خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۷ شماره ۴ زمستان ۹۹ (۲۷۵-۲۷۰)

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در اهداکنندگان خون مبتلا به هپاتیت B فاقد علائم در شهر تهران در سال ۱۳۹۸-۱۳۹۷

مریم قنبری مطلوب[۱]، زهره شریفی[۲]

چکیده

سابقه و هدف

عفونت هپاتیت B ، یکی از عمده‌ترین بیماری‌های منتقل شونده از راه انتقال خون است. عفونت با این ویروس منجر به آسیب‌های گسترده کبدی می‌شود. تاکنون ۱۰ ژنوتیپ برای هپاتیت B تشخیص داده شده است. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B با روش تعیین توالی در اهداکنندگان خون بدون علامت در شهر تهران سال ۹۸-۹۷ بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، سرم خون ۲۰ نفر از اهداکنندگان خون که از نظر آزمایش آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B با روش الایزا مثبت تشخیص داده شده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از استخراج DNA ویروسی، توالی ژن *pres* به وسیله روش Nested-PCR تکثیر و ژنوتیپ ویروس با روش تعیین توالی تعیین شد. توالی به دست آمده به وسیله نرم‌افزار Clustal w با توالی‌های رفرانس مرتب شد.

یافته‌ها

نمونه‌ها پس از انجام Nested-PCR تعیین توالی شدند. ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در تمام ۲۰ نمونه اهداکننده خون مبتلا به هپاتیت B ، ۱۰۰٪ ژنوتیپ D تعیین گردید.

نتیجه گیری

شیوع ژنوتیپ D در افراد مورد مطالعه ۱۰۰٪ بود. از این نتیجه می‌توان در تهیه کیت‌های تشخیصی هپاتیت B استفاده کرد. هم‌چنین شناسایی ژنوتیپ‌ها می‌تواند به پزشکان کمک کند که بیماران با خطر بیشتر پیشرفت بیماری را شناسایی نموده و استراتژی‌های درمانی بهتری را به کار گیرند.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت B ، ژنوتیپ، اهداکنندگان خون

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۲۲

۱- کارشناس ارشد زیست فناوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

مقدمه

هپاتیت B یکی از شایع‌ترین عفونت‌های ویروسی در انسان است و عامل یکی از شدیدترین عفونت‌های ویروسی کبدی در جهان می‌باشد. این ویروس عامل اصلی سرطان کبد بوده و به عنوان دهمین عامل مرگ و میر در جهان اعلام شده است. در حال حاضر این بیماری به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان تلقی می‌شود. این بیماری بسیار مسری است و به طور عمده از طریق انتقال خون، روش‌های تزریق ناامن، تماس جنسی و انتقال مادر به کودک منتقل می‌شود(۱). عفونت با هپاتیت B می‌تواند با نتایج بالینی متفاوتی از حامل بدون علامت گرفته تا سیروز کبدی و سرطان کبد(HCC) همراه باشد. به طور متوسط حدود ۲۵ درصد از افراد مبتلا به عفونت هپاتیت B مزمن که تحت درمان قرار نمی‌گیرند، به خاطر مشکلات ناشی از سیروز کبدی یا هپاتوسلولار کارسینوما جان خود را از دست می‌دهند(۲). ژنوم ویروس HBV دارای چهار قالب خوانش باز(Open reading frame : ORF)، شامل preS-S ، precore-core ، pol و x که دارای هم‌پوشانی هستند و در مجموع ۷ پلی‌پپتید را کد می‌کنند، می‌باشد. preS-S از سه ناحیه preS2, preS1 و s تشکیل شده که پروتئین‌های پوشش ساختاری ویروس به نام‌های L, M و S را کد می‌کنند. به طور خاص، مناطق preS1 و preS2 متغیرترین توالی ژنوم ویروسی به نظر می‌رسند. جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه در ژن‌های preS ویروس هپاتیت B در میان حامل‌های غیر فعال شناسایی شده‌اند. ناحیه preS با پلیمراز ویروس دارای همپوشانی است و موتاسیون‌هایی که در preS اتفاق می‌افتد، می‌تواند در فعالیت آنزیم پلیمراز تاثیر بگذارد(۳).

نتیجه عفونت HBV به نحوه انتقال، عوامل ژنتیکی میزبان، ژنوتیپ ویروسی و جهش‌های سازگار و هم‌چنین عوامل محیطی وابسته است. چندین مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی ارتباط بین ژنوتیپ‌های HBV و نتایج مختلف اپیدمیولوژیکی، ویروسی و بالینی عفونت را گزارش کرده‌اند(۴). HBV را می‌توان در حداقل ده ژنوتیپ طبقه‌بندی کرد، با نام‌های A–J و چهار زیرگروه اصلی ayw، ayr ، adw و adr که مربوط به توزیع جغرافیایی است. ژنوتیپ غالب HBV در بین بیماران مبتلا به عفونت HBV در آمریکای شمالی، شمال غربی اروپا و آفریقا A است، در حالی که ژنوتیپ B و C غالباً در چین و ژاپن یافت می‌شود. ژنوتیپ D مشهورترین ژنوتیپی است که به طور گسترده به ویژه در کشورهای مدیترانه، خاورمیانه و جنوب آسیا توزیع می‌شود(۵). ژنوتیپ C در بیماران سیروزی شایع است. ژنوتیپ A اغلب منجر به مزمن شدن بیماری می‌شود و ژنوتیپ D معمولاً در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی شایع است. ژنوتیپ C پاسخ به درمان کمتری به داروهای ضد ویروسی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد تنوع ژنوتیپی ویروس هپاتیت B بر الگوهای بالینی متفاوت از عفونت، شدت بیماری، پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان مؤثر بوده و آگاهی از توزیع ژنوتیپ‌های HBV از اهمیت بالایی در برنامه واکسیناسیون و درمان‌های ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماری برخوردار می‌باشد(۷، ۶). برای تعیین ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود مانند توالی‌یابی، PCR RFLP و PCR Probe-Assay با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که در حال حاضر تعیین توالی، دقیق ترین روش می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در اهداکنندگان مبتلا به هپاتیت B بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام گرفته یک مطالعه مقطعی بود که در آزمایشگاه ویروس‌شناسی مرکز رشد سازمان انتقال خون تهران در سال ۱۳۹۸–۱۳۹۷ صورت گرفت. در این مطالعه از نمونه‌های خونی که جهت انجام آزمایش‌های غربالگری اهدای خون در لوله‌های حاوی EDTA از افراد دریافت شده بود، استفاده شد. از تمامی شرکت‌کنندگان در این مطالعه رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. نمونه‌های مورد استفاده همگی HBsAg مثبت و به صورت تصادفی ساده جهت مطالعه انتخاب شدند. پس از جداسازی بافی‌کوت و پلاسما، نمونه‌های سرم در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲۰ نمونه از اهداکنندگان خون پایگاه انتقال خون تهران که از لحاظ سرولوژی HBsAg مثبت بودند، جهت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

جدول ۱: لیست آغازگرهای مورد استفاده در روش Nested-PCR

نام ژن	توالی آغازگر	طول	TM	GC%	طول محصول
S out	F: GGGTCACCTTATTCTTGGGA	۲۰	۵۶/۵۱	۵۰	۵۷۷
	R: CCCGCCTGTAACACGAGC	۱۸	۶۰/۶۱	۶۶/۶۷	
S in	F: TTGGGAACAAGATCTACAGC	۲۰	۵۵/۰۶	۴۵	۵۳۱
	R: GTCCTGATGCGATGTTCTCC	۲۰	۵۸/۴۲	۵۵	

استخراج DNA ویروسی استفاده شدند.

پس از استخراج DNA ویروسی به منظور تولید مقدار زیادی از ژنوم ویروس، از روش Nested-PCR استفاده شد. جهت انجام PCR مراحل اول و دوم به ترتیب از دو جفت آغازگر S out و S in استفاده شد(جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵میکرولیتر صورت گرفت. به منظور انجام PCR ، مواد مورد نیاز در میکروتیوپ‌های استریل ۰/۲ mL ریخته شد و در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفت(جدول ۲). پس از اتمام PCR اول، ۱/۵ میکرولیتر از محصول آن به عنوان الگو جهت انجام PCR دوم استفاده شد.

چرخه دمایی در مرحله اول PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. سپس واکنش طی ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به مدت ۳۵ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن به مدت ۵۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت طویل شدن رشته ساخته شده به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت.

چرخه دوم در مرحله دوم Nested-PCR با همان چرخه دمایی مرحله اول انجام گرفت. پس از اتمام PCR مرحله دوم محصول مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و پس از اطمینان از تکثیر صحیح قطعه مورد نظر، محصول PCR جهت تعیین توالی ارسال شد. جهت تعیین موتاسیون‌های ویروس، فایل‌های توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای Chromas ، DNA Baser ، NCBI BLAST و سرور آنلاین Genafor مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲: مواد مورد نیاز جهت انجام مرحله اول Nested-PCR با حجم نهایی ۲۵ µL

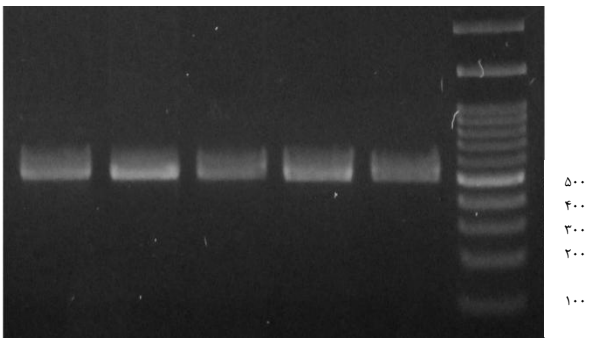
ماده مورد استفاده	حجم/µL
Master mix (Amplicon)	۱۲/۵
S out Forward Primer (10 picomol/µL)	۱
S out Reverse Primer (10 picomol/µL)	۱
DNA (100-300 ng /µL)	۳
DW H_2O	۷/۵

یافته‌ها

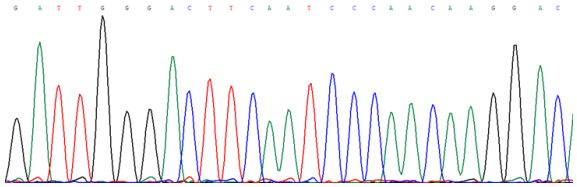
جمعیت مورد مطالعه شامل ۱۸ نفر مرد(۹۰٪) و ۲ نفر زن(۱۰٪) بود که همگی در محدوده سنی ۷ ± ۳۶/۵ سال قرار داشتند و از نظر آنتی‌ژن سطحی ویروس، HBsAg مثبت بودند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی ژن *pres* آزمایش Nested-PCR بر روی آن‌ها انجام شد. محصول نهایی Nested-PCR با طول قطعه ۵۳۱ جفت باز بود و سپس تعیین توالی صورت گرفت(شکل‌های ۱ و ۲).

پس از آنالیز توالی‌ها توسط نرم‌افزار، تمامی ۲۰ ایزوله با استفاده از نرم‌افزار BLAST در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از بیشترین امتیاز بر اساس جفت شدن(matching) بازها، توالی ایزوله‌های HBV اهداکنندگان با ایزوله‌هایی از کشورهای بلاروس، قزاقستان، ازبکستان، هند و چین به طور نزدیکی یعنی حدود ۸۸٪–۸۷٪ از نظر توالی نوکلئوتیدها شباهت داشتند و در گروه ژنوتیپ D ، ساب‌ژنوتیپ D1 قرار گرفتند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]



شکل ۱ : الکتروفورز محصول نهایی Nested-PCR ژن *pres* ویروس هپاتیت B با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که طول قطعه محصول PCR ۵۳۱ جفت باز بود.



شکل ۲: کروماتوگرام قسمتی از محصول PCR ژن *pres* ویروس هپاتیت B که تعیین توالی شده است.

بحث

تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه، دارای ژنوتیپ D و ساب ژنوتیپ D1 بودند. در مطالعه‌ای که توسط نوده و همکارانش از ژنوتیپ HBV در مشهد در سال ۲۰۱۸ صورت گرفت نیز، تنها ژنوتیپ گزارش شده در این منطقه ژنوتیپ D بود که با نتایج ما هم راستا بود(۵). در مطالعه دیگری که خیرآبادی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در بندرعباس انجام دادند، ژنوتیپ گزارش شده از HBV ژنوتیپ D و ساب ژنوتیپ D1 بود که با نتایج به دست آمده از مطالعه ما همسو می‌باشد(۸). در مطالعه‌ای که پورکریم و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی اهداکنندگان مبتلا به هپاتیت B فاقد علائم در شهر تهران انجام دادند، ژنوتیپ D تنها ژنوتیپ شایع در گروه مورد مطالعه گزارش شد که با نتایج مطالعه ما، هم راستا می‌باشد(۹).

ژنوتیپ ویروس هپاتیت B ، پراکندگی خاص جغرافیایی در مناطق مختلف دنیا و حتی در یک ناحیه دارد که ابزار بسیار با ارزشی برای بررسی الگوهای انتقال این ویروس با روش‌های مولکولی است. مطالعه ساختار و کارکردهای مختلف بین ژنوتیپ‌های مختلف HBV در مورد هر یک از ژنوتیپ‌ها، بررسی شدت بیماری ایجاد شده، عوارض بیماری، پاسخ به درمان و پاسخ به واکسن را سان‌تر می‌نماید و در کنترل بیماری می‌تواند کمک مؤثری باشد(۱۰). توزیع جهانی خاصی از ژنوتیپ‌های HBV با حالت‌های مختلف انتقال همراه است برای مثال در ژنوتیپ C و B که شیوع بیشتری در کشورهای آسیایی دارند، انتقال مادر به کودک نقش مهمی در پراکندگی HBV دارد در حالی که سایر ژنوتیپ‌ها در مناطقی مشاهده می‌شوند که انتقال از طریق ارتباط جنسی و انتقال خون مسیر شایع انتقال عفونت هستند(۱۱). نمای آسیب شناسی بالینی و نتیجه عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است. از طرفی گزارش می شود نوع ژنوتیپ‌ها در پیامد بالینی آن‌ها مهم است و می‌توان از این قبیل موارد، به مثال‌هایی مانند پاسخ به درمان و سیر بیماری به طرف مزمن شدن اشاره کرد(۱۲). تعیین ژنوتیپ، یک شاخص ژنتیکی برای ژنوم بوده که ژن‌ها بر پایه حذف شدن، اضافه شدن و جانشینی نوکلئوتیدها طبقه‌بندی می‌شوند. این اطلاعات ژنوتیپی، گونه‌های ویژه ویروسی و رفتارهای مولکولی گونه را تعیین می‌نماید و برای نتایج کلینیکی مفید و سودمند می‌باشد(۱۳).

بانک‌های اطلاعاتی کافی از اپیدمیولوژی مولکولی HBV برای پیشگیری از عفونت و برنامه‌های درمانی بسیار مهم هستند. از یافته‌های این مطالعه می‌توان جهت تهیه کیت‌های تشخیصی و بهبود برنامه‌های غربالگری در کشور استفاده کرد. از آن جایی که نوع ژنوتیپ می‌تواند با نتایج کلینیکی متفاوتی همراه باشد، تعیین نوع ژنوتیپ ویروس می‌تواند به عنوان بیومارکر ویروسی جهت پیش‌بینی روند بیماری مورد استفاده قرار گیرد البته تعداد نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه ما کم بوده و تنها محدود به شهر تهران می‌باشد. بدیهی است که برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر لازم است از جامعه آماری بزرگتری در مناطق مختلفی از کشور استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

ژنوتیپ تعیین شده در مطالعه در تمامی ایزوله‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

ژنوتیپ D تعیین شد. با توجه به این که نوع ژنوتیپ ویروس و موتاسیون‌های رخ داده در ژنوم آن می‌توانند در نتایج بالینی و انتخاب نوع روش درمان مؤثر باشند، بنابراین نتایج این گونه مطالعه‌ها جهت تعیین ژنوتیپ شایع ویروس در جامعه ارزشمند است. به علاوه جهت 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، می‌توان از نتایج این مطالعه‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه از پایان‌نامه مصوب در مرکز تحقیقات انتقال خون مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران در مقطع کارشناسی ارشد پس از تأیید کمیته اخلاق به شماره IR.TMI.REC.1397.039 مؤسسه حاصل شده است. در نهایت از خانم پاز کارشناس آزمایشگاه ویروس‌شناسی و پرسنل پایگاه انتقال خون تهران جهت کمک در تهیه نمونه‌ها تشکر به عمل می‌آید.

References:

1- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. Lancet 2002; 2(7): 395-403.
2- Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Viruses 2017; 9(4): 75.
3- Poustchi H, Mohamadkhani A, Bowden S, Montazeri G, Ayres A, Revill P, *et al*. Clinical significance of precore and core promoter mutations in genotype D hepatitis B-related chronic liver disease. J Viral Hepat 2008; 15(10): 753-60.
4- Altaf A, Shah SA, Zaidi NA, Memon A, Nadeem ur R, Wray N. High risk behaviors of injection drug users registered with harm reduction programme in Karachi, Pakistan. Harm Reduct J 2007; 4(1): 7.
5- Nodeh MM, Mosavat A, Valizadeh N, Zadeh AM, Boskabadi A, Mashkani B, *et al*. Genotype characteristic and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in northeast-Iran. Infect Genet Evol 2018; 59: 148-54.
6- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. J Gen Virol 2002; 83(Pt 6): 1267-80.
7- Pettersson JH, Myking S, Elshaug H, Bygdas KIE, Stene-Johansen K. Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Norway. BMC Infect Dis 2019; 19(1): 236.
8- Kheirabad AK, Farshidfar G, Nasrollaheian S, Gouklani H. Prevalence and Characteristics of Precore Mutation in Iran and Its Correlation with Genotypes of Hepatitis B. Electronic Physician 2017; 9(4): 4114.
9- Pourkarim MR, Sharifi Z, Soleimani A, Amini-Bavil-Olyaee S, Elsadek Fakhr A, Sijmons S, *et al*. Evolutionary analysis of HBV "S" antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study. J Med Virol 2014; 86(1): 144-55.
10- Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. Vaccine 2005; 23(19): 2409-23.
11- Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26 Suppl 1:123-30.
12- Attaran MS, Hosseini SM, Fakhari J, Sharifi Z. Serological and molecular characterization of hepatitis B virus in asymptomatic blood donors in Iran. Iran J Microbiol 2018; 10(1): 59-64.
13- Mozhgani SH, Malekpour SA, Norouzi M, Ramezani F, Rezaee SA, Poortahmasebi V, *et al*. Molecular evolution and phylodynamics of hepatitis B virus infection circulating in Iran. Arch Virol 2018; 163(6): 1479-88.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020;17 (4): 270-275

Original Article

Hepatitis B virus genotyping in asymptomatic HBV blood donors in Tehran

Ghanbari Matloob 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 B virus (HBV) infection remains a serious global health challenge. Hepatitis B infection is one of the major diseases transmitted by blood transfusion. Infection with the virus can cause extensive liver damage. So far, 10 genotypes have been identified for hepatitis B. The aim of this study was to do Hepatitis B virus genotyping in asymptomatic HBV blood donors in Tehran.

Materials and Methods

In this cross-sectional study, 20 HBsAg positive blood donors tested by ELISA were examined. After viral DNA extraction, the *pres* gene was amplified by Nested-PCR method and the virus genotype was aligned with the references sequence by Clustal w software.

Results

Samples were sequenced after Nested-PCR was done. Hepatitis B virus genotype was determined in all 20 blood donors with hepatitis B to be genotype D.

Conclusions

Prevalence of genotype D in study subjects was 100% . This result can be used in preparation of hepatitis B diagnostic kits. Identifying genotypes can also help physicians identify patients at higher risk for disease progression and adopt better treatment strategies.

Key words: Hepatitis B virus, Genotype, Blood Donors

Received: 12 May 2020
Accepted: 12 Jul 2020

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052152; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *sharifiz@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]