

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۹ شماره ۳ پاییز ۹۱ (۲۸۹-۲۸۱)

مقاله پژوهشی

کلولینگ ژن POL ویروس HIV-1 و تعیین زیر گروههای آن

رعنا تبار اسد لاله^۱، زهره شریفی^۲، احمد قره باغیان^۳

چکیده

سابقه و هدف

شناسایی تنوع ژنتیکی و سیر تکاملی ویروس HIV در کشور، به بررسی مولکولی پیوسته و مداوم نیاز دارد که بتواند اطلاعات مفیدی در راستای طراحی روش‌های درمانی و تشخیصی جدید ارایه دهد. در این مطالعه از روش ژن کلولینگ، جهت ارزیابی توزیع و تنوع ژنتیکی اشکال در حال گردش ویروس HIV-1 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ۵۰ نمونه که با روش الایزا، HIV مثبت بودند، بررسی شدند، تمام موارد معتاد تزریقی بوده و سابقه درمان آنتی رتروروپرال نداشتند. ژن ریورس ترانس کرپیتاز ویروس HIV-1 با روش Nested RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد، سپس با استفاده از وکتور PTZ-57RT کلولون شد و چندین کللون از هر بیمار تعیین توالي شد. توالي‌های به دست آمده از ژن ریورس ترانس کرپیتاز با توالي‌های رفرانس که از بانک اطلاعات جهانی به دست آمده بود، با استفاده از نرم‌افزار ClustalW ۱/۸ مرتب شد. سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار NJplot رسم شد.

یافته‌ها

از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۳۰ نمونه با استفاده از روش Nested RT-PCR تکثیر شدند، آنالیز نوکلئوتیدها بر روی ژن ریورس ترانس کرپیتاز با استفاده از چندین کللون از هر فرد انجام شد. تمام نمونه‌ها سابتایپ CRF35-AD بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که CRF35-AD، شایع‌ترین تحت گونه نوترکیب در بین بیماران است. اطلاعات پیرامون تنوع ژنتیکی ویروس در افراد و سابتایپ‌های ویروسی در گردش جامعه، می‌تواند در طراحی روش‌های تشخیصی، برنامه‌های کنترل عفونت و درمان، مفید باشد.

کلمات کلیدی: HIV^۱، کلونی‌ها، تنوع ژنتیکی

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ویروس‌شناسی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- ایمونوهماتولوژی بالینی - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۴۵۶

مقاومت دارویی در ویروس HIV می‌گردد. از آنجایی که ویروس‌های موجود در یک فرد به علت موتاسیون‌های فراوان هتروژن بوده و دارای ژنتیک یکسانی نمی‌باشند و با روش تعیین توالی مستقیم فقط ژنتیک یک ایزووله ویروسی مورد بررسی قرار می‌گیرد، در این تحقیق سعی شده با استفاده از چندین کلون، تفاوت‌های ژنومی ویروس‌های موجود در هر فرد مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی تعیین توالی کامل ژن ریورس ترانس کریپتاز و کلون کردن این ژن، می‌تواند منبع اطلاعاتی مفیدی برای مطالعه‌های آتی در مورد جهش‌های ایجاد شده جهت مقایسه سیر تکاملی ویروس ارایه دهد. اطلاعات پیرامون تنوع ژنتیکی ویروس HIV در تشخیص این بیماری هم چنین روش‌های غربالگری اهداکنندگان نیز مؤثر است به این معنی که برای شناسایی افراد مبتلا در طراحی کیت‌های الیزا و PCR، برای به دست آوردن پاسخ صحیح، طراحی او لیه باید به گونه‌ای باشد که قابلیت شناسایی تمام ساب تایپ‌ها و فرم‌های نوترکیب در حال گردد (CRFs = Circulating Recombinant Forms) شایع را داشته باشد و فقط مخصوص گروه B نباشد، اغلب کیت‌های تجاری بر اساس ژنوتیپ B طراحی شده‌اند که در اروپا و آمریکا شایع می‌باشد(۲). بنابراین شناسایی ساب تایپ اصلی در گرددش هر جامعه جهت شناسایی سریع، طراحی آزمایش‌های غربالگری مناسب، سیاست‌گذاری جامعه جهت درمان و بررسی مقاومت در برابر دارو ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با استفاده از ۵۰ نمونه خون EDTA دار تهیه شده از معتادان مراجعه‌کننده به مراکز بهداشت کردستان انجام شد. ۹۲٪ نمونه‌ها مرد و ۸٪ زن بودند. نمونه‌گیری ساده و مطالعه انجام شده تجربی بود.

/ استخراج RNA ویروسی:

استخراج RNA ویروس HIV-1 از پلاسمای افراد مبتلا به عفونت با این ویروس انجام شد و برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار از کیت High Pure

در حال حاضر بیماری ایدز، یکی از معضلات بهداشتی جهان می‌باشد. هم چنان که وارد هزاره جدید می‌شویم، ویروس از بین برنده سیستم ایمنی بدن انسان یا همان Human Immunodeficiency Virus (HIV) در به خط انداختن سلامتی بشر در سراسر جهان نقش بزرگی دارد. آمارهای ارایه شده اخیر از سوی سازمان ملل نشان می‌دهد که تقریباً ۳۴ میلیون نفر از مردم جهان به این بیماری مبتلا هستند و هر ساله تعداد ۵/۶ میلیون نفر، به این مقدار افزوده می‌گردد.

فاجعه انسانی مربوط به ایدز بی‌مانند است و در حال حاضر، چشم‌انداز روشی برای تولید واکسن مؤثر علیه ویروس HIV و بیماری ایدز، وجود ندارد(۱). دلایل اصلی و مهمی که باعث شده تاکنون راهی مطمئن برای کنترل این ویروس در دسترس نباشد، وجود جهش‌های فراوان و متنوع در ژنوم ویروس به دلیل فشار سیستم ایمنی بدن، فقدان فعالیت تصحیح در عملکرد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و سرعت تکثیر بالای ویروس در هر سیکل تکثیر، هم چنین نوترکیبی ویروس می‌باشد(۲). ایجاد فرم‌های نوترکیب ویروس در اثر عفونت چندگانه در افراد مبتلا، عامل ایجاد تنوع ژنومی بسیار در این ویروس است و منجر به ایجاد سوش‌های نوترکیب جدیدی می‌شود که نقش برخی از این فرم‌های ریکامبیننت، به اندازه ساب تایپ‌های اصلی ویروس در ایجاد پاندمی‌های اخیر گزارش شده است(۳). احتمال دارد سوش غالب، وارد گرددش در جامعه شود که باید مورد شناسایی قرار گیرد. به همین دلیل مطالعه‌های زیادی بر روی جهش‌های ژنومی به خصوص جهش‌های ژنومی که منجر به مقاومت دارویی و ایجاد تغییر ویژه‌ای در عملکرد و سیکل زندگی ویروس می‌شود؛ صورت گرفته است. با توجه به مطالعه‌های انجام شده بر روى ژن POL ویروس HIV، ثابت شده است که ژن HIV در عملکرد و سیکل زندگی ویروس نقش حیاتی دارد و آنزیم‌های مهم ویروس HIV یعنی پروتئاز (PR)، آیتیگراز (IN) و ریورس ترانس کریپتاز (RT) را کد می‌کند. در نتیجه این تحقیقات ثابت شده است که برخی از جهش‌هایی که در ژن POL ایجاد می‌شوند، منجر به بروز

لازم به ذکر است که سه مرحله دناتوراسیون، آنیلینگ و اکستشن، ۳۰ سیکل تکرار شد.

بررسی محصول PCR:

معمول ترین روش بررسی محصول PCR، روش ژل الکتروفورز است که در این مطالعه، با استفاده از ژل آگاروز ۱٪ و جریان الکتریسیته به میزان ۸۰-۸۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. مشاهده DNA متعاقب الکتروفورز روی ژل آگاروز و با رنگآمیزی با اتیدیوم بروماید امکان پذیر خواهد بود.

اتصال قطعات DNA:

برای انجام واکنش اتصال، ابتدا محصول مرحله دوم (High pure PCR product purification) به وسیله کیت PCR با برچسب تجاری روش تخلیص و سپس در وکتور kit PTZ-57RT کلون شد. در این تحقیق به منظور کلوینینگ ژن ریورس ترانسکریپتاژ از کیت کلوینینگ فرمتاز، استفاده شد. سپس محصول واکنش به باکتری مستعد به روش کلرور کلسیم ترانسفورم شد. در نهایت سلولهای ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی آنتی بیوتیک، X-Gal و IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) اضافه شد. پلیت‌ها به طور شبانه (h ۱۸-۲۴) در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد تا کلنی‌های آبی (کلنی فاقد پلاسمید نوترکیب) یا سفید (کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب) ظاهر شود.

روش کلوینی PCR:

برای استخراج پلاسمید از کیت High pure plasmid با برچسب تجاری روش استفاده شد. با استفاده از روش کلوینی PCR و آغازگر اختصاصی قطعه مورد نظر، وجود قطعه DNA خارجی در ناقل پلاسمیدی تایید شد. به همین منظور واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت مربوط به واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱ میکروگرم پلاسمید استخراج شده از کلنی‌های سفید، به عنوان الگو انجام شد.

RNA از شرکت روش استفاده شد. غلظت RNA با استفاده از بررسی میزان جذب نور UV در ۲۶۰ نانومتر محاسبه شد. برای تعیین میزان خلوص RNA، میزان جذب آن در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر محاسبه شد.

واکنش RT-Nested PCR:

ساخت cDNA با استفاده از کیت تاکارا بیو (Takara Biyo) (INC) انجام شد. این کیت حاوی مستر میکس آماده متشکل از آنزیم با تصحیح خطای proof reading و بافر مناسب واکنش PCR، Loading Buffer dNTPs آغازگرهای جلوبرنده و معکوس و ریورس و آب مقطر استریل، آماده انجام واکنش PCR می‌باشد. واکنش به صورت Nested PCR و با استفاده از دو جفت آغازگر خارجی و داخلی در دو مرحله انجام شد.

جدول ۱: آغازگرهای ژن ترانسکریپتاژ معکوس در مرحله اول و دوم

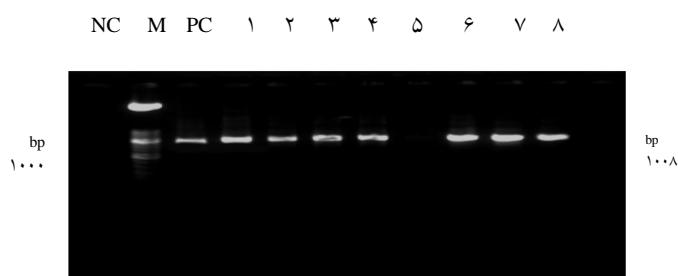
نام آغازگر	سکانس آغازگر
MJ3	5'AGT AGG ACC TAC ACC TGT AC3'
MJ4	5'CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC 3'
A20	5'ATT TTC CCA TTA GTC CTA TTT3'
NE1	5'ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT3'

در مرحله اول PCR، از cDNA تهیه شده به عنوان الگو در مرحله دوم با محصول PCR به دست آمده از مرحله اول، به عنوان الگو با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپنیورف، طبق برنامه زیر، PCR انجام شد.

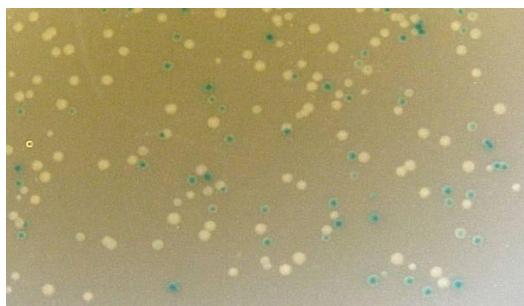
جدول ۲: چرخه دمایی واکنش PCR

مرحله	درجة حرارت (سانتی گراد)	مدت
دناטורاسیون مقدماتی	۹۸ °C	۵ ثانیه
دناטורاسیون	۹۸ °C	۱۰ ثانیه
آنیلینگ	۵۵ °C	۳۰ ثانیه
اکستشن	۷۲ °C	۱ دقیقه
اکستشن نهایی	۷۲ °C	۱۰ دقیقه

ترانسکریپتاز معکوس، نشاندهنده موفقیت در تکثیر ژن ترانسکریپتاز معکوس می‌باشد. پس از خالص‌سازی و کلونینگ ژن پروتئاز در وکتور PTZ57R/T، کلون‌های حاصله مورد بررسی قرار گرفت و کلون‌های سفید رنگ که حاوی قطعه مورد نظر بودند انتخاب شدند(شکل ۲).



شکل ۱: NC کنترل منفی، M مارکر وزن مولکولی، PC کنترل مثبت و ستون‌های شماره ۱-۸ مربوط به نمونه بیمار است.



شکل ۲: کلونی‌های سفید رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب

جهت تایید حضور ژن در کلون‌های انتخاب شده، از کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. پس از تایید کلونینگ، برای بررسی تطابق توالی‌های به دست آمده از پلاسمید نوترکیب PTZ-RT با کروماتوگرام رسم شده، نتایج تعیین توالی با ژن رفرانس مقایسه شد و صحت بازهای آن‌ها کنترل گردید. برای تعیین ژنوتیپ ویروس، توالی‌های به دست آمده با ژن رفرانس مرتباً به واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن ترانسکریپتاز معکوس انجام شد و قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۰۸ جفت باز تکثیر گردید(شکل ۳).

نتایج به دست آمده از آنالیز فیلوژنیک ژن RT نشان داد

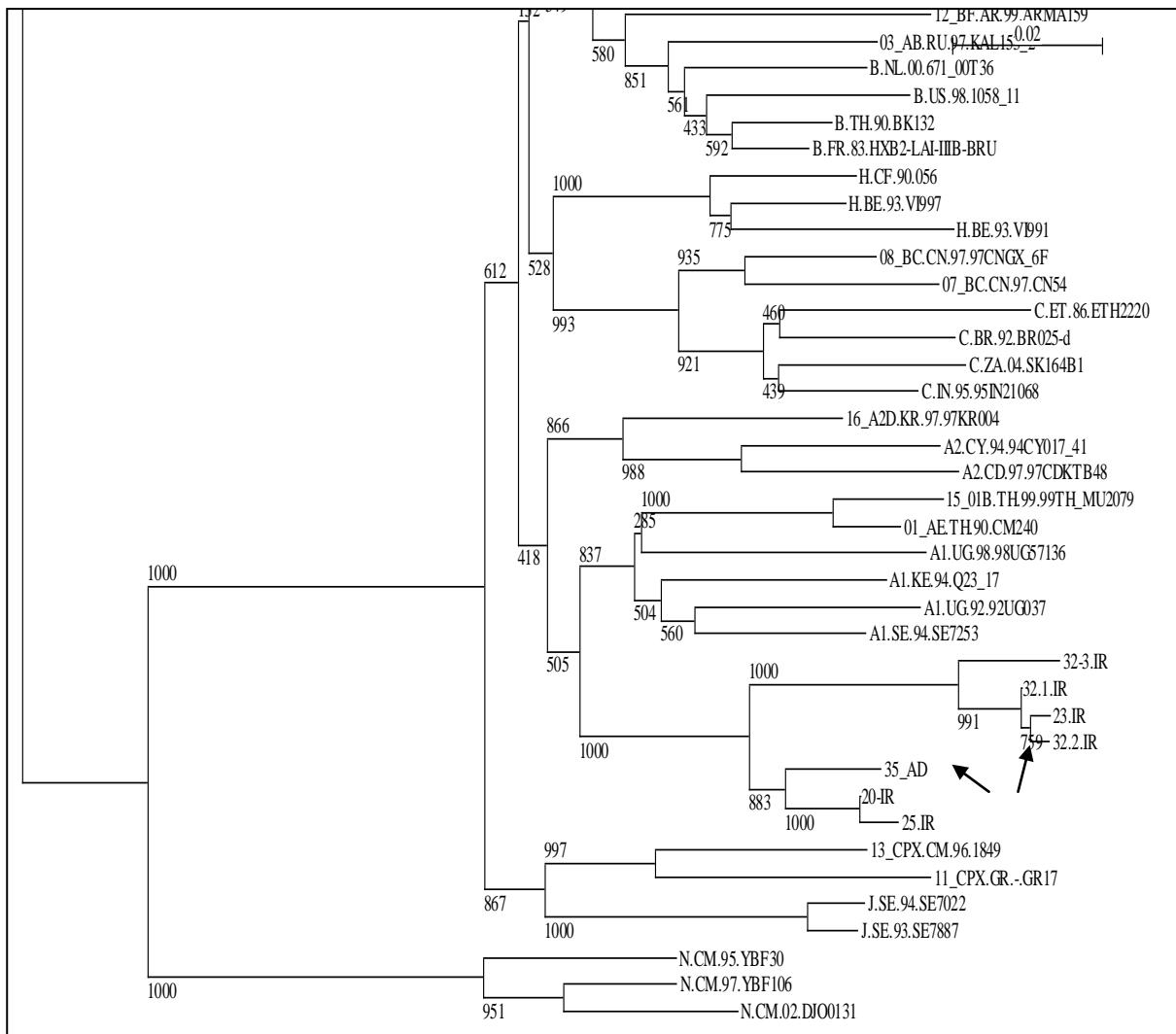
: Sequencing (DNA)

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن کلون شده، با استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب عاری از هر گونه آلودگی استخراج شوند و توسط روش خاتمه زنجیره DNA نشاندار با رنگ فلورورسانست و با استفاده از دستگاه تعیین توالی شوند. در این تحقیق به منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلنی سفید با استفاده از کیت شرکت روشن استخراج گردیدند و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شدند. کروماتوگرام‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار کروماس، مورد بررسی قرار گرفتند و برای بررسی توالی‌های به دست آمده با کروماتوگرام رسم شده، نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار sequence analyzer و برنامه Backman ۸۰۰۰ با ژن رفرانس مقایسه شدند و صحت بازهای آن‌ها کنترل شد. برای تعیین ژنوتیپ ویروس با استفاده از برنامه Clastal W ۱/۸۴ توالی‌های به دست آمده با ژن‌های رفرانس مرتب شدند و برای رسم درخت فیلوژنیک، از نرم‌افزار Nj Plot استفاده شد. برای بررسی صحت رسم درخت فیلوژنیک، رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد. سپس نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده به کمک برنامه BLAST NCB1 از نظر تشابهات و اختلافات با ژن RT ویروس HIV-1 ثبت شده در بانک جهانی مقایسه گردید.

یافته‌ها

برای تعیین میزان خلوص RNA، میزان جذب آن در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر محاسبه شد، مقدار حاصله بین ۱/۹ تا ۲/۱ به دست آمد که نشانگر خلوص مناسب RNA بود. استخراج RNA ویروس HIV-1 از پلاسمای افراد مبتلا به عفونت با این ویروس انجام شد. پس از ساخت cDNA، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن ترانسکریپتاز معکوس انجام شد و قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۰۸ جفت باز تکثیر گردید(شکل ۱).

حضور قطعه ۱۰۰۸ جفت بازی در کنار نشانگر وزن مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن



شکل ۳: رسم درخت فیلوجنتیک ژن RT که ایزوله‌های این مطالعه با IR نشان داده شده است و رسم درخت ۱۰۰۰ بار تکرار شد.

ایمنی بدن میزان بهره می‌گیرد. یکی از شاخص‌ترین راههای استفاده ویروس جهت فرار از سیستم ایمنی میزان، گلیکوزیلاسیون گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌باشد که از ختی‌سازی اپی‌توب‌ها توسط آنتی‌بادی جلوگیری می‌کند. از طرفی ورود ویروس به ژنوم سلول میزان باعث می‌شود که سلول‌های آلوده شده‌ای که از بین نمی‌رونند، به طور دائم منعی برای حفظ ویروس در میزان باشند. از راههای گریز دیگر ویروس که برای ما دارای اهمیت بیشتری است، پتانسیل بالای آن در موتاسیون می‌باشد که به آن فرار موتاسیونی می‌گویند. مکانیسم اخیر

که تحت گونه شایع در میان معتادان تزریقی، CRF35A-D می‌باشد که بیشترین تشابه را با ساب تایپ نوترکیب موجود در افغانستان دارد.

بعث
با گذشت قریب به ۲۷ سال از اولین گزارش ابتلا به ایدز در جهان و گذشت ۲۵ سال از کشف عامل بیماری، هنوز هم کنترل مؤثر ایدز با شکست مواجه است. ریشه اصلی این چالش به پاتوژن مولکولی ویروس HIV برمی‌گردد. ویروسی که از مکانیسم‌های مختلفی برای گریز از سیستم

به آن، استفاده از سرنگ مشترک در میان آن‌ها گزارش شده بود(۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط نادری و همکارانش با استفاده از نمونه تهیه شده از ۱۲ معتاد تزریقی HIV در مشهد انجام شد، در تمام موارد ساب‌تایپ آلووده‌کننده A گزارش شده بود(۶).

در مطالعه‌ای که توسط سارمی فروشانی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در مورد آنالیز فیلورژنیک HIV در ایران در دو گروه هموفیلی و معتادان تزریقی با تهیه ۱۲۲ کلون از ژن gag-p17 و ۱۳۱ کلون از ژن (V1-V5) env از ۶۱ بیمار HIV+ انجام شد، ساب‌تایپ آلووده‌کننده در افراد هموفیلی B و در معتادان تزریقی A گزارش شد. در این مطالعه نیز اعتماد تزریقی، عامل اصلی انتقال HIV در ایران و ساب‌تایپ A، ساب‌تایپ غالب در گردش جامعه گزارش شده بود(۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط موسوی و همکارانش در مورد میزان انتقال ویروس HIV مقاوم به درمان انجام شد، ۷۳ نمونه HIV مثبت از افراد زیر ۲۵ سال از مراکز مشاوره در تهران، قم، اصفهان، لرستان، کرمانشاه، همدان، کردستان، فارس و یزد تهیه شده بود. ۷۲٪ نمونه‌ها مرد و ۲۸٪ زن بودند. ۶۴٪ افراد معتاد تزریقی بودند و تمام افراد انتخاب شده، برای بار اول درمان را آغاز کرده بودند که ساب‌تایپ در تمام نمونه‌ها CRF35-AD و فقط در یک نمونه G و یک نمونه A گزارش شده بود(۶). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط سهیلی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد، تعیین توالی ژنهای پروتئاز، ترانسکریپتاز معمکوس و انولپ از ۱۸ فرد مبتلا به -HIV که تحت درمان نبودند، انجام شد و تمامی نمونه‌ها دارای ساب‌تایپ CRF35-AD گزارش شدند(۷).

در مطالعه همکار و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که بر روی ۴۲ بیمار تحت درمان با داروهای آنتی‌رتروویرال که حداقل یک سال از شروع درمان آن‌ها می‌گذشت انجام شد، ۸۳٪ موارد مرد و ۱۷٪ زن بودند و ۳۶٪ آن‌ها دارای اعتماد تزریقی بودند. در این مطالعه ساب‌تایپ CRF35-AD در ۴۸٪ موارد، ساب‌تایپ B در ۴۳٪ موارد، ساب‌تایپ نوترکیب E CRF01A-E در ۵٪ موارد و ساب‌تایپ A در ۵٪

باعت تنوع قابل ملاحظه ویروس HIV شده و منجر به آداته شدن سریع ویروس در برابر سیستم ایمنی میزان، هم‌چنین مقاوم شدن آن در برابر درمان‌های آنتی‌رتروویرال می‌شود.

اما آن چه که در مورد ویروس HIV از نظر اپیدمیولوژیکی و بالینی اهمیت دارد، تنوع ژنتیکی بسیار بالای ویروس است که باعث ایجاد جمعیت متنوعی از ویروس در یک فرد آلووده (Quasispecies) می‌شود. این تنوع ژنتیکی در نتیجه سرعت همانندسازی بالای ویروس (۱۰^۵ ویریون در روز)، موتاسیون‌های مکرر آن \times ۳/۴ در هر سیکل، همانندسازی به دلیل نداشتن عملکرد تصحیح خطأ در آنزیم ترانسکریپتاز معمکوس ویروس HIV-1، ایجاد فرم‌های نوترکیب داخل گونه‌ای و بین عفونت چندگانه (multiple infection) و دوگانه (dual infection) در فرد آلووده، انتقال فرم‌های نوترکیب حاصله به سایرین و ایجاد فرم‌های نوترکیب جدید در گردش در جامعه (Circulate-recombinant forms) می‌شود که ممکن است حتی به فرم غالب در گردش در جامعه تبدیل شود. شناسایی ساب‌تایپ‌ها و CRFs شایع در هر جامعه و هم‌چنین بررسی تنوع ژنتیکی ویروس در هر فرد مبتلا هم چنین در کل جامعه دارای اهمیت بسیاری است زیرا همان طور که اشاره شد، انواع مختلفی از اشکال نوترکیب بین گونه‌ای از ویروس ایجاد شده است که نقش برجخی از آن‌ها در ایجاد پاندمی‌های ویروس HIV-1، به اندازه ساب‌تایپ‌های اصلی ویروس می‌باشد به طوری که در مطالعه‌های انجام شده، وفور اشکال نوترکیب بین گونه‌ای در پاندمی‌های اخیر تایید شده است. افزایش CRF03-AB در روسیه، CRF08-BC,CRF07-BC در چین، CRF15-01B در تایلند و CRF35-AD در ایران و افغانستان گزارش شده است، در حالی که تا سال ۲۰۰۵ فرم غالب ساب‌تایپ ویروسی در ایران نوع A گزارش شده بود.

در مطالعه‌ای که توسط زمانی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از نمونه موکوس دهانی به دست آمده از ۶۱۱ معتاد تزریقی (۵۸۸ مرد و ۲۳ زن) مراجعه‌کننده به مراکز درمان اعتماد در تهران انجام شد، گروه اصلی آلووده به HIV در ایران معتادان تزریقی و فاکتور خطر اصلی در ابتلا

در مطالعه انجام شده توسط ساندرس در سال ۲۰۰۹ در افغانستان که در دو گروه معتادان تزریقی و Sex Workers انجام شد، از ۶۲۳ نمونه معتاد تزریقی در سه شهر هرات، جلال‌آباد، مزار شریف، ۱۱ نمونه HIV مثبت تشخیص داده شده بود که ساب‌تایپ آلوهه‌کننده در تمام موارد CRF35-AD گزارش شد. از ۵۴۴ نمونه تهیه شده از Sex workers فقط یک مورد مثبت تشخیص داده شد که ساب‌تایپ آلوهه کننده E-A بود(۹). در مطالعه انجام شده توسط سعید خان در سال ۲۰۰۶، از ۳۴ معتاد تزریقی HIV مثبت که تعداد کمی از آن‌ها سابقه سفر به کشور امارات را داشته و در آن کشور رابطه جنسی با افراد Sex workers داشتند، تمام موارد آلوهه به ساب‌تایپ A در پاکستان گزارش شده بود(۱۰). در مطالعه انجام شده توسط بیلماز در سال ۲۰۰۶، از ۲۷ بیمار(۲۶ فرد بالغ و ۱ نوزاد) که متولد ترکیه بودند، ۲۰ نفر در اثر رابطه جنسی با جنس مخالف (هتروسکسوال) آلوهه شده بودند، ۲ بیمار در اثر انتقال خون و نوزاد از طریق مادر آلوهه به بیماری مبتلا شده بودند، ۴ نفر به ساب‌تایپ A، ۱۹ نفر به ساب‌تایپ B، یک نفر به ساب‌تایپ C و یک نفر به ساب‌تایپ D و دو نفر به ساب‌تایپ F1 آلوهه بودند. در این مطالعه ساب‌تایپ غالب آلوهه‌کننده در استانبول ترکیه، B گزارش شده بود البته ساب‌تایپ non B نیز دیده شده بود(۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که CRF35-AD شایع‌ترین تحت گونه نوترکیب در بین بیماران معتاد تزریقی است. با توجه به عدم گزارش ژنوتایپ D تاکنون در ایران، احتمال دارد که این فرم ریکامبینت، در نتیجه ابتلای افراد به فرم ریکامبینت در خارج از ایران یا ورود مهاجرین آلوهه به فرم ریکامبینت به کشور باشد که باعث گسترش این ساب‌تایپ‌ها در ایران شده است. بنابراین لازم است مطالعه وسیع‌تری در کشور بر روی ژنوم کامل ویروس به عمل آید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی

موارد گزارش شده بود(۸).

همان طور که مشاهده می‌شود در تمام مطالعه‌هایی که تا به حال انجام شده، درصد مردان آلوهه بیش از زنان است و بیشترین درصد آلوهه در افراد مورد مطالعه، گروه معتادان تزریقی می‌باشند.

در مطالعه ما نیز افراد مبتلا به HIV سابقه اعتیاد تزریقی داشتند که ۹۲٪ آن‌ها را مردان و ۸٪ را زنان تشکیل داده بودند، بنابراین می‌توان گفت که میزان ابتلای مردان در ایران از زنان بیشتر است و ساب‌تایپ CRF35-AD در حال حاضر نیز عمده‌ترین و اصلی‌ترین ساب‌تایپ در معتادان تزریقی در انتقال بیماری HIV-1 در ایران می‌باشد. تا سال ۲۰۰۶، ساب‌تایپ A در معتادان تزریقی و ساب‌تایپ B در افراد هموفیلی گزارش شده بود ولی در سال ۲۰۰۹، ساب‌تایپ CRF35-AD ساب‌تایپ اصلی آلوهه‌کننده در ایران بود. ساب‌تایپ‌های A و G فقط در یک مورد گزارش شده بود و در سال ۲۰۱۰ چهار ساب‌تایپ CRF35-AD، CRF01A-E، B و A به ترتیب با فراوانی ۴۸٪، ۴۳٪، ۵٪ و ۵٪ در ایران گزارش شده است.

طبق گزارش‌های موجود از سال ۲۰۰۵ تا سال ۲۰۰۹، تنوع ساب‌تایپ‌های ویروس HIV-1 هم چنین دامنه گروههای آلوهه در ایران در حال افزایش است و ممکن است طی سال‌های آینده، ساب‌تایپ اصلی در گردش در جامعه نیز در حال تغییر باشد که نیاز به مطالعه مداوم دارد، به عنوان مثال ساب‌تایپ A در معتادان تزریقی از ۱۰۰٪ موارد در سال ۲۰۰۵ به ۵٪ موارد در سال ۲۰۱۰ کاهش یافته است و ساب‌تایپ CRF35-AD، به ساب‌تایپ اصلی در گردش در جامعه تبدیل شده است.

یکی از دلایل حضور این ساب‌تایپ‌های نوترکیب در ایران ممکن است مهاجرت و یا مسافرت به کشورهای همسایه و یا ورود مهاجران آن کشورها به ایران و آلوهه‌گی افراد به ساب‌تایپ نوترکیب موجود در آن جوامع باشد، البته عامل دیگر ممکن است عفونت چندگانه فرد به دو ساب‌تایپ متفاوت و ایجاد ساب‌تایپ نوترکیب جدید در فرد و انتقال آن به سایرین مطرح باشد، جهت بررسی این دو احتمال مطالعه‌های انجام شده در کشورهای همسایه مورد بررسی قرار گرفت.

کیت سازی و ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون، تشکر و قدردانی می‌نمایند. هم چنین از مرکز تحقیقات انتقال خون به دلیل حمایت مالی این پروژه سپاسگزاری می‌گردد.

مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. نویسنده‌گان به این وسیله از آقای شهرام سمیعی و کارکنان محترم بخشندهای

References :

- 1- Epidemic Update. UNAIDS Report on the global AIDS epidemic; 2010. Chapter 2. Available From: http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf.
- 2- Kijak GH, McCutchan FE. HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7(6): 480-8.
- 3- Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008; 358: 1590-602.
- 4- Zamani S, Kihara M, Gouya MM, Vazirian M, Ono-Kihara M, Razzaghi EM, et al. Prevalence of and factors associated with HIV-1 infection among drug users visiting treatment centers in Tehran, Iran. *AIDS* 2005; 19(7): 709-16.
- 5- Naderi HR, Tagliamonte M, Tornesello ML, Ciccozzi M, Rezza G, Farid R, et al. Molecular and phylogenetic analysis of HIV1 variants circulating among injecting drug users in Mashhad-Iran. *Infect Agent Cancer* 2006; 1: 4.
- 6- Sarrami-Forooshani R, Das SR, Sabahi F, Adeli A, Esmaeili R, Wahren B, et al. Molecular analysis and phylogenetic characterization of HIV in Iran. *J Med Virol* 2006; 78(7): 853-63.
- 7- Mousavi SM, Hamkar R, Gouya MM, Safaei A, Zahraei SM, Yazdani Z, et al. Surveillance of HIV drug resistance transmission in Iran: experience gained from a pilot study. *Arch Virol* 2010; 155(3): 329-34.
- 8- Soheilli ZS, Ataiee A, Tootian S, Zadsar M, Amini S, Abadi K, et al. Presence of HIV-1 CRF35_AD in Iran. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25(1): 123-4.
- 9- Hamkar R, Mohraz M, Lorestan S, Aghakhani A, Truong HM, McFarland W, et al. Assessing subtype and drug-resistance-associated mutations among antiretroviral-treated HIV-infected patients. *AIDS* 2010; 24(Suppl2): 585-91.
- 10- Sanders-Buell E, Bose M, Nasir A, Todd CS, Stanekzai MR, Tovanabutra S, et al. Distinct circulating recombinant HIV-1 strains among injecting drug users and sex workers in Afghanistan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26(5): 605-8.
- 11- Khan S, Rai MA, Khanani MR, Khan MN, Ali SH. HIV-1 subtype A infection in a community of intravenous drug users in Pakistan. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 164.
- 12- Yilmaz G, Midilli K, Türkoğlu S, Bayraktaroğlu Z, Kuşkucu AM, Ozkan E, et al. Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. *Int J Infect Dis* 2006; 10(4): 286-90.

Original Article

Cloning of HIV-1 POL gene and its Subtyping

Tabar Asad Laleh R.¹, Sharifi Z.¹, Gharehboghian A.²

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

²Paramedical Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The identification of the genetic diversity and evolution of HIV-1 in the country needs constant molecular survey which could represent useful information to design new diagnostic and therapeutic strategies. Gene cloning strategy was used to evaluate the distribution and genetic diversity of the HIV-1 circulating forms.

Materials and Methods

Overall, 50 HIV-1 seropositive subjects were enrolled in the study. All of them were IDUs and had no history of antiretroviral therapy. The reverse-transcriptase genes of HIV-1 were amplified by nested RT-PCR using specific primers. Then, the RT gene of HIV-1 was cloned into a cloning vector PTZ-57R. Multiple clones from each patient were sequenced. The obtained sequences were aligned with the reference sequences, retrieved from the GenBank database. Multiple sequence alignments were performed by using the ClustalW 1.8 software package. Phylogenetic trees were generated by using the neighbor-joining plot.

Results

Of 50 serum samples, 30 were HIV RNA positive by nested RT-PCR. The nucleotide sequence analysis was performed on the RT genes from multiple clones. All samples were of HIV-1 CRF35-AD strains.

Conclusions

Data showed that CRF35-AD strain is the most prevalent in HIV infected patients. Information on the genetic diversity of viruses in patients and also viruses circulating in the community can be useful in design of diagnostic procedure, infection control programs and treatment.

Key words: HIV-1, Clones, Genetic Diversity

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