

تعیین ساب‌تایپ‌های ویروس هپاتیت C در بیماران تالاسمی ایران به روش آنالیز فیلوژنتیک ناحیه NS5b

آروز آزادی^۱، آریتا آذرکیوان^۲، فرهاد زمانی^۳، معصومه السادات اسلامی^۴، محمدرضا اشراقیان^۵، کتابون صمیمی‌راد^۶

چکیده

سابقه و هدف

بیماران تالاسمی به تزریق مکرر خون نیاز دارند و در معرض خطر ابتلا به هپاتیت C هستند. بالا بودن فراوانی این ویروس در جمعیت تالاسمی، عوارض سنگین ناشی از آلودگی با آن و اهمیتی که تعیین تیپ ویروس در درمان آلودگی دارد، از دلایل انجام این تحقیق بود. این مطالعه با هدف شناسایی آلودگی مزمن در بیماران تالاسمی و تعیین تیپ‌هایی از ویروس که این گروه با آن آلوده هستند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، ۱۲۰ بیمار تالاسمی anti-HCV مثبت در دو شهر تهران و آمل بررسی شدند. پس از توالی‌یابی محصولات PCR، تعیین تیپ نمونه‌ها با رسم درخت فیلوژنتیک صورت گرفت. یافته‌ها توسط آزمون‌های کای دو، t و دقیق‌فیشر و SPSS ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد ۶۷ (۵۵/۸٪) بیمار از نظر RNA ویروس مثبت بودند، از این بیماران ۳۴ (۲۸/۳٪) بیمار از تهران و ۳۳ (۲۷/۵٪) بیمار از شهر آمل بودند. از ۶۷ سویه ویروس، توانستیم ۶۵ مورد را تعیین تیپ کنیم. از این نمونه‌ها ۳۵ (۵۳/۸٪) بیمار تیپ ۱a، ۲۰ (۳۰/۷٪) بیمار تیپ ۳a، ۹ (۱۳/۸٪) بیمار تیپ b و ۱ (۱/۷٪) بیمار با تیپ ۴a آلوده بودند.

نتیجه‌گیری

اعمال راه‌کارهایی که بتوان بیماران تالاسمی مبتلا به عفونت مزمن در مراکز تالاسمی را شناسایی کرد، ضروری می‌باشد. از آن جایی که تیپ ۱ این ویروس به درمان رایج انترفرون و ریبوورین در مقایسه با تیپ‌های ۲ و ۳ با درصد پایین‌تری پاسخ می‌دهد، غالب بودن تیپ ۱ در بین بیماران تالاسمی در درمان بیماران دارای اهمیت خاصی است.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت C، ژنوتیپ، تالاسمی

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۲

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی - دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۲- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و درمانگاه تالاسمی - تهران - ایران
- ۳- فوق تخصص گوارش و کبد - بیمارستان فیروزگر - تهران - ایران
- ۴- پزشک عمومی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و درمانگاه تالاسمی - تهران - ایران
- ۵- PhD آمار و اپیدمیولوژی - استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۶- مؤلف مسئول: PhD میکروبیولوژی پزشکی - دانشیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران - صندوق پستی: ۶۴۴۶

مقدمه

یکی از گروه‌های در معرض خطر از نظر ابتلا به HCV (Hepatitis C Virus)، دریافت‌کنندگان مکرر خون از جمله بیماران تالاسمی هستند (۱، ۲). طبق گزارش‌ها حدود ۱۸٪ بیماران تالاسمی در کشور ما آنتی‌بادی علیه ویروس هپاتیت C دارند. این رقم خیلی بالاتر از فراوانی ۰/۵ درصدی آنتی‌بادی علیه این ویروس در جمعیت عمومی کشور می‌باشد (۳). دریافت خون غربال نشده در گذشته فاکتور خطر اصلی عفونت HCV در این بیماران بوده است ولی بروز موارد جدید آلودگی ناشی از این فاکتور خطر پس از سال ۱۳۷۵ یعنی از زمان آغاز طرح غربالگری خون از نظر آنتی‌بادی علیه HCV در ایران کاهش یافته است (۴). ۸۰٪-۵۰٪ بیماران مبتلا به عفونت حاد HCV به هپاتیت مزمن دچار می‌شوند و ۲۰٪ آن‌ها در مدت ۱۰ تا ۲۰ سال به سیروز کبدی و ۵٪ موارد سیروز کبدی به بیماری کشنده هپاتوسلولار کارسینوما منجر می‌شود. به علاوه در دسترس نبودن واکسن مناسب و مشکلات مربوط به درمان، ویروس هپاتیت C را به یک مشکل جهانی تبدیل کرده است. از این رو مطالعه و تحقیق به منظور شناسایی افراد مبتلا به HCV مزمن به منظور جلوگیری از انتقال ویروس و درمان مؤثر بیماران آلوده ضروری است. به علاوه از آن جایی که تصمیم‌گیری در مورد مدت درمان و دوز داروهای تجویزی به تیپ ویروس بستگی دارد لازم است ژنوتیپ ویروسی که فرد با آن آلوده می‌باشد، تعیین شود (۵).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۱۲۰ بیمار تالاسمی که از نظر آنتی‌بادی علیه HCV مثبت بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این نمونه‌ها از بیماران تالاسمی شهر تهران (۶۰ نمونه) و آمل (۶۰ نمونه) که دارای جمعیت بالایی از بیماران تالاسمی هستند، انتخاب شدند. از هر یک از بیماران اطلاعات مربوط به نام و نام خانوادگی، سن، تعداد دفعات دریافت خون، زمان تشخیص آلودگی، درمان در رابطه با هپاتیت C، دریافت خون از خارج کشور از طریق پرسش از خود بیمار و هم چنین با مراجعه به پرونده آن‌ها

جمع‌آوری شد. به منظور استخراج RNA ویروس از کیت QIAamp Viral RNA Purification استفاده شد. ابتدا به نمونه پلاسمای بیماران، بافر AVL واجد RNA حامل اضافه شد و پس از لیز، نمونه‌ها در ستون QIAamp Mini بارگذاری شدند. پس از دو مرحله شستشو، برای RNA به دست آمده، با استفاده از کیت One Step RT-PCR کیژن، ساخت cDNA و سپس PCR انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده شامل آغازگر جلو برنده مربوط به جایگاه ۷۹۵۸-۷۹۳۵ و آغازگر معکوس مربوط به جایگاه ۸۲۷۳-۸۲۵۰ از ژن NS5B بودند (۶).

محصولات PCR قطعاتی در حدود ۳۳۸ نوکلئوتیدی هستند، که پس از انجام الکتروفورز و خالص‌سازی، آن‌ها را توالی‌یابی کردیم. توالی‌های به دست آمده را در کنار توالی‌های موجود در ژن بانک قرار داده و با استفاده از برنامه مگا ۶ درخت فیلوژنتیک (با استفاده از الگوریتم UPGMA و روش 2 kimmura) دندروگرام برای ناحیه NS5B رسم شدند. اطلاعات به دست آمده از پرسش‌نامه‌های بیماران مورد مطالعه به همراه نتیجه آزمایش PCR و تیپ سویه‌های جدا شده از بیماران با استفاده از درخت فیلوژنتیک، در برنامه SPSS ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. ارتباط بین مارکرهای ویروسی با هر یک از متغیرهای کیفی با استفاده از آزمون‌های آماری کای‌دو و دقیق فیشر و با هر یک از متغیرهای کمی با استفاده از آزمون t-test ارزیابی شدند. p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان ارتباط معنادار بین داده‌های دو متغیر در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۲۰ بیمار دارای آنتی‌بادی علیه ویروس هپاتیت C، نتیجه آزمایش PCR ۶۷ بیمار (۵۵/۸٪) مثبت بود. میانگین سن بیماران $24/6 \pm 7$ سال بود و در گروه سنی ۲۱-۱۱ سال بیشترین فراوانی دیده می‌شد. بیشتر بیماران قبل از سال ۱۳۷۵ دریافت خون را شروع کرده بودند (سالی که طرح غربالگری خون‌ها از نظر ویروس هپاتیت C آغاز شد) (جدول ۱). آنالیز آماری برای یافتن فاکتورهای خطر مرتبط با مثبت شدن آزمایش PCR بیماران تالاسمی نشان

جدول ۱: مجموعه اطلاعات بیماران تالاسمی مورد مطالعه بر حسب نتیجه PCR

p value	OR	PCR ⁺	PCR ⁻	تعداد نمونه	
-	-	۶۷ (۵۵/۸۳)	۵۳ (۴۴/۱۷)	تعداد نمونه	
۰/۹۱۹	۱/۶۵۹ (۰/۸۰۲-۳/۴۳۴)	۲۷ (۴۰/۳۰)	۲۸ (۵۲/۸۳)	زن	جنس
		۴۰ (۵۹/۷۰)	۲۵ (۴۷/۱۷)	مرد	
۰/۷۵۳	۱/۴۲۹ (۰/۳۹۵-۵/۱۵۷)	۶۰ (۸۹/۵۵)	۴۹ (۹۲/۴۵)	ماژور	نوع تالاسمی
		۷ (۱۰/۴۵)	۴ (۷/۵۵)	ایترمدیا	
۰/۲۶۳	۱/۶۳۴ (۰/۶۸-۳/۹۴)	۱۲ (۱۷/۹۱)	۱۴ (۲۶/۴۲)	≤ ۱۸۰ ماه	طول دوره درمان
		۵۵ (۸۲/۰۹)	۳۹ (۷۳/۵۸)	> ۱۸۰ ماه	
۰/۲۲۸	۰/۶۲۲ (۰/۲۸۷-۱/۳۴۹)	۲۶ (۳۸/۸۱)	۱۵ (۲۸/۳۰)	≤ ۳۰۰ واحد	تعداد واحد خون دریافتی
		۴۱ (۶۱/۱۹)	۳۸ (۷۱/۷۰)	> ۳۰۰ واحد	
۰/۹۲۷	۰/۹۶۶ (۰/۴۶۲-۲/۰۲۱)	۴۱ (۶۱/۱۹)	۳۲ (۶۰/۳۸)	بله	HCV برای درمان
		۲۶ (۳۸/۸۱)	۲۱ (۳۹/۶۲)	خیر	
۰/۲۳۹	۰/۲۹۵ (۰/۰۵۵-۱/۵۸۸)	۵۹ (۸۸/۱۰)	۵۲ (۹۸/۱۲)	قبل از سال ۱۳۷۵	اولین واحد خون دریافتی
		۸ (۱۱/۹۰)	۱ (۱/۸۸)	بعد از سال ۱۳۷۵	
۰/۲۵۴	۱/۸۲۸ (۱/۵۵-۲/۱۵)	۳ (۴/۴۸)	۰ (۰)	دارد	سابقه خالکوبی
		۶۴ (۹۵/۵۲)	۵۳ (۱۰۰)	ندارد	
۰/۳۵۷	۰/۷۱ (۰/۳۴۲-۱/۷۴۳)	۴۱ (۶۱/۱۹)	۲۸ (۵۲/۸۳)	دارد	سابقه اسپلنکتومی
		۲۶ (۳۸/۸۱)	۲۵ (۴۷/۱۷)	ندارد	
۰/۵۰۰	۰/۶۲۲ (۰/۲۸۷-۱/۳۴۹)	۳۳ (۴۹/۲۵)	۲۷ (۵۰/۹۴)	تهران	شهر
		۳۴ (۵۰/۷۵)	۲۶ (۴۹/۰۶)	آمل	
-	-	۲۴/۱ ± ۰/۸	۲۳/۷ ± ۲/۱	میانگین سنی (سال)	
-	-	۲۴۶/۱ ± ۱۲	۲۳۲/۲ ± ۱۱/۳	میانگین دوره درمان (ماه)	
-	-	۴۲۲/۱ ± ۳۰/۴	۴۷۸ ± ۳۶/۹	میانگین واحد خون دریافتی	

داد که سن بیمار، مذکر یا مؤنث بودن، داشتن سابقه اسپلنکتومی، مدت زمان دریافت خون (کمتر از ۱۸۰ ماه یا بیشتر از ۱۸۰ ماه)، تعداد واحدهای خون دریافتی، سابقه دریافت خون قبل از ۱۳۷۵ یا پس از آن، سابقه خالکوبی، نوع بیماری تالاسمی با افزایش شانس مثبت شدن آزمایش PCR مرتبط نمی‌باشند.

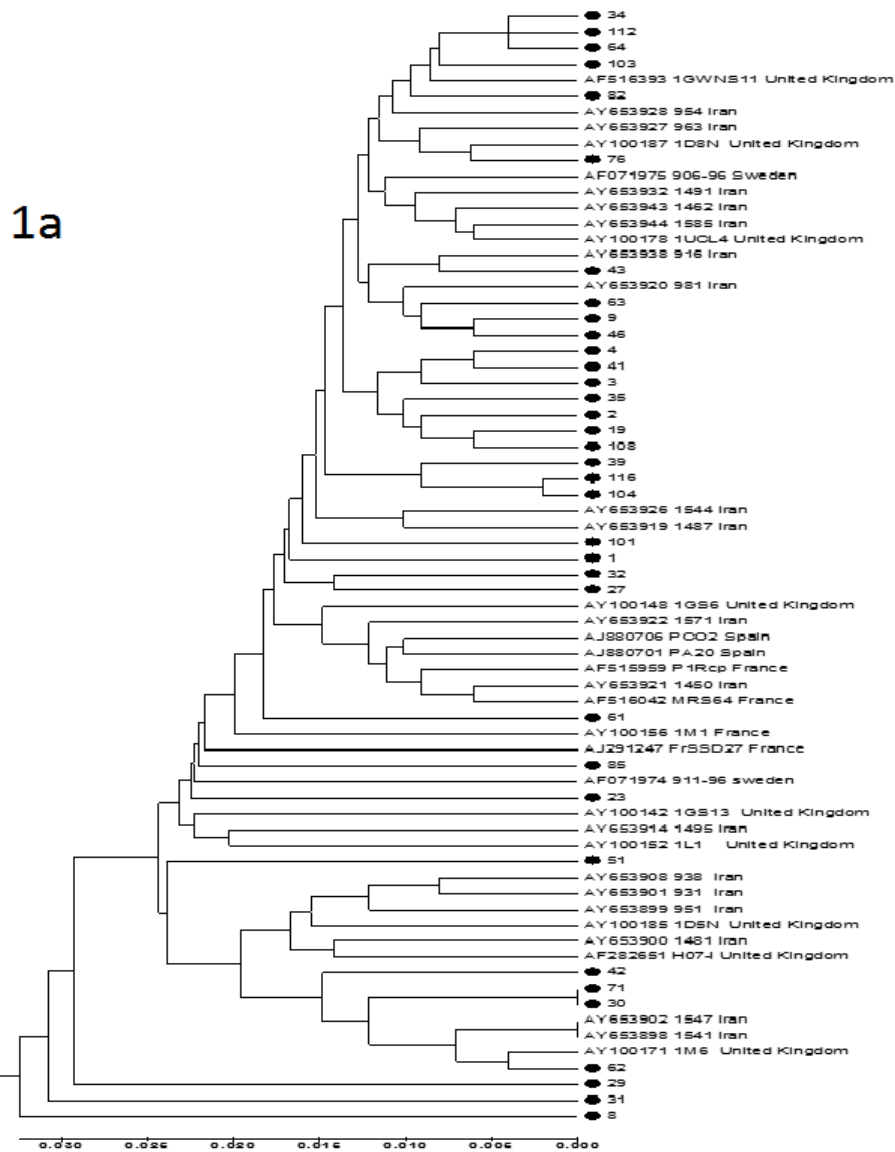
با آنالیز سکناس ناحیه NS5B از ۶۷ سویه HCV توانستیم ۶۵ مورد را تعیین تیپ و دسته‌بندی کنیم و در مجموع ۴ ساب‌تیپ ۱a، ۱b، ۳a و ۴a مشاهده شد. از نمونه‌های تیپ شده، ۳۵ (۵۳/۸٪) بیمار با ساب‌تیپ ۱a و ۲۰ (۳۰/۷٪) بیمار با ساب‌تیپ ۳a، ۹ بیمار

۱ با ساب‌تیپ ۱b و ۱ بیمار (۱/۷٪) با ساب‌تیپ ۴a آلوده بودند. توزیع ژنوتیپ‌ها در دو شهر تهران و آمل در جدول ۲ نشان داده شده است. درخت فیلوژنتیک رسم شده از نمونه‌های سکناس شده، برای بررسی بهتر به ۳ دندروگرام تقسیم شدند. دندروگرام ۱، ۳۵ توالی ساب‌تیپ ۱a از بیماران تالاسمی مورد مطالعه به همراه ۳۵ توالی از منابع اطلاعاتی ژن بانک و EMBL را در بر می‌گیرد. در این دندروگرام ۲۲ نمونه از بیماران مورد مطالعه در ۱۰ کلاستر قرار گرفته‌اند. دندروگرام شماره ۲، از ۹ توالی ساب‌تیپ ۱b از بیماران تالاسمی و ۹ توالی فرانس ساب‌تیپ ۱b از ژن بانک تشکیل شده است.

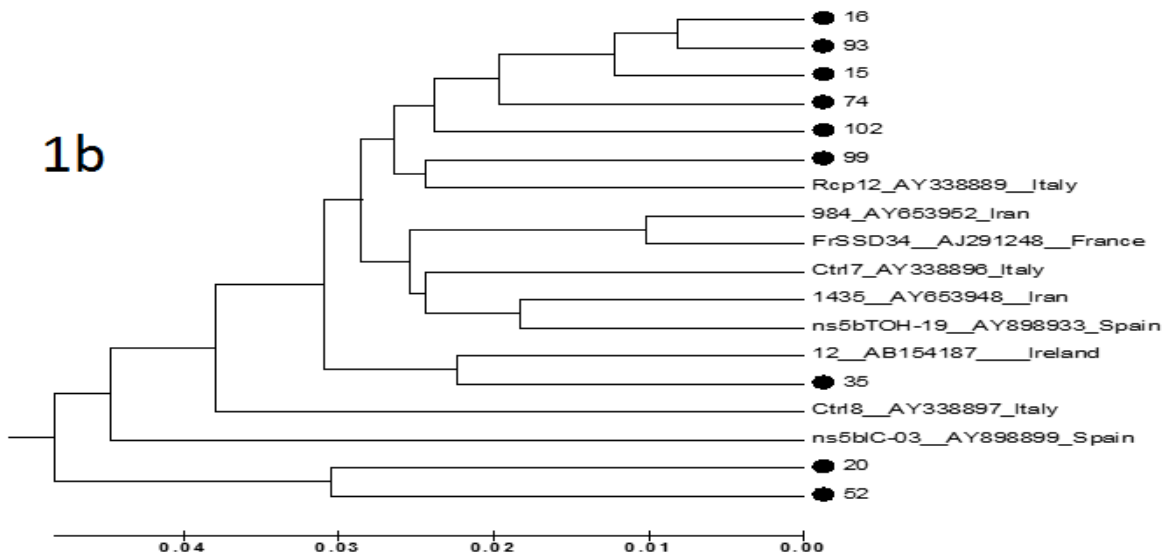
۲۰ (۳۰/۷٪) بیمار با ساب‌تیپ ۳a، ۹ بیمار با ساب‌تیپ ۱b و ۱ بیمار (۱/۷٪) با ساب‌تیپ ۴a آلوده بودند. توزیع ژنوتیپ‌ها در دو شهر تهران و آمل در جدول ۲ نشان داده شده است. درخت فیلوژنتیک رسم شده از نمونه‌های سکناس شده، برای بررسی بهتر به ۳ دندروگرام تقسیم شدند. دندروگرام ۱، ۳۵ توالی ساب‌تیپ ۱a از بیماران تالاسمی مورد مطالعه به همراه ۳۵ توالی از منابع اطلاعاتی ژن بانک و EMBL را در بر می‌گیرد. در این دندروگرام ۲۲ نمونه از بیماران مورد مطالعه در ۱۰ کلاستر قرار گرفته‌اند. دندروگرام شماره ۲، از ۹ توالی ساب‌تیپ ۱b از بیماران تالاسمی و ۹ توالی فرانس ساب‌تیپ ۱b از ژن بانک تشکیل شده است.

جدول ۲: توزیع و درصد ساب‌تایپ ویروس هیپاتیت C در بیماران PCR مثبت مورد مطالعه در دو شهر تهران و آمل

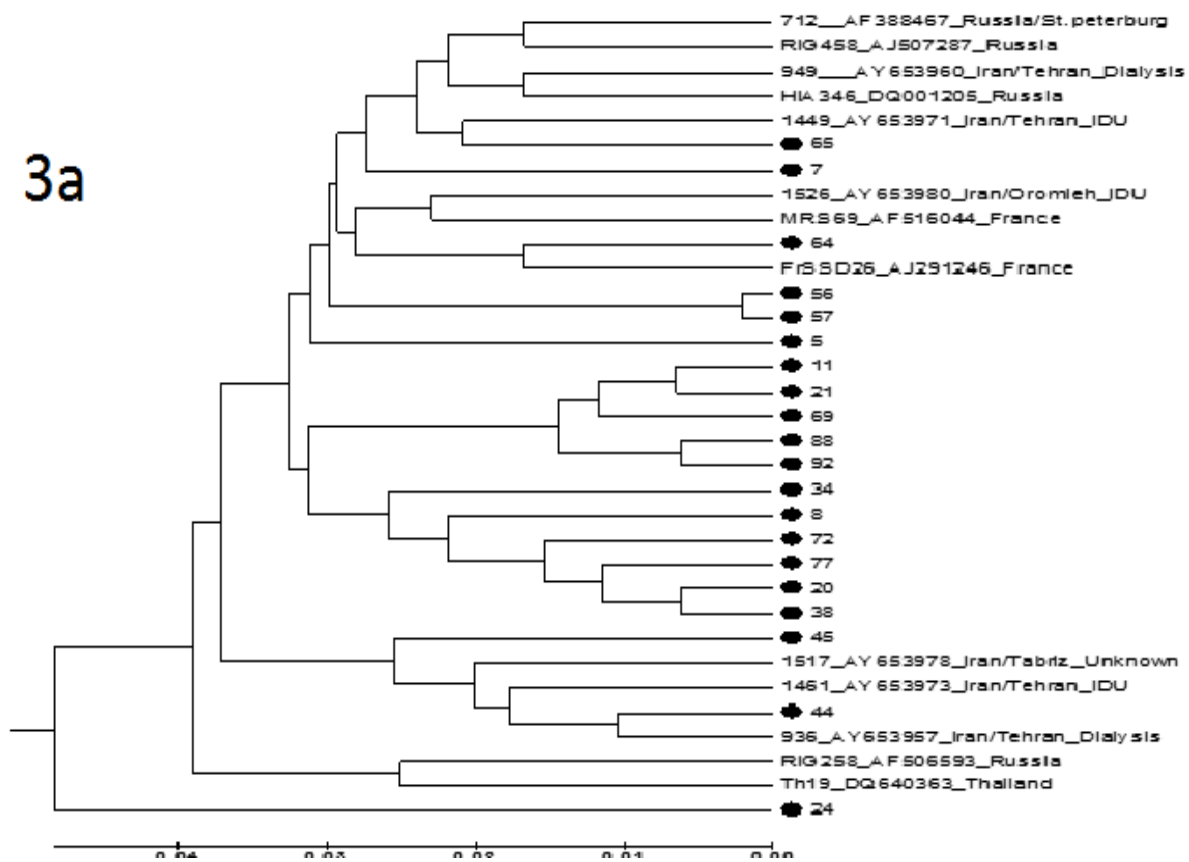
نتیجه آزمون	فراوانی (درصد)	تهران		شهر ساب‌تایپ
		فراوانی (درصد)	آمل	
دقیق فیشتر	۳۵ (۱۰۰)	۱۶ (۴۵/۷)	۱۹ (۵۴/۳)	۱ a
	۹ (۱۰۰)	۸ (۸۸/۹)	۱ (۱۱/۱)	۱ b
	۲۰ (۱۰۰)	۷ (۳۵)	۱۳ (۶۵)	۳ a
p= ۰/۲۱	۱ (۱۰۰)	۱ (۱/۷)	-	۴ a
	۶۵ (۱۰۰)	۳۲ (۴۹/۲)	۳۳ (۵۰/۸)	جمع



دندروگرام ۱: بر اساس ۳۳۰ نوکلئوتید ناحیه NS5B ویروس هیپاتیت C ساب‌تایپ 1a رسم شده است. بر روی دندروگرام سویه‌های مربوط به بیماران تالاسمی مورد بررسی در این تحقیق با نشان دایره مشخص شده است و سویه‌های رفرانس ایران و سایر نقاط جهان با شماره accession number و سپس نام کشوری که سویه رفرانس از آن جا شده ذکر شده‌اند. این اطلاعات از ژن بانک و EMBL به دست آمده است.



دندروگرام ۲: ۹ بر اساس ۳۳۰ نوکلئوتید ناحیه NS5B ساب تایپ ۱ b ویروس هپاتیت C رسم شده است. سایر توضیحات این دندروگرام مشابه دندروگرام ۱ می باشد.



دندروگرام ۳: بر اساس ۳۳۰ نوکلئوتید ناحیه NS5B ساب تایپ ۳a ویروس هپاتیت C رسم شده است. سایر توضیحات این دندروگرام مشابه دندروگرام ۱ می باشد.

در این بررسی، ۶۷ (۵۵/۸٪) بیمار از ۱۲۰ بیمار تالاسمی، از نظر آنتی‌بادی علیه ویروس هپاتیت C مثبت شدند. این مقدار از فراوانی ۸۳٪ گزارش شده از ایتالیا کمتر و از فراوانی ۴۳٪ تایوان، ۳۴/۵٪ لبنان و ۵۱٪ گزارش شده از عمان بیشتر است (۹-۱۲).

یافته‌های این تحقیق نشان داد ژنوتیپ غالب بین بیماران تالاسمی مورد بررسی تیپ ۱ با فراوانی ۶۷/۷٪ بود. توزیع ژنوتیپ غالب در این بررسی با مطالعه انجام شده توسط دکتر علویان و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۲۸۰ بیمار تالاسمی ایران که ژنوتیپ ۱ را تیپ غالب اعلام کرده‌اند، مشابه می‌باشد (۱۳). مطالعه‌ای در کشور یونان بر روی جمعیت تالاسمی نیز تیپ ۱ را ژنوتیپ غالب اعلام کرده است (۱۴). ولی تیپ غالب گزارش شده از کشورهای هند با فراوانی ۴۵٪، تیپ ۳ a و ۴ a در لبنان با فراوانی ۵۳٪-۳۴٪ متفاوت می‌باشد (۱۶، ۱۵).

همان طور که نتایج حاضر نشان می‌دهند، اگر چه ساب‌تایپ‌های ۱a در هر دو شهر تهران و آمل تیپ غالب می‌باشد ولی فراوانی ساب‌تایپ ۳a در آمل تقریباً دو برابر فراوانی این ساب‌تایپ در تهران و فراوانی ساب‌تایپ ۱b در شهر تهران ۸ برابر فراوانی آن در آمل می‌باشد و ساب‌تایپ ۴a نیز فقط در شهر تهران مشاهده شد. رسم دندروگرام مربوط به این ساب‌تایپ (دندروگرام در مقاله نشان داده نشده است)، نشان داد سویه ۴a جدا شده از بیمار تالاسمی مورد بررسی در این مطالعه بیشترین شباهت را به ایزوله M7284N از کشور کامرون دارد.

چندین فاکتور می‌تواند مسئول اختلاف در توزیع و فراوانی ساب‌تایپ‌های ویروس در دو شهر تهران و آمل باشد. اولاً ۲۵٪ از بیماران آلوده به HCV قبل از این که در تهران شروع به درمان کنند، در شهرهای دیگر و یا خارج از کشور به مدت چندین سال خون دریافت کرده‌اند، مثل بیماری که به تیپ ۴a آلوده است. ثانیاً به علت تقاضای زیاد خون در شهر تهران، استفاده از خون‌های ارسالی از شهرهای دیگر اجتناب‌ناپذیر است. این امر می‌تواند به ورود ساب‌تایپ‌های مختلف HCV در تهران منجر شده باشد. مقایسه توزیع و فراوانی ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در بین بیماران تالاسمی با سایر گروه‌های در معرض

در این دندروگرام ۵ نمونه از بیماران مورد مطالعه در ۴ کلاستر قرار گرفته است. دندروگرام ۳، ۲۰ توالی ساب‌تایپ ۳a از بیماران تالاسمی و ۱۳ توالی از ژن بانک را در بر می‌گیرد. ۱۳ نمونه از بیماران تالاسمی متعلق به ساب‌تایپ ۳a در ۷ کلاستر قرار گرفته‌اند.

بحث

با توجه به مشکلات بهداشتی که ویروس هپاتیت C در ایران و سایر مناطق دنیا ایجاد کرده است، شناسایی بیماران مبتلا به هپاتیت C از جمله بیماران تالاسمی به منظور جلوگیری از انتقال ویروس و بروز موارد جدید آلودگی امری ضروری است. به اندازه شناسایی افراد آلوده، درمان مطابق با روش‌های استاندارد به منظور افزایش پاسخ‌های پایدار نسبت به ویروس لازم می‌باشد (۷). برای تحقق اهداف فوق این بررسی بر روی بیماران تالاسمی آنتی‌بادی مثبت انجام شد. یافته‌های این مطالعه، رابطه معناداری بین فاکتورهای خطر با مثبت شدن آزمایش PCR نشان نداد (جدول ۱). دلیل معنادار نبودن فاکتورهای فوق در بین بیماران مثبت و منفی، این است که بیماران PCR مثبت که در حال حاضر، آلودگی با ویروس را دارند و بیماران منفی که در حال حاضر عفونت در جریان را ندارند، شانس مواجهه یکسانی را با ویروس داشته‌اند و هر دو گروه با ویروس آلوده شده‌اند ولی در گروهی از آن‌ها سیستم ایمنی میزبان توانسته بدن بیمار را از آلودگی پاک کند و در گروه دیگر پاسخ ایمنی میزبان آن قدر قوی نبوده که بتواند عفونت را پاک کند. فاکتوری که در جدول ۱ جلب توجه می‌کند، سابقه درمان با اینترفرون است. همان طور که مشاهده می‌شود، از ۱۲۰ بیمار ۴۷ بیمار تحت درمان قرار نگرفته‌اند و از این بین، ۲۱ بیمار (۳۹/۶٪) از عفونت خود به خود پاک شده‌اند. این درصد از میزان مورد انتظار بیشتر است ولی به درصد گزارش شده از پاک شدگی خود به خود از بیماران تالاسمی سایر مناطق دنیا نزدیک است. بیماران تالاسمی اکثراً دریافت خون را در سنین خیلی پایین (حتی چند ماهگی) شروع می‌کنند و در موارد بیشتری، آلودگی در این شرایط سنی به پاک شدگی خود به خود منجر می‌شود (۸).

بیماران آلوده به تیپ ۱ دو برابر، یعنی یک سال است (۲۲)، ۲۱). از طرف دیگر موارد پاسخ به درمان در بیماران آلوده به تیپ ۱a حدود ۲۵-۲۰٪ در مقایسه با تیپ ۳a کمتر است. آلوده بودن اکثر بیماران تالاسمی به تیپ ۱ و ویروس علاوه بر مشکلات درمانی، بار اقتصادی سنگین تری را بر دوش بیماران و مراکز بهداشتی مربوطه می‌گذارد. اگر چه غربالگری خون‌ها در ایران با موفقیت بسیار انجام شده و احتمال انتقال از طریق تزریق خون بسیار کاهش یافته و حتی در بسیاری از نقاط ایران حدود دو دهه است که به صفر رسیده است (۲۷-۲۳). ولی اعتیاد تزریقی در حال حاضر راه اصلی انتقال ویروس در ایران می‌باشد و احتمال انتقال بیمارستانی این ویروس هم‌چنان (از بیمار به بیمار یا پرستار به بیمار) وجود دارد (۳۰-۲۸)، در نتیجه لازم است بررسی بیماران تالاسمی از نظر آلودگی به HCV به صورت روتین در فواصل زمانی مشخص به صورت منظم صورت بگیرد. به علاوه، رعایت دقیق معیارهای پیشگیری، انتقال ویروس و بروز موارد جدید در کلیه مراکز تالاسمی ضروری است.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که حدوداً ۱۸٪ بیماران تالاسمی از نظر آنتی‌بادی علیه HCV مثبت هستند که رقمی بسیار بالاتر از شیوع آلودگی است که در جمعیت عمومی کشور گزارش می‌شود و با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه که نشان می‌دهد در حدود ۶۰٪ از این افراد به عفونت مزمن دچار می‌شوند، برنامه‌ریزی برای شناسایی RNA ویروس و تعیین تیپ و درمان این بیماران به خصوص با داروهای جدید ضروری است.

اجرای بسیار موفق طرح غربالگری خون‌ها توسط سازمان انتقال خون ایران از علل کاهش بسیار چشمگیر و حتی به صفر رسیدن موارد انتقال ویروس از طریق انتقال خون در بیماران تالاسمی در بسیاری از مناطق کشور می‌باشد ولی از آن جایی که احتمال انتقال بیمارستانی این ویروس در مراکز تالاسمی (از طریق انتقال در بین بیماران و یا از پرستاران به بیماران، لوازم تزریق و وسایل مورد استفاده بیماران که یکبار مصرف نبوده، یعنی برای هر

خطر در ایران مانند بیماران هموفیلی (ساب‌تیپ ۱a با فراوانی ۵۸٪، ۳a (۱۸/۵٪)، ۱b (۱۴٪)، ۴ (۱/۱٪)، ۲ (۰/۸٪) و عفونت مخلوط (۶/۲٪) و بیماران دیالیزی (فراوانی ساب‌تیپ ۱a (۵۳٪)، ۱b (۱۸٪)، ۳a (۲۲٪)، ۴a (۱۸٪) نشان می‌دهد که توزیع و فراوانی تیپ‌های HCV در بین بیمارانی که راه اصلی آلودگی آنها مصرف خون و فرآورده‌های خونی می‌باشد، مشابه است (۱۷، ۱۸). به علاوه این توزیع با توزیع ژنوتیپ‌های این ویروس در جمعیت عمومی کشور ۱a (۴۷٪) و ۳a (۳۶٪) نیز مطابقت دارد (۱۹). این یافته دور از انتظار نبود زیرا بیماران تالاسمی در ایران همیشه از خون تهیه شده از اهداکنندگان خون ایرانی مصرف کرده‌اند. در ایران به علت فرهنگ قوی اهدای خون، نیازی به واردات خون از خارج برای رفع نیازمندی‌های خون بیماران تالاسمی نبوده است، در نتیجه توزیع ژنوتیپی ویروس هپاتیت C در بیماران تالاسمی می‌تواند تا حد زیادی نشانگر این توزیع در جمعیت عمومی کشور باشد.

البته نتایج به دست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که فراوانی و توزیع ژنوتیپ‌های ویروس در این گروه از بیماران با معتادین تزریقی که در حال حاضر گروه اصلی در معرض خطر با این ویروس در ایران هستند، متفاوت می‌باشد. در معتادین تزریقی، ساب‌تیپ ۳a با فراوانی ۵۸٪ تیپ غالب و پس از آن ساب‌تیپ ۱a با فراوانی ۴۲٪ قرار دارد (۲۰). این یافته‌ها نشان می‌دهد فراوانی و توزیع ژنوتیپ در گروه‌های در معرض خطری که خون دریافت می‌کنند، متفاوت از معتادین تزریقی در ایران است. نتایج فوق با مطالعه‌های گزارش شده از اروپا مطابقت دارند، این گزارش‌ها نشان می‌دهد که ساب‌تیپ غالب در بین بیمارانی که از طریق خون و فرآورده‌های خونی آلوده شده‌اند در اروپا ۱b می‌باشد، در صورتی که در معتادین تزریقی ساب‌تیپ ۳a، تیپ غالب است.

غالب بودن ساب‌تیپ ۱a در بیماران تالاسمی از نظر درمان نکته قابل توجه می‌باشد، زیرا مطابق استاندارد درمانی برای داروهای رایج مورد مصرف در کشور ما که اینترفرون و ریبویرین می‌باشند، مدت درمان بیماران آلوده به ساب‌تیپ ۳a، ۶ ماه است، در صورتی که مدت درمان

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری کلیه بیماران تالاسمی و عزیزانی که در مراکز تالاسمی ما را در این راه یاری کردند صمیمانه سپاسگزاریم.

مریض تعویض نمی‌شود و بیماران از آن‌ها به طور مشترک استفاده می‌کنند) وجود دارد، خطر این راه انتقال را باید مورد توجه قرار داد. بدین ترتیب رعایت اصول پیشگیری که از انتقال بیمارستانی ویروس جلوگیری نماید، نیز باید از الویت بالایی برخوردار باشد.

References:

- Mahmoud RA, El-Mazary AA, Khodeary A. Seroprevalence of Hepatitis C, Hepatitis B, Cytomegalovirus, and Human Immunodeficiency Viruses in Multitransfused Thalassaemic Children in Upper Egypt. *Adv Hematol* 2016; 2016: 9032627.
- Saeed U, Waheed Y, Ashraf M, Waheed U, Anjum S, Afzal MS. Estimation of Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, and Different Clinical Parameters in the Thalassaemic Population of Capital Twin Cities of Pakistan. *Virology (Auckl)* 2015; 6: 11-6.
- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, *et al.* Thalassaemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(4): 233-8.
- Mirmomen S, Alavian SM, Hajarizadeh B, Kafae J, Yektaparast B, Zahedi MJ, *et al.* Epidemiology of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus infections in patients with beta-thalassaemia in Iran: a multicenter study. *Arch Iran Med* 2006; 9(4): 319-23.
- Alberti A, Benvenuto L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S104-18.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 11): 2391-9.
- Alavian SM, Tabatabaei SV, Lankarani KB. Epidemiology of HCV Infection among thalassaemia Patients in eastern Mediterranean Iran *Iran Red Cres Med [a Quantitative Review of Literature]* 2010; 4: 365-76.
- Shahraki T, Shahraki M, Moghaddam ES, Najafi M, Bahari A. Determination of hepatitis C genotypes and the viral titer distribution in children and adolescents with major thalassaemia. *Iran J Pediatr* 2010; 20(1): 75-81.
- Perniola R, De Rinaldis C, Accogli E, Lobreglio G. Prevalence and clinical features of cryoglobulinaemia in multitransfused beta-thalassaemia patients. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(11): 698-702.
- Ni YH, Chang MH, Lin KH, Chen PJ, Lin DT, Hsu HY, *et al.* Hepatitis C viral infection in thalassaemic children: clinical and molecular studies. *Pediatr Res* 1996; 39(2): 323-8.
- Ramia S, Koussa S, Taher A, Haraki S, Klayme S, Sarkis D, *et al.* Hepatitis-C-virus genotypes and hepatitis-G-virus infection in Lebanese thalassaemics. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96(2): 197-202.
- Al-Naamani K, Al-Zakwani I, Al-Sinani S, Wasim F, Daar S. Prevalence of Hepatitis C among Multi-transfused Thalassaemic Patients in Oman: Single centre experience. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2015; 15(1): e46-51.
- 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 thalassaemia. *Transfusion* 2009; 49(10): 2195-9.
- Christofidou M, Lambropoulou-Karatza C, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Distribution of hepatitis C virus genotypes in viremic patients with beta-thalassaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(9): 728-30.
- Chakravarti A, Verma V. Distribution of hepatitis C virus genotypes in beta-thalassaemic patients from Northern India. *Transfus Med* 2006; 16(6): 433-8.
- Sharara AI, Ramia S, Ramlawi F, Fares JE, Klayme S, Naman R. Genotypes of hepatitis C virus (HCV) among positive Lebanese patients: comparison of data with that from other Middle Eastern countries. *Epidemiol Infect* 2007; 135(3): 427-32.
- Keshvari M, Alavian SM, Behnava B, Miri SM, Karimi Elizee P, Tabatabaei SV, *et al.* Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Iranian Patients with Congenital Bleeding Disorders. *Iran Red Cres Med* 2012; 12(6): 608-14.
- Samimi-Rad K, Hosseini M, Mobeini G, Asgari F, Alavian SM, Tahaei ME, *et al.* Hepatitis C virus infection among multi-transfused patients and personnel in haemodialysis units in central Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2012; 18(3): 227-35.
- 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(2): 246-52.
- Samimi-Rad K, Nasiri Toosi M, 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.
- Hajiaghahmohammadi A, Samimi R, Miroliaee A, Kazemifar AM, Nazem M. Treatment outcome in chronic hepatitis C infection: a four years survey among Iranian patients. *Glob J Health Sci* 2015; 7(3): 75-81.
- Ravi S, Nasiri Toosi M, Karimzadeh I, Ahadi-Barzoki M, Khalili H. Adherence to chronic hepatitis C treatment regimen: first report from a referral center in

- iran. *Hepat Mon* 2013; 13(6): e11038.
- 23- Jafroodi M, Davoudi-Kiakalayeh A, Mohtasham-Amiri Z, Pourfathollah AA, Haghbin A. Trend in Prevalence of Hepatitis C Virus Infection among beta-thalassemia Major Patients: 10 Years of Experience in Iran. *Int J Prev Med* 2015; 6: 89.
- 24- Kashanchi Langarodi M, Abdolrahim Poorheravi H. Prevalence of diabetes, hypothyroidism and hypoparathyroidism in thalassemia patients in Shahid Bahonar Hospital, Karaj. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2013; 9(4): 422-8. [Article in Farsi]
- 25- Torabi SE, Abed Ashtiani K, Dekhoda R, Moghadam AN, Sorkhabi R, Bahram MK, *et al.* Prevalence of hepatitis B and C in thalassemic patients of East Azarbaijan in 2003. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2005; 2(4): 115-22. [Article in Farsi]
- 26- Mahdavian F, Saremi S, Rafiee M. Prevalence of hepatitis B, C and HIV infection in thalassemic and hemophilic patients of Markazi province in 2004. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2008; 4(5): 313-22. [Article in Farsi]
- 27- Valizadeh N, Noroozi M, Hejazi S, Nateghi S, Hashemi A. Seroprevalence of Hepatitis B, Hepatitis C and Human Immunodeficiency Viruses among Thalassemia Patients in West North of Iran. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2015; 5(3): 145-8.
- 28- Andalibalshohada A, Rezaii SA, Abedi F. HCV prevalence and predominant genotype in IV drug users. *Rev Clin Med* 2014;1(4): 200-6.
- 29- Alavian SM. Hepatitis C infection in Iran; A review article. *Arch Clin Infect Dis* 2009; 4(1): 47-59.
- 30- Azarkeivan A, Hajibeigi B, Nasiritosi M, Amin Kafiabad S, Maghsudlu M, Shadman A, *et al.* Trace back of thalassemic patients with positive HCV markers to their donors in Adult Thalassemia Center. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2010; 7(3): 156-61. [Article in Farsi]

Original Article

Determination of Hepatitis C virus subtypes in thalassemia patients by phylogenetic analysis by NS5B region

Azadi A.¹, Azarkeivan A.^{2,3}, Zamani F.⁴, Eslami M.S.^{2,3}, Eshragiyan M.¹, Samimi-Rad K.¹

¹School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Blood Transfusion Research center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³Adult Thalassemia Clinic, Tehran, Iran

⁴Firoozgar General Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Patients with thalassemia are one of the at risk groups for acquiring Hepatitis C virus (HCV) infection. They need to be transfused regularly. High prevalence of this virus in thalassemia population, complications of HCV infection and the important effect of HCV genotype determination in treatment of the virus were the reasons for performing this research. The aims of the present study were to detect thalassemia patients with chronic infection and determinate the HCV subtypes distribution in this group.

Materials and Methods

The study was concluded on 120 specimens for HCV antibody from thalassemia patients in Tehran and Amol cites. After sequencing of PCR products, determination of HCV subtypes was performed by construction of phylogenetic trees. χ^2 , t, Fisher exact test and SPSS 22 have been used for data analysis.

Results

The results showed that 67 (55/8 %) of the 120 specimens were positive for HCV RNA, 34 (28.3%) from Tehran and 33 (27.5%) from Amol. 65 specimens could be genotyped. Subtype 1a accounted for 53/8 % (n=35), 3a for 30.7 % (n = 20), 1b for 13/8 % (n = 9) and 4a for 1/7 % (n = 1) of infected cases.

Conclusions

Implementation of effective strategies for detection of thalassemia patients, with HCV chronic infection in thalassemia centers is necessary. The predominance of genotype 1 among thalassemia patients is important in treatment of these patients because genotype 1 indicates lower rate of sustained viral response to current therapy (Interferon and Ribavirin) compare to HCV genotype 2 and 3.

Key words: Hepatitis C virus, Genotype, Thalassemia

Received: 11 May 2016

Accepted: 3 Oct 2016

Correspondence: Samimi-Rad K., PhD in Medical Microbiology. School of Public Health, Tehran University of Medical Science

P.O.Box: 6446, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88950595; Fax: (+9821) 88989120

E-mail: Ksamimirad@sina.tums.ac.ir