

جهش مخلوط در ناحیه پره کور ویروس هپاتیت B در داوطلبان اهدای خون HBsAg مثبت

روح‌اله بکناشی^۱، زهره شریفی^۲، شهرام سمیعی^۳

چکیده

سابقه و هدف

جهش در نوکلئوتید ۱۸۹۶ از G به A در ناحیه پره کور ژن C، بر روی تولید HBeAg مؤثر است. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع جهش‌های پره کور ژن C در داوطلبان اهدای خون آلوده به HBV بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی، نمونه خون ۲۰۰ اهداکننده خون که از نظر HBsAg مثبت بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بر روی این نمونه‌ها آزمایش‌های HBeAg و HBeAb به روش الایزا انجام شد. HBV-DNA از سرم اهداکنندگان مبتلا به هپاتیت B استخراج شد. آزمایش PCR بر روی DNA استخراج شده، صورت پذیرفت. سپس از کیت INNO-LipA HBV Pre Core برای تشخیص جهش‌های ناحیه core ویروس هپاتیت B استفاده شد. جهت تحلیل نتایج از آزمون کای دو و نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

یافته‌ها

از ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۰۰ نمونه HBsAg مثبت که با روش الایزا از نظر HBeAg و anti-HBc مثبت بودند، انتخاب شدند. حضور ژنوم ویروس در تمام ۱۰۰ مورد (۱۰۰٪) نمونه‌های HBeAg و anti-HBc مثبت مورد شناسایی قرار گرفت. از بین آن‌ها، تعداد ۴۰ نمونه از نظر جهش در ناحیه کور مورد آزمایش قرار گرفتند که ۴۲/۵٪ آن‌ها فاقد جهش در ناحیه پره کور و ۱۷/۵٪ آن‌ها دارای جهش مخلوط در ناحیه پره کور (کدون ۲۸) بودند.

نتیجه‌گیری

در بین اهداکنندگان خون HBsAg مثبت، طیفی از بیماران بدون علامت حاوی ویروس تیپ وحشی و یا ویروس دارای جهش مخلوط از ویروس تیپ وحشی همراه با ویروس دارای جهش در ناحیه پره کور، قبل از تغییرات سرمی HBeAg وجود داشتند.

کلمات کلیدی: اهداکنندگان خون، جهش، ویروس هپاتیت B

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

حدود ۴۰۰ میلیون ناقل هپاتیت B در کل دنیا وجود دارد (۱). سالانه نزدیک به یک میلیون نفر جان خود را به علت عواقب ناشی از عفونت با این ویروس از دست می‌دهند (۲). هپاتیت B یکی از عمده‌ترین مشکلات بهداشتی در جهان به شمار می‌رود (۳). در خاورمیانه؛ کشورهای بحرین، ایران و کویت از نظر شیوع HBV، نواحی با سطح بومی پایین می‌باشند. عراق و امارات متحده عربی با شیوع متوسط هستند. اردن، عمان، فلسطین و عربستان سعودی دارای شیوع بالا می‌باشند (۴).

ویروس هپاتیت B (HBV)، یک DNA ویروس دو رشته‌ای دارای غشا است. یکی از ژن‌های موجود در ویروس هپاتیت B، ژن C می‌باشد که باعث ساخته شدن HBcAg و HBeAg می‌شود. برخی نقاط در ژنوم HBV شناسایی شده‌اند که بسیار متغیر هستند از آن جمله تبدیل G به A در نوکلئوتید ۱۸۹۶ (stop mutation) در ناحیه پره‌کور ژن ویروس است که اغلب منجر به عدم بروز بیان HBeAg در بیماران می‌گردد. از انواع دیگر جهش‌ها می‌توان به جهش‌های مضاعف در نوکلئوتید ۱۷۶۲ (A به T) و نوکلئوتید ۱۷۶۴ (G به A) اشاره کرد (۵). تحقیقات نشان داده‌اند که بین ژنوتیپ ویروس و جهش‌های ناحیه پره‌کور، رابطه وجود دارد. هم چنین این جهش‌ها می‌توانند تحت تأثیر عواملی هم چون جغرافیا، سن و نژاد قرار بگیرند (۶). تخریب و آسیب نسوج کبدی، یکی از عوارض پاسخ ایمنی است که احتمالاً با تفاوت‌های ژنتیکی ویروس نیز مرتبط بوده و این تفاوت‌ها شامل ژنوتیپ‌ها و ظهور جهش‌های ویروسی می‌باشند. پایه مولکولی جهش‌های ناحیه پره‌کور، اولین بار در سال ۱۹۸۹ در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن شناسایی گردید. ابتدا این فرم از هپاتیت به عنوان فرم آتپیک و نادر و عمدتاً محدود به نواحی مدیترانه‌ای شناخته می‌شد اما امروزه گزارش‌هایی از سراسر جهان مبنی بر افزایش فرکانس و توزیع جغرافیایی این موتانت‌ها وجود دارد. به عنوان مثال در ایتالیا میزان این جهش در فاصله سال‌های ۱۹۸۵-۱۹۷۵ حدود ۴۱٪ بوده در حالی که ظرف ده سال گذشته، این میزان به ۹۰٪ افزایش یافته است (۷). در فرانسه طی مطالعه‌ای که در ۱۴

آزمایشگاه بر روی اهداکنندگان ناقل ویروس هپاتیت B انجام گرفت، میزان موتاسیون‌های ناحیه پره‌کور بین ۲۵ تا ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۸).

حضور anti-HBe و عدم وجود HBeAg در افراد، نشان‌دهنده فاز غیر تکثیری ویروس می‌باشد، در حالی که در بعضی موارد علی‌رغم حضور anti-HBe، ویروس از لحاظ همانندسازی نیز فعال بوده و می‌تواند باعث انتقال بیماری به دیگر افراد جامعه گردد. این می‌تواند به دلیل موتاسیون در ناحیه پره‌کور در بیماران مبتلا به هپاتیت B باشد. بنابراین در بیماران HBsAg مثبت با موتاسیون در ناحیه پره‌کور، وجود anti-HBe در خون نشانه کاهش یا توقف تکثیر ویروس نمی‌باشد (۹).

از آن جایی که اطلاع دقیقی از وضعیت، نوع و میزان فراوانی جهش پره‌کور در میان اهداکنندگان خون مبتلا به هپاتیت B در ایران وجود ندارد و با توجه به تأثیر جهش‌های مذکور بر روی مارکرهای سرولوژیکی، بررسی این جهش‌ها در بین اهداکنندگان خون که فاقد علائم بیماری هستند می‌تواند در سلامت جامعه و جلوگیری از انتشار بیماری مؤثر باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های پره‌کور ژن C ویروس هپاتیت B در بین اهداکنندگان خون ناقل این ویروس در ایران و اثر این جهش‌ها بر روی تولید HBeAg بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه مقطعی بود و جامعه مورد مطالعه را، اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به مراکز انتقال خون در سراسر کشور که ناقل ویروس هپاتیت B بودند، تشکیل می‌دادند. از آرشیو نمونه‌های ارسالی اهداکنندگان مبتلا به هپاتیت B به ستاد مرکزی، ۲۰۰ نمونه سرمی HBsAg مثبت به طور تصادفی ساده انتخاب شدند (آزمایش HBsAg توسط کیت بهرینگ آلمان انجام شده بود). علاوه بر آن بر روی نمونه‌های مورد آزمایش، آزمایش‌های HIV و HCV نیز انجام شده بود که اطلاعات مربوط به نتایج این دو آزمون نیز در آرشیو اهداکنندگان از قبل موجود بود (آزمایش HIV توسط کیت کمبو بیوراد HIV

Ag/Ab فرانسه و آزمایش HCV توسط کیت هپانوستیکا، بیومریوکس فرانسه انجام شده بود). بر روی این ۲۰۰ نمونه، آزمایش‌های HBeAg و HBeAb با توجه به دستورالعمل کیت (بیوپروب، دیاگنوستیک) به روش الایزا انجام شد.

استخراج DNA:

برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B، از کیت استخراج اسید نوکلئیک با خلوص بالا (High pure nucleic acid kit) با بر چسب تجاری روش استفاده شد. پس از خالص‌سازی DNA ویروسی از نمونه بیماران، بر روی آن در دو مرحله با آغازگرهای بیوتین‌دار شده با توجه به دستورالعمل کیت INNO-LipA HBV Pre Core، واکنش PCR انجام شد.

در مرحله اول PCR، با استفاده از آغازگر بیرونی قسمتی از ژن C و ناحیه پره‌کور ژن پلیمراز HBV تکثیر شد. زمانی که میزان محصول تولید شده بر روی ژل آگارز قابل رؤیت نبود، برای ازدیاد محصول PCR جهت واکنش هیبریدیزاسیون، دور دوم PCR (nested) نیز انجام شد. پس از تکثیر، DNA بیوتین‌دار شده در ناحیه core، با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی اختصاصی ثابت شده بر روی غشای نوارها هیبرید شدند. بعد از هیبریدیزاسیون، DNA هیبرید نشده از روی نوار شسته شد. سپس نوار آویدین نشاندار شده با آلکالین فسفاتاز اضافه و به آن BCIP/NBT به عنوان سوبسترا اضافه شد. پس از بررسی کنترل‌های کونژوگه، آمپلی فیکیشن نوارها با استفاده از الگو تفسیر

جدول ۱: مواد مورد نیاز در مرحله اول و دوم واکنش Nested PCR

ماده	مقدار
آب مقطر	N × ۲۱/۲ μL
بافر Taq × ۱۰ استراتازن	N × ۵/۰ μL
میکس dNTP (۲۵ mM)	N × ۰/۴ μL
مخلوط آغازگر بیرونی (یا نستد)	N × ۳/۰ μL
DNA Taq پلیمراز ۵ U/μL	N × ۰/۴ μL
جمع	N × ۳۰ μL

گردید و بدین ترتیب ۴۰ نمونه که ژنوم ویروسی آن‌ها با روش PCR تکثیر شده بود و باند مربوطه در الکتروفورز به صورت قوی ظاهر شده بود، جهت انجام تشخیص جهش پره‌کور توسط کیت INNO-LipA HBV Pre Core مورد استفاده قرار گرفت (جداول ۱ و ۲). به منظور تحلیل نتایج از آزمون کای‌دو و نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

جدول ۲: چرخه دمایی در مرحله اول Nested PCR

مرحله	دما (°C)	زمان	توضیحات
۱- دناتوراسیون	۹۴	۴ min	
۲- دناتوراسیون	۹۴	۳۰ sec	تکرار
۳- چسبیدن آغازگرها	۵۰	۳۰ sec	مرحله
۴- امتداد یافتن آغازگرها	۷۲	۳۰ sec	(۲ تا ۴)
۵- امتداد یافتن نهایی	۷۲	۱۰ min	۴۰ بار
۶- سرد کردن	۴	-	

یافته‌ها

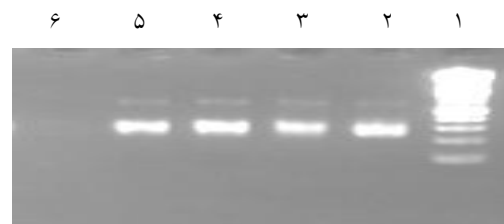
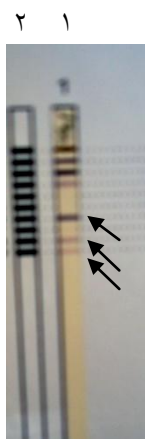
بر روی ۱۰۰ نمونه HBeAg مثبت، آزمایش Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای بیرونی و درونی (نستد) به عمل آمد. محصول PCR هر دو مرحله بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. مواردی که باند ۳۲۶ یا ۲۳۹ جفت بازی مربوط به آغازگرهای بیرونی و نستد اختصاصی ناحیه Core قوی بودند، برای انجام آزمایش هیبریدیزاسیون انتخاب شدند (شکل ۱).

از ۴۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۷ مورد (۴۲/۵٪) فاقد هرگونه جهش در ناحیه ژن C و ۲۳ مورد (۵۷/۵٪) دارای جهش در ژن C بودند که تنها ۱۷/۵٪ آن‌ها، دارای جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور ژن C و تمامی این ۱۷/۵٪ موارد HBeAg مثبت و HBe-Ab منفی بودند.

نتایج هیبریدیزاسیون با کیت Line probe assay جهت بررسی جهش در ناحیه پره‌کور که با جابه‌جایی باز G به A در ناحیه ۱۸۹۶ (کدون ۲۸) ژنوم ویروسی مشخص می‌شود، نشان داد که ۷ نمونه از اهداکنندگان، دارای جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور یعنی حاوی هر دو نوع ویروس تیپ وحشی و تیپ موتانت بودند. از این ۷ نمونه، ۵ نمونه فقط حاوی جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور بودند.

جدول ۳: جدول فراوانی عوامل خطر داوطلبان اهدای خون مبتلا به هپاتیت B

سابقه فامیلی فراوانی (درصد)	سابقه دندانپزشکی فراوانی (درصد)	سابقه خالکوبی فراوانی (درصد)	سابقه اعتیاد فراوانی (درصد)	سابقه حجامت فراوانی (درصد)	جمع
۵ (۱۲/۵)	۲۰ (۵۰)	۳ (۷/۵)	۲ (۵)	۲ (۵)	۳۲ (۸۰)



شکل ۱: الکتروفورز آگارز محصول PCR ژنوم ویروسی با استفاده از آغازگرهای بیرونی را نشان می‌دهد که با استفاده از مارکر ۱۰۰ جفت بازی قطعه ۳۲۶ تکثیر شده است. ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی. ستون‌های ۲-۵ محصول PCR ژنوم ویروسی. ستون ۶ کنترل منفی

شکل ۲: نوار حاصل از انجام آزمایش INNO-LiPA که موتاسیون‌های مربوط به ناحیه پره‌کور ویروس هپاتیت B را نشان می‌دهد. تمامی اهداکنندگان دارای موتاسیون مخلوط در ناحیه پره‌کور یعنی حاوی هر دو ویروس تیپ وحشی و موتانت بودند. هم چنین برخی دارای موتاسیون در ناحیه پروموتورکور (A ۱۷۶۴ G / T ۱۷۶۲ A) نیز بودند. ستون ۱ نوار حاصل از موتاسیون مخلوط در ناحیه پره‌کور را نشان می‌دهد. ستون ۲ نوار الگو جهت شناسایی جهش‌ها می‌باشد.

جدول ۴- فراوانی سنی داوطلبان اهدای خون مبتلا به ویروس هپاتیت B

تعداد افراد (درصد)	گروه سنی
۵ (۱۲/۵)	۱۷-۲۰
۲۵ (۶۲/۵)	۲۱-۳۰
۵ (۱۲/۵)	۳۱-۴۰
۲ (۵)	۴۱-۵۰
۳ (۷/۵)	۵۱-۶۰
۴۰ (۱۰۰)	جمع

یک نمونه علاوه بر جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور، دارای جهش دوگانه در ناحیه پروموتورکور ژن C (A ۱۷۶۲T/G ۱۷۶۴A) نیز بود و یک نمونه باقی‌مانده نیز علاوه بر جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور، دارای جهش مخلوط در ناحیه پروموتورکور نیز بود (شکل ۲). بر اساس پرسشنامه پر شده از اهداکنندگان مورد مطالعه، ۹۰٪ مرد و ۱۰٪ زن بودند. ۸۰٪ اهداکننده بار اول و ۲۰٪ اهداکننده با سابقه بودند. ۱۰٪ دارای سابقه تزریق خون بودند و ۹۰٪ هیچ سابقه‌ای از تزریق خون نداشتند. ۲۰٪ سابقه بستری و جراحی را داشتند و ۸۰٪ هیچ سابقه‌ای از بستری شدن و جراحی نداشتند. بیشترین عامل خطر داوطلبان اهدای خون مبتلا به هپاتیت B به ترتیب سابقه دندانپزشکی و سابقه فامیلی بود (جدول ۳). از نظر شغل افراد، در این مطالعه ۶۰٪ دارای شغل آزاد، ۲۰٪ کارمند، ۱۲/۵٪ محصل و ۷/۵٪ خانه‌دار بودند. از نظر سنی طبق جدول زیر بیشترین تعداد افراد مراجعه‌کننده جهت اهدا در این مطالعه در گروه سنی ۲۱-۳۰ سال قرار داشتند (جدول ۴). از نظر میزان تحصیلات، ۵۲/۵٪ زیر دیپلم، ۲۷/۵٪ دیپلم، ۷/۵٪ فوق دیپلم و ۱۲/۵٪ لیسانس بودند.

و حضور ویروس تیپ وحشی، باعث تولید HBeAg شده است.

در مطالعه انجام شده در مالزی، ۴۰٪ بیماران HBeAg مثبت و ۶۶٪ بیماران HBe-Ab مثبت دارای جهش در ناحیه پره‌کور (A ۱۸۹۶) بودند (۱۰). در مطالعه دیگری در اندونزی، جهش پره‌کور در بیماران HBeAg مثبت ۱۵/۴٪ و در افراد anti-HBe مثبت ۷۷٪ گزارش شده است (۱۱). تونس، میزان موتاسیون ناحیه پره‌کور ۴۱/۵٪ گزارش شده که این میزان در بیماران HBeAg منفی بیش از HBeAg مثبت بوده است (۱۲).

در مطالعه انجام شده بر روی داوطلبان اهدای خون HBeAg مثبت در اسکاتلند، موتاسیون پره‌کور در ۲۲٪ آن‌ها و پس از تغییرات سرمی در ۵۵٪ افراد anti-HBe مثبت مشاهده شده است (۱۳).

حضور موتانت‌های پره‌کور بیشتر در افرادی ظاهر می‌شود که از نظر HBeAg منفی و anti-HBe مثبت و سطح آنزیم‌های کبدی آن‌ها بالا باشد. در چنین مواردی باید جهت آزمون HBV viral load اقدام شود و در صورت بالا بودن آن، وجود عفونت با موتاسیون پره‌کور مطرح می‌شود. اهمیت این واریانت‌ها از نظر بیماری‌زایی یکسان نمی‌باشند. وجود موتاسیون‌های دیگر یا فاکتورهای میزبان می‌تواند اشکال بیماری‌زاتر بیماری‌های مرتبط به موتانت پره‌کور را توضیح دهند.

در مطالعه حاضر هیچ یک از اهداکنندگان خون حاوی فقط ویروس‌های موتانت در ناحیه پره‌کور نبودند در حالی که موتانت‌های پره‌کور در ۵۵٪ داوطلبان اهدای خون اسکاتلند که anti-HBe مثبت بودند، گزارش شده است.

از طرف دیگر ۱۷/۵٪ از داوطلبان اهدای خون در کشور ما دارای جهش مخلوط در ناحیه پره‌کور بودند در حالی که میزان شیوع آن در داوطلبان اهدای خون HBeAg مثبت در اسکاتلند ۲۲٪ و در اندونزی ۱۵/۴٪ گزارش شده است (۱۱، ۱۳).

در اغلب مطالعه‌های انجام شده موتاسیون در ناحیه پره‌کور در افراد HBeAg مثبت و anti-HBe مثبت و نیز در گروه‌های مختلف بیماران مزمن هپاتیت B، از قبیل سیروز کبدی و اهداکنندگان خون گزارش شده است. حضور

جهت بررسی ارتباط بین ابتلا به ویروس هپاتیت B حاوی موتاسیون‌های ناحیه پره‌کور با عوامل خطر ذکر شده در پرسشنامه، از آزمون مجذور کا استفاده شد و رابطه معناداری بین موتاسیون‌های ناحیه پره‌کور با عوامل خطر ذکر شده در پرسشنامه مشاهده نگردید.

بحث

ژنوم ویروس هپاتیت B، حاوی چهار ژن می‌باشد که توالی آن‌ها با هم هم‌پوشانی دارد. ژن C شامل دو ناحیه پره‌کور (PC) حاوی ۲۹ اسید آمینه و ناحیه کور حاوی ۱۸۱ اسید آمینه می‌باشد و پروتئین‌های آن توسط دو کدون شروع، ساخته می‌شوند.

رونویسی از RNA پری ژنومی (Pregenomic RNA) جهت تکثیر ویروس هپاتیت B لازم است. هم‌چنین رونویسی از پروتئین نوکلئوکسپید برای ترجمه و تولید پروتئین HBeAg که به جریان خون بیماران آزاد می‌شود، ضروری است. HBeAg، یک مارکر شناسایی تکثیر ویروس می‌باشد بنابراین به دنبال پاسخ ایمنی بدن و تغییر از حالت HBeAg به anti-HBe که نشانه کاهش تکثیر ویروس و در نتیجه کاهش سطح HBV DNA در خون است، دیده می‌شود و با بهبودی بیماری کبدی، همراه است.

جهش‌های پره‌کور در طی عفونت با تیپ وحشی و در طول تغییرات سرمی از HBeAg به anti-HBe در مرحله حذف توسط سیستم ایمنی (immune clearance) به وجود می‌آیند. این واریانت‌ها، علی‌رغم این که تولید ویرونی‌های عفونی را ادامه می‌دهند، جهش‌هایی را در ناحیه پره‌کور که مانع تولید HBeAg می‌شود، با خود حمل می‌کنند. شایع‌ترین این جهش‌ها، جابه‌جایی در باز G به A در نوکلئوتید ۱۸۹۶ می‌باشد که با ورود یک کدون خاتمه در ژن C ناحیه پره‌کور، مانع تولید HBeAg می‌شود.

در این مطالعه؛ ۱۷/۵٪ از داوطلبان اهدای خون حاوی جهش مخلوط یعنی حاوی ویروس تیپ وحشی و تیپ موتانت در ناحیه پره‌کور بودند و تمامی افراد از نظر HBeAg نیز مثبت بودند. حضور HBeAg در این افراد نشان می‌دهد که افراد حاوی هر دو نوع ویروس می‌باشند

اهداکندگان خون اسکاتلند با ژنوتیپ D، فراوانی این نوع موتاسیون مخلوط (۱۷/۵٪) در ایران با ژنوتیپ D کمتر از مطالعه‌های فوق می‌باشد (۱۴، ۱۳).

از آنجایی که هیچ یک از افراد مورد مطالعه، سابقه ابتلای بیماری در خانواده و یا انتقال از مادر به فرزند و سایر عوامل خطرساز جهت ابتلا به HBV را نداشتند و فاقد علائم بیماری بودند، بنابراین جهت اهدای خون مراجعه کرده و چون این افراد واکسن دریافت نکرده بودند و اغلب در گروه سنی ۳۰-۲۰ سال و از اهداکندگان نوبت اول با میزان تحصیلات زیر دیپلم بودند، ضرورت واکسیناسیون و افزایش آگاهی عمومی جامعه در روش‌های ابتلا به این بیماری‌ها ضروری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد در داوطلبان اهدای خون HBsAg مثبت، طیفی از بیماران بدون علائم حاوی ویروس تیپ وحشی و یا ویروس حاوی جهش مخلوط از ویروس تیپ وحشی همراه با ویروس دارای جهش در ناحیه پره‌کور قبل از تغییرات سرمی HBeAg وجود داشتند و حضور این موتاسیون مخلوط در داوطلبان اهدای خون، تاثیری بر تولید HBeAg نداشت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون بوده که با حمایت مالی مؤسسه متبوع انجام شده است.

HBeAg در افراد حاوی ویروس موتانت نشان می‌دهد که افراد حاوی موتاسیون مخلوط (ویروس تیپ وحشی و تیپ موتانت) در ناحیه پره‌کور بودند و حضور ویروس تیپ وحشی باعث تولید HBeAg شده است. چون در این مطالعه تمامی اهداکندگان خون، HBeAg مثبت بودند، بنابراین حضور ویروس تیپ وحشی همراه با ویروس موتانت در پره‌کور، نشانه عدم غلبه کامل موتانت‌های پره‌کور در این افراد می‌باشد. از طرف دیگر ظهور anti-HBe به دنبال ناپدید شدن HBeAg، معمولاً نشان می‌دهد که عفونت ویروسی در فاز غیر همانندسازی قرار داشته و بیماری غیرفعال است. اما با وجود گزارش عفونت‌های ویروسی همراه با موتاسیون در ناحیه پره‌کور، ممکن است علی‌رغم حضور anti-HBe، همانندسازی فعال ویروسی نیز وجود داشته باشد بنابراین عدم وجود HBeAg و یا حضور anti-HBe هرگز نباید بدین معنا تلقی شود که عفونت در فاز غیر همانندسازی قرار دارد و سنجش کمی HBV DNA و سایر آزمایش‌های سرولوژیکی و آنزیم‌های کبدی نیز ضروری به نظر می‌رسد.

حضور موتاسیون پره‌کور G1۸۹۶A به ژنوتیپ‌های ویروسی خاصی محدود می‌باشد. این موتاسیون‌ها بیشتر در نواحی جغرافیایی که ژنوتیپ‌های C، B و D غالبند از قبیل آسیا و نواحی مدیترانه و رومانی شایع‌تر هستند. این نوع واریانت‌ها در نواحی آمریکای شمالی و اروپا که ژنوتیپ A غالب است، کمتر دیده می‌شوند. با توجه به شیوع ۷۴٪ موتاسیون پره‌کور در ژنوتیپ D و ۸۹٪ در نواحی آسیا و هم چنین فراوانی ۳۰٪ موتاسیون مخلوط پره‌کور در

References :

- 1- Alam MM, Zaidi SZ, Malik SA, Shaukat S, Naeem A, Sharif S, *et al.* Molecular epidemiology of Hepatitis B virus genotypes in Pakistan. BMC Infect Dis 2007; 7: 115.
- 2- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. Lancet Infect Dis 2002; 2(7) 395-403.
- 3- Wang Y, Wei L, Jiang D, Cong X, Fei R, Xiao J, *et al.* In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation. Viral Hepatitis 2005; 11(5): 649-55.
- 4- Ander F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. Vaccine 2000; 18 Suppl 1: S20-21.
- 5- Li LJ, Ruan B, Dennin RH, Wo JE, Chen Z, Chen YG. Mutation in precore and core promoter region of HBV in patients with hepatic failure. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2002; 1(1): 63-7.
- 6- Lim CK, Tan JT, Khoo JB, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, *et al.* Correlation of HBV genotypes, mutations affecting HBe Ag expression and HBe Ag/anti-HBe status in HBV carriers. Int J Med Sci 2006; 3(1): 14-20.
- 7- Minuk GY, Orr PS, Brown R, Macdonald S, Chaudhary R K, Temple P. Pre-core mutant infections in the Canadian Inuit. J Hepatol 2000; 33(5): 781-4.
- 8- Luperche S, Thibault V, Bouchardeau F, Alain S, Castelain S, Gassin M, *et al.* Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping, and precore mutant determination for hepatitis B virus in a multicenter study. J Clin Microbiol 2006; 44(10):

- 3600-7.
- 9- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001; 8(5): 311-21.
 - 10- Yap SF, Wong PW, Chen YC, Rosmawati M. The frequency of pre-core gene mutations in chronic hepatitis B infection: a study of Malaysian subjects. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33(1): 102-9.
 - 11- Juniastuti, Aksono EB, Utsumi T, Yano Y, Soetjipto. Analyses of precore and corepromoter mutation of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B in Surabaya, Indonesia. *Microbiology Indonesia* 2010; 4(3): 143-148.
 - 12- Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T, *et al.* Hepatitis B virus genotypes and procure/core-promoter mutation in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J infect* 2007; 54(3): 291-7.
 - 13- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, *et al.* Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 2003; 38(3): 619-28.
 - 14- Davidson C, Lycett C, Sablon E, Petrik J, Dow BC. Hapatitis B virus genotypes and precore mutation in Scottish blood donors. *Vox song* 2005; 88(2): 87-92.

Original Article

Mixed mutation in precore region of Hepatitis B Virus in HBsAg positive blood donors

Baktashi R.¹, Sharifi Z.¹, Samiee Sh.¹

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

Abstract

Background and Objectives

The mutations at nucleotide 1896 (G to A) in the precore region of C gene could affect the HBeAg production. The aim of this study was to determine the prevalence of precore stop codon mutation in HBV infected blood donors.

Materials and Methods

In this cross sectional study, 200 HBsAg-positive blood donor samples were included. HBV serum markers (HBeAg and anti-HBeAb) were determined by ELISA using commercial kits. Serum HBV DNA was extracted from HBV infected blood donors samples and the extracted DNA was amplified by PCR method. Then, the samples which were PCR positive were selected for line probe assay to identify HBV precore mutations.

Results

Out of 200 samples, 100 positive for HBsAg, HBeAg and anti-HBc by ELISA method were selected. HBV-DNA was detected in all 100 HBeAg-positive blood donor samples. The prevalence rate of precore mutations among HBeAg-positive blood donors was 17.5%. Also, 42.5% of blood donors had no mutation in the precore region.

Conclusions

In Iranian blood donors, there is a spectrum of asymptomatic patients with a mixed population of wild-type virus and precore mutants before HBeAg seroconversion.

Key words: Blood Donors, Mutation, Hepatitis B virus

Received : 11 Sep 2011

Accepted: 25 Jan 2012

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