪) و فراوانی ۱b (۱۹/۵٪) بوده است و زیرگروه غالب در این بررسی ۳b با (۲۴/۷٪) بوده است. گفتنی است ممکن است مطالعات در حجم های بالاتر در این منطقه نیز میزان فراوانی های به دست آمده را تغییر دهد. در مطالعه ای که در استان مرکزی صورت گرفته ۹۸ بیمار تالاسمیک و ۷۶ بیمار دیالیزی مورد بررسی قرار گرفت و ژنوتیپ ۱ در ۵۰٪ موارد، ژنوتیپ ۳ در ۱۸/۲٪ موارد، ژنوتیپ ۲ در۴/۵٪ موارد و در ۲۷/۳٪ موارد ژنوتیپ مخلوط بوده که ۹/۲٪ موارد آن مربوط به ژنوتیپ های ۱ و ۴ بوده است.(۱۷)، مطالعه فوق در بیماران تالاسمیک و دیالیزی صورت گرفته ولی در مطالعه ما فقط یک نفر دیالیزی وجود داشت که آلوده به ژنوتیپ ۱a بود ولی مطالعه مذکور از نظر یافتن ژنوتیپ دو با مطالعه ما هم خوانی دارد و وجود ژنوتیپ ۲ را در بین بیماران ایرانی مورد تائید قرار می دهد.

در مطالعه ای که در تهران بر روی ۱۵۶ نمونه صورت گرفته ژنوتیپ ۱ در ۵۵/۸٪ موارد و ژنوتیپ ۳ در ۲۸/۸٪ موارد یافت شد. زیرگروه های HCV دراین مطالعه به ترتیب ۱a در (۳۷/۸٪)، ۳a در(۲۸/۹٪) و ۱b در (۱۶/۷٪) بود.(۱۸)، مطالعه ای که بر روی ۶۲ نمونه در عربستان سعودی انجام شده و در ۶۴/۵٪ موارد ژنوتیپ ۴ و در۳۰/۶٪ موارد ژنوتیپ ۱ یافت شده است.(۱۹)، مطالعه ای در لبنان بر روی ۷۷ نمونه صورت گرفته و مشخص شده ژنوتیپ ۱ در ۱۹/۵٪ و ژنوتیپ ۲ در ۳۲/۵٪ موارد و ژنوتیپ ۳ در ۵/۱٪ موارد و ژنوتیپ ۴ در ۱۰/۴٪ موارد یافت شده است.(۲۰)، در مطالعه ای که بر روی نمونه های عربستان و بحرین انجام شد مشخص گردید که ژنوتیپ های شایع در بحرین ۱a، ۱b و ۴ بوده و ژنوتیپ های شایع در عربستان به ترتیب ۲a, ۲ و ۴ بوده است.(۲۱)، مطالعه ای در ترکیه بر روی ۳۶۵ نفر صورت گرفته و در ۸۴٪ ژنوتیپ ۱b و در ۱۱٪ موارد ژنوتیپ ۱a و در ۳٪ موارد

ژنوتیپ ۲ و در ۱٪ موارد ژنوتیپ ۳ و در ۱٪ مواردنیز ژنوتیپ ۴ یافت شده است این مطالعه معتقد است ژنوتیپ غالب در ترکیه ژنوتیپ ۱b است.(۲۲) در مجموع می توان نتیجه گرفت نتایج مطالعات فوق نیز از نظر پراکندگی ژنوتیپ های شایع در منطقه با مطالعات صورت گرفته در ایران و مطالعه ما هم خوانی دارد و می توان از ژنوتیپ های ۱، ۳، ۴ و ۲ به عنوان ژنوتیپ های شایع نام برد. این بررسی نشان داد ژنوتیپ ۱ در خانم ها و ژنوتیپ ۳ در آقایان بیشتر است که در مطالعات دیگر کمتر به این مسئله پرداخته شده است. در بین مردان بالاترین میزان شیوع متعلق به ژنوتیپ ۳b با ۲۵/۷٪ و در بین زنان مربوط به ژنوتیپ ۱b با ۴۲/۹٪ بوده است. براساس نتایج این مطالعه، ژنوتیپ ۱a در افراد کمتر از ۵۰ سال دیده می شود و ژنوتیپ ۴ نیز تا ۴۰ سالگی مشاهده می گردد. عفونت هم زمان با دو ژنوتیپ نیز در گروه سنی ۳۱ تا ۴۰ سالگی شیوع بیشتری دارد. ولی در مطالعه ای در کشور ایتالیا که بر روی ۵۰ نمونه صورت گرفته، ژنوتیپ ۱b در تمام سنین و ژنوتیپ ۲a بیشتر در بزرگسالان و ژنوتیپ ۳a فقط در بزرگسالان دیده شده است.(۲۳)، اختلاف آماری معناداری از نظر پراکندگی بین دو جنس مشاهده نشد ولی عفونت با ژنوتیپ ۱، بین مجردین و عفونت با ژنوتیپ ۳ بین متاهلین بیشتر می باشد. عفونت هم زمان نیز فقط در متاهلین دیده می شود. آنچه داده ها به دست می دهد این است که ژنوتیپ ۱ در بین سیستانی ها، ژنوتیپ ۳ در بین ترکمن ها بیشتر از دیگر قومیت ها می باشد و ژنوتیپ ۴ نیز فقط در بین فارس ها دیده می شود. ممکن است این نتایج ناشی از تعداد کم نمونه های گرفته شده از قومیت های مختلف باشد و هم چنین به ریسک فاکتور های مختلفی مربوط شود که به دلیل اختلاف فرهنگی و عادات اجتماعی و بهداشتی بین آنها وجود دارد.

نتایج این بررسی نشان می دهد افراد معتاد بیشتر به ژنوتیپ ۱ آلوده اند. ولی در تهران در میان معتادان تزریقی ژنوتیپ ۳a، ۵۴٪ بوده و در میان دیالیزی ها ژنوتیپ ۴ یافت شده است(۱۳)، هم چنین در مطالعه ای در ایتالیا مشخص شده است ژنوتیپ های ۳ و۴ بیشتر در معتادان تزریقی و مهاجران مشاهده می شود.(۲۳)

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه می تواند در مدیریت درمان این بیماری مدنظر قرار گیرد. در پایان پیشنهاد می شود این گونه مطالعات در مقیاس وسیع تری انجام شوند تا بتوان نتیجه گیری دقیق تری از آن به دست آورد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان جهت حمایت مالی این طرح پژوهشی اعلام داشته و از کلیه همکارانی که در جمع آوری داده ها ما را یاری رساندند نیز کمال سپاسگزاری را دارند.

REFERENCES

1. Michielsen PP, Francque SM, van Dongen JL. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005;20:27.
2. Oguz D, Cicek B, Filik L, Odemis B, Kilic M, Altintas E, et al. Effect of interferon and ribavirin combined with amantadine in interferon and ribavirin non-responder patients with chronic hepatitis C (genotype 1).*World J Gastroenterol* 2005;11:580-3.
3. Mukaide M, Tanaka Y, Kakuda H, Fujiwara K, Kurbanov F, Orito E, et al. New combination test for hepatitis C virus genotype and viral load determination using Amplicor GT HCV MONITOR test v2.0. *World J Gastroenterol* 2005;1:469-75.
4. Shinji T, Kyaw YY, Gokan K, Tanaka Y, Ochi K, Kusano N, et al. Analysis of HCV genotypes from blood donors shows three new HCV type 6 subgroups exist in Myanmar. *Acta Med Okayama* 2004;58:135-42.
5. Il'ina EN, Malakhova MV, Generozov EV, Govorun VM, Archakov AI, Pokrovskii VI. Using the mass spectrometry analysis for hepatitis C virus typing. *Biomed Khim* 2005;51:41-7.
6. Amorim RM, Oliveira CP, Wyant PS, Cerqueira DM, Câmara GN, Flores LS,et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:895-7.
7. Raghuraman S, Shaji RV, Sridharan G, Radhakrishnan S, Chandy G, Ramakrishna BS,et al. Distribution of the different genotypes of HCV among patients attending a tertiary care hospital in south India. *J Clin Virol* 2003;26:61-9.
8. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 2005;10:1-11.
9. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V,et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:41-9.
10. Kim YJ, Kim SO, Chung HJ, Jee MS, Kim BG, Kim KM,et al. Population genotyping of hepatitis C virus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of short DNA fragments. *Clin Chem* 2005;51:1123-31.
11. Nemcová J, Nemecek V.HCV genotyping by combination of the Cobas Amplicor HCV 2.0 test and the reverse hybridization Versant HCV Genotype Assay. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2005;54:34-8.
12. Ohno O, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba K, Orito E,et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J Clin Microbiol* 1997;35:201-7.
13. Samimi-Rad K, Nategh R, Malekzadeh R, Norder H, Magnius L. Molecular epidemiology of hepatitis C virus in Iran as reflected by phylogenetic analysis of the NS5B region. *J*

Med Virol 2004;74:246-52.
14. Zali MR, Mayumi M, Raoufi M, Nowroozi A. Hepatitis C virus genotypes in the Islamic Republic of Iran: a preliminary study. *East Mediterr Health J* 2000;6:372-7.
15. Somi MH, Keivani H, Ardalan MR, Farhang S, Pouri AA. Hepatitis C virus genotypes in patients with end-stage renal disease in East Azerbaijan, Iran. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008;19461-5.
16. Keyvani H, Alizadeh AH, Alavian SM, Ranjbar M, Hatami S. Distribution frequency of hepatitis C virus genotypes in 2231 patients in Iran. *Hepatol Res* 2007;37:101-3.
17. Samimi-Rad K, Shahbaz B. Hepatitis C virus genotypes among patients with thalassemia and inherited bleeding disorders in Markazi province, Iran. *Haemophilia* 2007;13:156-63.
18. Kabir A, Alavian SM, Keyvani H. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients infected by different sources and its correlation with clinical and virological parameters: a preliminary study. *Comp Hepatol* 2006;5:4.
19. Liang C, Rieder E, Hahm B, Jang SK, Paul A, Wimmer E. Replication of a novel subgenomic HCV genotype 1a replicon expressing a puromycin resistance gene in Huh-7 cells. *Virology* 2005;333:41-53.
20. Irani-Hakime N, Samaha H, Almawi W, Nasr E, Mokhbat J, Abou Jaoude M,et al. Prevalence of hepatitis C virus isolate genotypes from chronically infected Lebanese patients: a hospital-based study. *J Med Liban.* 2003;51:121-6.
21. Qadi AA, Tamim H, Ameen G, Bu-Ali A, Al-Arrayed S, Fawaz NA,et al. Hepatitis B and hepatitis C virus prevalence among dialysis patients in Bahrain and Saudi Arabia: a survey by serologic and molecular methods. *Am J Infect Control* 2004;32:493-5.
22. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Sengezer T, Wend U,et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004;149:2115-29.
23. Margraf RL, Erali M, Liew M, Wittwer CT. Genotyping hepatitis C virus by heteroduplex mobility analysis using temperature gradient capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2004;42:4545-51.

Original Article

Distribution of Hepatitis C Virus Genotype among HCV Infected Patients in Golestan Province, Iran

Moradi A[1], Semnani SH[2], Keshtkar AA[3], Khodabakhshi B[4], Kazeminejad V[5], Molana AA[6], Roshandel GH[7], Besharat S[7]

[1]Associate Professor, Department of Virology, Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[2]Associate Professor, Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[3]Assistant Professor, Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[4]Associate Professor, Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[5]Assistant Professor, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[6]Researcher, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
[7]Researcher, Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology. Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran

ABSTRACT

Background: Hepatitis C virus (HCV) is one of the main causative factors of liver disease which can lead to chronic hepatitis C infection in 80% of cases. HCV genotypes have a special worldwide geographic distribution. The goal of the present study was to detect HCV genotypes in patients with anti-HCV positive titers in Golestan Province, Iran.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 95 positive HCV samples as detected by RIBA were evaluated. Viral RNA was extracted with a Roche extraction kit and the Fermentase cDNA kit Random hexamer primers was used for viral genomic cDNA synthesis. PCR was performed on all samples by a general pair of primers. Second-step PCR was done with specific primers, and the results were obtained following electrophoresis in 1.5% agarose gel and ethidium bromide staining in documentation gel.

Results: General primer PCR revealed 91 positive samples. Assessment of 77 samples determined that the following genotypes were present: 1 and 3 [1a (19.5%), 1b (19.5%), 3a (15.6%), 3b (24.7%)], 2a (2.6%), 4 (7.8%). The remaining samples were a mixture of genotypes 1 and 3 (6.5%).

Conclusion: The ingmost prevalent genotypes found were types 1 and 3 in Golestan Province. This distribution pattern differed from other areas in Iran, however genotype 4 was in accordance with other studies. Genotype 2 was only reported in this study and a study in Tehran. Thus, additional, larger studies of HCV genotypes should be performed for further analysis of genotypic distribution patterns.

Keywords: **HCV, genotype, RT-PCR, Golestan Province, Iran**

Govaresh/ Vol.15, No.1, Spring 2010: 7-13

Corresponding author:
3rd floor, Shahid Nabavi Polyclinic, 4th Azar alley, 5 Azar St, Gorgan,
Golestan Province, Iran
Tel: + 98 171 2240835
Fax: + 98 171 2269210
E-mail: S_besharat_gp@yahoo.com

Received: 1 June 2010
Edited: 31 July 2010
Accepted: 28 Aug. 2010