استفاده از روش‌های مولکولی RFLP-PCR و توالی‌یابی مستقیم جهت تعیین ژنوتیپ‌های هپاتیت B در زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی استان تهران

فاطمه سالمI

دکتر محمد رضا آقا صادقیII

فوزیه جوادیIII

دکتر فرزین روحوندII

مهسا جولاییIV

گلناز بهرامعلیV

احسان مصطفویVI

دکتر حسین غلامیVII

* دکتر سهیلا حکمتVIII

چکیده

زمینه و هدف: عفونت حاصل ازهپاتیت Bیک مشکل جدی بهداشت جهانی است. طبق ارزیابی هایی که تاکنون انجام شده، هر ساله حدود ۵۰۰۰۰۰ تا ۱/۲ میلیون مرگ ناشی از هپاتیت مزمن، سیروز و هپاتوسلولار در سراسر جهان گزارش می‌شود. از انجائی که داده‌های اپیدمیولوژیکی حاصل از تعیین ژنوتیپ‌ها و ساب ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B، کمک شایانی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمانهای ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماری را فراهم می‌سازد، لذا بر آن شدیم تا ژنوتیپ‌های این ویروس را در زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار: در تحقیقی که به صورت مقطعی در سال ۲۰۰۸، برروی ۱۲۲ نمونه سرمی ازافراد معتاد به مواد مخدر تزریقی حامل HBsAg جهت تعیین نوع ژنوتیپ ویروس HBV درسطح استان تهران انجام گردید، با استفاده از روش‌های مولکولی مقرون به صرفه PCR و RFLP، ژنوتیپ آنها تعیین شد. سپس آزمایشات تأییدی توالی یابی مستقیم انجام و درخت فیلوژنتیکی بااستفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک (Bioedit,Mega,ClustalW) ترسیم گردید و به وسیله آزمون آماری SPSS16، $P<0.05$ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها : ۱۱۵نمونه سرمی پس از انجامNested PCR مثبت گزارش شدند. ژنوتیپ کلیه نمونه‌ها پس از RFLP با استفاده از آنزیم‌های برشیI(BsrI , StyI, EaeI ,DpnI , HpaI) و همچنین توالی یابی مستقیم به همراه رسم درخت فیلوژنتیکی با روش Neighbor-Joining، در ۱۰۰٪ نمونه‌ها، ژنوتیپ D (ساب ژنوتیپ D1 وساب تایپ) **ayw2**را نشان دادند.

نتیجه گیری: در این پژوهش از ۱۱۵ نمونه سرمی مورد مطالعه، مشخص گردید که ژنوتیپ غالب در زندانیان مبتلا، ژنوتیپ D می‌باشد. به عبارتی گونه‌های ژنوتیپی HBV ایرانیان در ارتباط نزدیک با یکدیگر و همگون می‌باشند. حضور این ژنوتیپ با پایین بودن میزان بیماری‌های شدید کبدی ناشی ازعفونت مزمن هپاتیت B (سیروز، هپاتوسلولار کارسینوما) در ایران مطابقت دارد.

کلیدواژه ها: ۱- ژنوتیپ هپاتیت B ۲- افراد معتاد حامل HBsAg ۳- PCR ٤- RFLP

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۱۸

مقدمه

عفونت هپاتیت Bیک مسئله مهم بهداشت جهانی است که توسط ویروس هپاتیت B انتقال می‌یابد.[1] در حال حاضر دو میلیارد انسان در جهان در معرض ویروس HBV قرار گرفته که بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل این ویروس هستند که اکثر آنها در آسیای جنوب شرقی زندگی می‌کنند و دو میلیون نفر را در ایران درگیر نموده است. حاملان ویروس منبع اصلی انتشار آن در جامعه بوده و هر سال حداقل ۱ میلیون نفر در جهان در

این مقاله خلاصه ای است از پایان نامه خانم فاطمه سالم جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر محمد رضا آقا صادقی و مشاوره خانم دکتر سهیلا حکمت، با حمایت سازمان انستیتو پاستور، تهران، ایران سال ۱۳۸۸.

I) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

II) استادیار بیوتکنولوژی، گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

III) کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

IV) کارشناس بیولوژی،گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

V) کارشناس ارشد ژنتیک، گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

VI) دکترای آمار، گروه اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

VII) دکترای حرفه ای علوم آزمایشگاهی، معاون اجرایی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت، تهران، ایران

VIII) دکترای حرفه ای دامپزشکی، عضو هیأت علمی گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران (* مؤلف مسؤول)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

رشته ای با ۳۲۰۰ جفت باز می‌باشد که دارای چهار قالب خواندنی(Open Reading Frame) به نامهای S,C,P,X می‌باشد که تا اندازه ای با یکدیگر همپوشانی دارند.[۳] ORF S کلاً با ORF P همپوشانی دارد و هر سه پروتئین سطحی ویروس یعنی LHBs،MHBs،SHBs را کد می‌کند به این ترتیب که رونویسی و ترجمه سه ناحیه S،Pre-S$_1$،Pre-S$_2$ منجر به تشکیل LHBs شده و ترجمه نواحی S، Pre-S$_2$ منجر به تولید MHBs و ترجمه ناحیه Sمنجر به تولید SHBs می‌گردد که بیشترین آنتی‌ژن موجود در سه نوع ذره ویروسی را تشکیل می‌دهد.[۴و۵] پروتئین‌های متوسط و بزرگ به عنوان شاخص‌های اتصالی HBV برای اتصال به گیرنده‌های هپاتوسیت‌ها عمل کرده و به عنوان اپی توپ‌های لنفوسیتی نیز ایفای نقش می‌کنند.[۶] در مطالعه حاضر از توالی ژن S بهره گرفته شده است، توالی ژن S بسیار محافظت شده نسبت به نواحی ژن Pre-S می‌باشد از آنجایی که این ژن با جایگاه فعال ترانس کریپتاز معکوس ژن P همپوشانی دارد، برای تعیین ژنوتیپ نسبت به نواحیPre-S بسیار مناسب تر می‌باشد.

با استفاده از آنالیزهای تکاملی پیشرفته و بر اساس شباهت بین ژنوم کامل ویروس، تا کنون ۸ ژنوتیپ HBV (A-H) شناسایی شده اند که بر پایه بیش از ۸٪ تنوع توالی کامل ژنوم می‌باشد، علاوه بر ژنوتیپ‌های مختلف، این ویروس بر اساس تغییرات موجود در لوپ هیدروفیل خارجی پروتئین HBs به زیر تیپ هایی تقسیم می‌شود که بر اساس آنتی‌ژنیسیته متفاوت خود با استفاده از روش‌های سرولووژیک قابل تمییز از یکدیگر هستند.[۷] به عنوان نمونه ساب ژنوتیپ‌های HBV شامل A(A$_1$،A$_2$)، B (B$_1$،B$_2$)، C (C$_1$،C$_2$)، D (D$_1$،D$_2$) و ... می‌باشد لازم به ذکر است که بر پایه آنالیز کامل توالی ژنوم، ژنوتیپ‌های B,C,D هر کدام به ٤ ساب ژنوتیپ طبقه بندی می‌شوند.[۸] همه ژنوتیپ‌های HBV منجر به بیماری کبدی شده ولی علایم کلینیکی متفاوتی را از خود بروز می‌دهند به عنوان مثال بیماران آلوده به ژنوتیپ C یا D هپاتیت B معمولاً میزان بالایی از موتاسیون را در ناحیه پروموتور مرکزی نشان داده و در مقایسه با ژنوتیپ‌های A و B میزان پاسخ کمتری را به درمان اینترفرون دارند و باعث پیشرفت سریع بیماری به سمت سیروز کبدی و سرطان کبد خواهند شد.[۹] اما گزارشات متضاد در ارتباط با ژنوتیپ‌های HBV نیز وجود دارد به عنوان نمونه ژنوتیپ HBV/B$_2$ نسبت به ژنوتیپ HBV/C در جوانان تایوانی که سیروز کبدی ندارند بیشتر دیده شده است هم چنین در اسپانیا ژنوتاپ HBV/D نسبت به ژنوتیپ HBV/A در ارتباط کمتری با بیماری‌های شدید کبدی و سرطان می‌باشد.[۱۰و۱۱]

گستردگی ژنوتیپ‌های HBV در بخشهای مختلف جغرافیایی جهان متفاوت است به عنوان نمونه ژنوتیپ Aهر چند توزیع جهانی دارد اما بیشتر در قسمت مدیترانه ای، اروپا، آمریکای شمالی، آفریقا و ژنوتیپ B,C در بیماران آسیایی دیده می‌شود . ژنوتیپ D بیشتر در ناحیه مدیترانه، خاورمیانه، اروپای جنوبی و ژنوتیپ E در بین حاملین آفریقای جنوبی غالب است. دو ژنوتیپ H و G در آمریکای شمالی، فرانسه، مکزیک و ژنوتیپ F در آمریکای مرکزی مشاهده شده است.[۱۲-۱٤]

یکی از راههای انتقال عفونت HBV استفاده از سرنگ آلوده می‌باشد که در انتقال عفونت‌های با منشأ خونی نقش مهمی ایفا می‌کند. با توجه به اینکه ایران جزء نواحی با شیوع متوسط رو به پایین (۱-۳٪) قرار دارد، اما شیوع این ویروس در بین زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی(IVDU) حدود ٥-٤٪می باشد.[۱۵] در تحقیق حاضر از سرم افراد پر خطر جامعه(IVDU) استفاده شده است. از آنجایی که این افراد در محیط‌های ایزوله قرار دارند بنابراین امکان ارتباط جنسی و استفاده از سرنگ مشترک بسیار زیاد است. لذا بر آن شدیم تا مطالعه ای بر روی ژنوتیپ‌های این گروه پر خطر (IVDU) انجام داده تا با اطلاع از نوع ژنوتیپ این افراد در درمانهای ضد ویروسی و پیشگیری از این بیماری بتوان اقدامات لازم را به انجام رسانید.

از آنجایی که تنوع ژنوتیپی HBV در ارتباط با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

الگوهای بالینی متفاوت از عفونت، سختی بیماری کبدی، پیشرفت سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما، حضور ویروس و پاسخ به درمانهای ویروسی بوده، آگاهی از توزیع ژنوتیپ‌های HBV از اهمیت بالایی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمانهای ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماریها برخوردار می‌گردد.[۱۶] لذا از روشی مقرون به صرفهPCR-RFLP (با استفاده از ناحیه ژن S) که قابلیت شناسایی کلیه ژنوتیپ‌ها را داشته باشد بهره گرفته شد و ژنوتیپ‌های این ویروس در معتادان به مواد مخدر تزریقی به عنوان گروه پر خطر تعیین تا در مطالعات مقیاس انبوه در برنامه کشوری، تحقیقات اتیولوژیکی و کلینیکی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

تعداد ۱۲۲ نمونه سرم معتادان تزریقی که همگی آنها از جنس مرد و میانگین تقریبی سنی ۳٤ تا ٥٤ سال برخوردار بودند تهیه گردید. ضمناً بیشتر افراد نمونه‌گیری شده ساکن شهرستانهای تهران و کرج بوده که به همراه پرسشنامه آنها از ندامتگاههای کرج، رجایی شهر، قزل حصار گرد آوری شد. جهت بررسی و تأیید HBsAg، تست ELISA (با استفاده از کیت Bioprobes) انجام گرفت. پس از تأیید سرولوژیکی نمونه‌ها، DNAآنها از ۲۰۰ ماکرولیتر سرم توسط کیت استخراج DNA، (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) ساخت شرکت Roche تخلیص گردید. جهت انجام Nested-PCR، بر روی ناحیه به شدت محافظت شده ٥٨٥ جفت بازی ژن S از ژنوم HBV، یک جفت پرایمرخارجی: O-HBV-F (۲۸۲۰–۲۸۳۷nt، 5′- GGGACACCATATTCTTGG-3′) O-HBV-R (۸۲۱–۸٤۲nt، 5′-TTAGGGTTTAAATGTATACCCA-3′) برای مرحله اول و یک جفت پرایمرداخلی:I-HBV-F (۲۰۳–۲۲۱nt، 5′- GCGGGGTTTTTCTTGTTGA-3′) I-HBV-R (۷٦۷–۷۸۷nt، 5′-GGGACTCAAGATGTTGTACAG -3′) برای مرحله دوم از نواحی مورد نظر طراحی و توسط شرکت Metabion international AG در کشور آلمان ساخته شد. برنامه PCR بر اساس روش ارائه شده توسط Guo-Bing Zengو همکاران انجام گردید که برنامه PCR برای راند اول و دوم ۳٥ سیکل در نظر گرفته شد که شامل دمای جدا شدن اولیه دو رشته الگو در ۱۸۰ ثانیه در ċ ۹٤، دمای جدا شدن دو رشته الگو در ٤٥ ثانیه در ċ ۹٤، دمای اتصال پرایمر به الگو در ٦۰ ثانیه در ċ ٥۳. دمای پیشروی در ۹۰ ثانیه در ċ ۷۲، دمای پیشروی نهایی در ۳٦۰ ثانیه در ċ ۷۲ بود.[۱۷] سپس محصولات PCR، به وسیله الکتروفرز در ژل آگارز ۲٪، با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و در نهایت در زیر نور U.V مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جهت تعیین ۸ ژنوتیپ شایع HBV (A-H) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) با استفاده از ٥ آنزیم BsrI، StyI، EaeI، DpnI، HpaII (ساخت شرکت فرمنتاز) هضم آنزیمی انجام پذیرفت.[۱۷] همچنین محصولات هضم آنزیمی (RFLP) نیز مانند محصولات Nested-PCR در ژل آگارز ۳٪ با نور U.V مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور تأیید نتایج اولیه تعدادی از محصولات PCR پس ازتخلیص از روی ژل به کمک کیت PCR Template purification kit ساخت شرکت (Roche)، مورد توالی یابی مستقیم (Sequence Laboratories Gottingen GmbH, SEQ Lab,Germany) قرار گرفت. با استفاده از نرم افزارهای Bioedit , Mega و Clastal W نمونه‌ها مورد ارزیابی مقایسه‌ای قرار گرفتند. بر اساس نتایج توالی یابی به دست آمده درخت فیلوژنتیکی به وسیله روش Neighbor-Joining که متداولترین روش است ترسیم شد. واطلاعات آماری به کمک نرم افزار(SPSS Version 16)، P<0.05 تحلیل گردید.

یافته‌ها

تعداد ۳۰۰۰ نمونه سرمی جمع‌آوری شده با استفاده از روش ELISA جهت تعیین آنتی‌ژن HBsAg مورد بررسی قرار گرفت که ۱۲۲ نمونه (٤٪) آنها مثبت گزارش شد. پس از انجام Nested-PCRبرای نواحی ۲۰۳ تا ۷۸۷ ژنوم ویروس،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

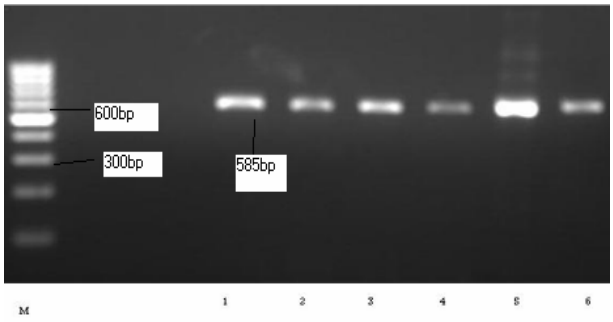
۱۱۵ نمونه حاویHBVDNA بوده و ۷ نمونه منفی گزارش شدند (شکل شماره ۱). سپس به روشRFLP و با استفاده از ۵ آنزیم (**آنزی**م StyI با مکان شناسایی CCAAGG)،BsrI (با مکان شناسایی CCAGT)، DpnI (با مکان شناسایی GATC)، HpaII (با مکان شناسایی CCGG)، EaeI (با مکان شناسایی TGGCCA) الگوی ژنوتیپی بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت که بررسی هضم آنزیمی ۵ الگوی مختلف در ۱۲۲ نمونه سرمی نشان دهنده ژنوتیپ D در نواحی nt۲۸۹ و nt۲۹۶ بودند (شکل شماره۲).

به کمک هضم آنزیمی می‌توان نوع ژنوتیپها را شناسایی نمود بدین صورت که هضم آنزیمی StyI در موقعیت nt ٤٥٥منجر به ایجاد دو قطعه ۲۵۳ و۳۳۲ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ C خواهد شد. هضم آنزیمی BsrI در موقعیت nt ۳۲۸ باعث ایجاد دو قطعه ۱۲٦ و ٤٥۹ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ B و هضم آنزیمی آن در موقعیت nt ۵۰۲ منجر به تشکیل دو قطعه ۳۰۰ و ۲۸۵ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ A/E/G خواهد شد. عدم هضم آنزیمی StyI و BsrI بیانگر وجود ژنوتیپ‌های D/F/H می‌باشد.

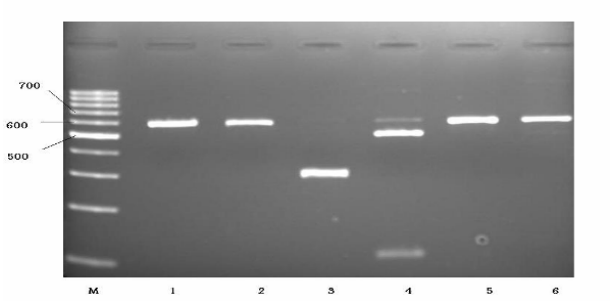
هضم آنزیمی EaeI در موقعیت nt ۳۰۲ باعث ایجاد دو قطعه ۱۰۰ و ٤٥۸ جفت بازی و هضم آنزیمی HpaII در موقعیت nt ۷۰٦ باعث به وجود آمدن دو قطعه ۸۱ و ۵۰٤ جفت بازی به ترتیب موجب تشکیل ژنوتیپهای A و E خواهند شد. عدم هضم آنزیمی این دو آنزیم ژنوتیپ G را موجب خواهد شد. هضم آنزیمیHpaII در موقعیت nt ۲۹۲ باعث تشکیل دو قطعه ۹۰ و ٤۹۵ جفت بازی می‌شود و ژنوتیپ F یا H را ایجاد می‌نماید.

هضم آنزیمی DpnI در موقعیت nt ٤۹۱ دو قطعه ۲۸۹ و۲۹٦ را سبب می‌شود که باعث به وجود آمدن ژنوتیپ D می‌گردد.

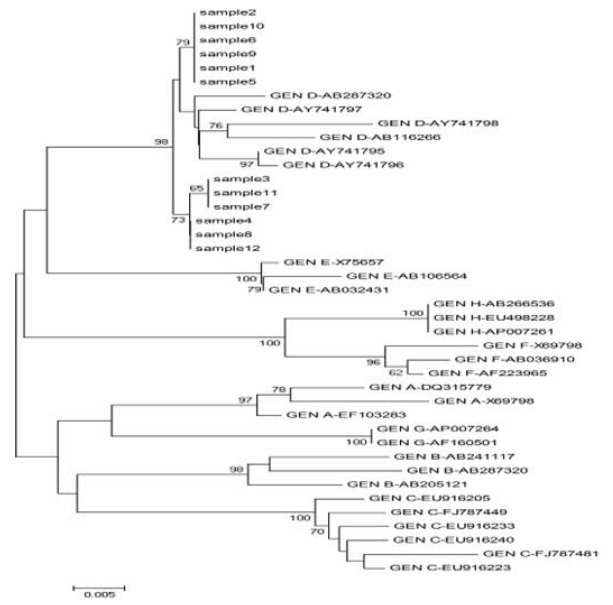
نتایج حاصل از توالی یابی مستقیم با رفرنسهای ژنومی ویروس هپاتیت موجود در بانکهای ژن مورد ارزیابی قرار گرفته و بیانگر ژنوتیپ D، ساب ژنوتیپ D1 و ساب تایپ ayw_2 بوده که برای ارزیابی روش Neighbor-Joining با انجام ۱۰۰۰ بار Bootstrap resampling صحت درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده ارزیابی گشت (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۱– PCR ناحیه S ژنوم HBV (۵۸۵ جفت بازی)در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت B M: مارکر(۱۰۰bp)، ٦-۱: نمونه‌های شش بیمار مبتلا به HBV



شکل شماره ۲– آنالیز هضم آنزیمی ناحیه S ژنوم HBV در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت B
M: مارکر(۱۰۰bp)،۱ : نمونه un digest، ۲ : هضم باآنزیم HpaII، ۳: هضم باآنزیم DpnI ، ٤: هضم باآنزیم EaeI، ۵: هضم باآنزیم StyI، ٦: هضم باآنزیم BsrI



شکل شماره ۳– آنالیز فیلوژنتیکی نواحی S، (Samples 1-12 HBV) جدا شده از زندانیان مبتلا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

بحث و نتیجه گیری

شیوع بیماری هپاتیت B در تمام جهان به صورت اندمیک می‌باشد و تقریبا ۹۰٪ جمعیت جهان در مناطق با شیوع بالا (بیش از ۸٪HBsAg) و یا با شیوع متوسط (۸-۲٪HBsAg)زندگی می‌کنند.[۸] هپاتیت B در ایران، بحرین، کویت شیوع پایین و در آمریکا، امارات شیوع متوسط و در عمان، فلسطین، یمن و سوئد شیوع بالایی را دارد. در کشور ایران به طور متوسط ۱-۳٪ جمعیت حامل ویروس هپاتیت Bهستند ولی میزان شیوع در استانهای مختلف متفاوت است. به عنوان نمونه در استان فارس ۱/۷٪ و در سیستان و بلوچستان به بیش از ۵٪ می‌رسد.[۱۵،۱۸و۱۹] در ایران HBV شایعترین علت سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار کبدی می‌باشد و سالانه ۱۰۰ هزار نفر از این تعداد نیاز به بستری شدن و حدود ۶۰۰۰ نفر هم سالانه در اثر عوارض ناشی از هپاتیت B فوت می‌شوند.[۲۰]

اعتیاد به مواد مخدر تزریقی و انتقال فراورده‌های خونی آلوده مهمترین راه انتقال هپاتیت‌های ویروسی در ایران به شمار می‌روند و کشور ایران به علت قرار داشتن در شاهراه ترانزیت مواد مخدر و نیز جایگاه نسبتاً موجه مصرف تریاک در فرهنگ ایرانی همواره با خطر و عوارض اجتماعی اعتیاد رو به رو بوده است. تخمین زده می‌شود که حدود ۲ میلیون نفر معادل ۳٪ از کل جمعیت ایران به نوعی از مواد مخدر استفاده می‌کنند و معتادان تزریقی به عنوان گروه پر خطری شناخته می‌شوند که بیش از افراد عادی جامعه در معرض آلودگی قرار دارند و به عنوان منابع خطرناک برای انتشار بیماریهای عفونی مانند ایدز و انواع هپاتیت (B وC) محسوب می‌شوند و ابتلا به گونه‌های مختلف ویروس هپاتیت موجب بروز بیماری با شدت بیشتر خواهد شد و در این موارد پاسخ به درمان با داروهای ضد ویروسی کم می‌شود. از فاکتورهای خطر در انتقال این عفونتهای ویروسی در افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی(IVDU)، استفاده از سرنگ مشترک می‌باشد که وضعیت زندان نیز ریسک این عفونتها را افزایش می‌دهد. به همین جهت یک ارتباط مثبت بین زندانی شدن افراد و انتقال این بیماری‌ها وجود دارد.[۲۱]

مطالعات زیادی نشان داده است که میزان شیوع عفونتهای خونی در بین IVDU، زندانیان یا زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی در بخشهای مختلف آسیا متفاوت است.[۲۲]

شیوع هپاتیت B و C در زندانیان ایرلندی ٦٪ و ۲۲٪، در زندانیان ایسلندی ۲۰/۲٪ و۲۳/۲ ٪، در میان زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی دانمارکی و مکزیکی به ترتیب ٦٤٪،۸۷٪ و٦۱/۱٪،۸۲٪، در افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی در مانیپور(شمال شرقی هند) ۱۰۰٪ و ۹۲٪ گزارش شده است.[۲۷-۲۳]

در مطالعه ای که بر روی ۱٦۱ مصرف کننده دارو در کراچی، پاکستان در سال ۲۰۰۳ صورت پذیرفت شیوع هپاتیت B ۷/۵٪ بود که دلیل اصلی فاکتور خطر در ابتلا به عفونت B و C در پاکستان را می‌توان استفاده مشترک از سرنگ بیان نمود.[۲۸]

در یک مطالعه که بر روی افراد زندانی معتاد به مواد مخدر تزریقی در ایران صورت گرفت ۵۱ زندانی (۳/۵٪) دارای هپاتیت B و ۵۱۳ نفر (۳۵/۸٪) دارای هپاتیت C می‌باشند که بیشترین رفتار پر خطر در این گروه استعمال مواد مخدر تزریقی، تاتو کردن و استفاده مشترک از تیغ ریش تراشی می‌باشد.[۲۹] هم چنین میزان شیوع عفونتهای HIV و HCV در بین افراد IVDU در زندانهای شیراز در استان فارس از ایران ۳۰٪ و ۷۸٪ گزارش شده است.[۳۰]

طبق مطالعات انجام گرفته از ۳ زندان استان تهران در تحقیق حاضر، ۳۰۰۰ نفر از زندانیان IVDU مورد آزمایشات سرولوژیکی قرار گرفتند که تعداد ۱۲۲ نفر(٤٪) HBsAg مثبت بودند و از این تعداد ذکر شده ۹/۸٪ و ۵/۷٪ مبتلا به عفونت همزمان HIV و HCV به ترتیب می‌باشند که بیشترین رفتار پرخطر در این گروه را می‌توان استفاده مشترک از سرنگ بیان نمود. لازم به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

ذکر است که به دلیل مسائل اخلاقی (عدم صداقت در گفتار زندانیان در ارتباط با رفتارهای پر خطر جنسی، گاهاً مشاهده شده که منجر به تغییر روند در تفسیر تحقیقات از مسیر اصلی خود می‌شود. لذا در قیاس با دیگر زندانیان کشورهای مختلف (ایرلند،ایسلند،دانمارک و...) درصد آماری بیماری هپاتیت B در ایران مشابه کشور ایرلند می‌باشد. لازم به ذکر است که از دلایل مهم پایین بودن آمار ایران در مقایسه با سایر کشورها را می‌توان به برنامه واکسیناسیون کشوری، تشکیل کلینیک‌های مثلثی و افزایش آگاهی راههای انتقال این بیماری در بین زندانیان بر شمرد.

تعیین ژنوتیپ یک شاخص ژنتیکی برای ژنوم بوده که ژنها بر پایه حذف شدن، اضافه شدن و جانشینی نوکلئوتیدها طبقه بندی می‌شوند. این اطلاعات ژنوتیپی گونه‌های ویژه ویروسی و رفتارهای مولکولی را از گونه تعیین می‌نماید و برای نتایج کلینیکی مفید و سودمند می‌باشد.[۳۱و۳۲]

لذا کشف احتمال ارتباط نوع ژنوتیپ ویروس با شدت بیماری زایی و وانمودهای بالینی و همین طور پاسخ به دارو و درمان، میزان حساسیت آزمایشات کیفی و حتی ارتباط نوع ژنوتیپ با امکان شیوع ناگهانی هپاتیت B، حاد و یا مزمن شدن بیماری، تعیین ریشه و مبدأ عفونت و واکسیناسیون از اهمیت به سزایی می‌باشد.[۳۳و۳۴]

به نظر می‌رسد که تنوع ژنوتیپی HBV بر الگوهای بالینی متفاوت از عفونت، سختی بیماری کبدی، پیشرفت سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما، حضور ویروس و پاسخ به درمان ویروسی مؤثر بوده و آگاهی از توزیع ژنوتیپ‌های HBV از اهمیت بالایی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمانهای ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماریها برخوردار می‌باشد.[۳۳و۳۵]

Chane و همکاران گزارش کردند که ژنوتیپ HBV C به ویژه ژنوتیپ C_e باعث افزایش خطر سرطان کبد در بیماران هپاتیت مزمن می‌شود.[۳۶] در حالیکه در کشور هند و پاکستان ژنوتیپ D نسبت به ژنوتیپ A در ارتباط بیشتر با بیماری‌های شدید کبدی (HCC) می‌باشد.[۹]

داده‌ها ارتباط بین ژنوتیپ‌های HBV و پاسخ به درمان را نیز تأیید نموده اند. در مطالعه ای در آلمان که بر روی ٦٤ بیمار مبتلا به HBV انجام گرفت، نشان داد که ژنوتیپ A نسبت به ژنوتیپ D (۳۷٪ در مقابل ٦٪) پاسخ بیشتری به INF (اینترفرون) می‌دهد.[۳۷] همچنین مطالعات Kao بیان کرد که ژنوتیپ B (٤۱٪) نسبت به ژنوتیپ C (۱۵٪) در درمان ضد ویروسی پاسخ بهتری به INF می‌دهد.[۱٦]

برخلاف پاسخ‌های اینترفرونی، مطالعات بر روی ژنوتیپ‌های HBV و درمان با لامی ودین بر روی شمار کمی از بیماران و هتروژنسیتی آنها در طی درمان صورت پذیرفته است.[۳٤] در مطالعه ای که بر روی بیماران با ساب تایپ adw صورت گرفت نشان داد که این ساب تایپ در مقایسه با ساب تایپ ayw در ارتباط بیشتری با مقاومت به لامی ودین می‌باشد.[۳۸]

ژنوتیپ HBV D در نواحی مدیترانه، خاورمیانه و جنوب شرق آسیا شایع می‌باشد به عنوان مثال نتایج مشابه در ترکیه نشان داده است که همه ٤٤ بیمار مطالعه شده ژنوتیپ D را دارند.[۳۹]

مطالعه دیگر در یمن نشان داد که ژنوتیپ D در جمعیت مقیم آنها غالب می‌باشد در حالیکه ژنوتیپ A تنها در کشورهایی که در ارتباط با کشورهای آفریقایی است دیده شده است.[٤۰]

بررسی‌ها در مصر نشان می‌دهد که ژنوتیپ D بیشترین شیوع ژنوتیپ HBV را دارد در مقابل ژنوتیپ‌های A,B,C در پاکستان غالب می‌باشد.[٤۱]

مطالعه بر روی ۱۰۹ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B در کراچی، همگی ۱۰۰٪ ژنوتیپ D و ۲ بیمار عفونت همزمان با ژنوتیپ A را نشان دادند.[٤۲]

نتایج مطالعه آنالیز فیلوژنتیکی از ناحیه Pre- s_2 ژن HBV در روسیه نیز ژنوتیپ D را به عنوان ژنوتیپ

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

غالب بیان کرد.[۴۳] همچنین در هند تنها ژنوتیپ AوD به عنوان ژنوتیپ غالب می‌باشد و در دهلی نو ژنوتیپ Dدر بیماران مزمن کبدی شیوع بیشتری دارد.[۴۴] در حالیکه در مانیپور(شمال شرقی هند) ژنوتیپ HBV/ C در افراد IVDU غالب می‌باشد و در ارتباط بیشتر با پیشرفت بیماری کبدی است.[۲۷]

در مطالعه ای که توسط علویان و همکاران بر روی ۱۰۹ بیمار HBsAg مثبت با استفاده از روش هیبریداسیون معکوس انجام شده ۹۵ نفر(۸۶٪) هپاتیت مزمن، ۱۱ نفر(۱۰٪) سیروز کبد و ۳ نفر (۲/۷٪) حامل، همگی ژنوتیپ D را نشان دادند.[۴۵]

طبق نتایج کلی بدست آمده در مطالعه حاضر و براساس یافته‌های حاصله، ژنوتیپ D (ساب ژنوتیپ D1 و ساب تایپ ayw_2) به عنوان تنها ژنوتیپ موجود در بین افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی مبتلا به HBV معرفی شده است. در این پژوهش مشخص گردید که ژنوتیپ غالب در بیماران مبتلا، ژنوتیپ D می‌باشد به عبارتی گونه‌های ژنوتیپی HBV ایرانیان در ارتباط نزدیک با یکدیگر و همگون می‌باشند و هیچ گونه ارتباطی بین نوع ژنوتیپ ویروس و جمعیت مورد مطالعه (از نظر اپیدمیولوژیکی) وجود ندارد. این امر با نتایج قبلی به دست آمده در ایران، خاورمیانه، افغانستان، آسیای مرکزی، ترکیه، مصر، دهلی نو، بریتیش کلمبیا کاملاً مطابقت دارد.[۴۶]

در پایان باتوجه به نتایج پژوهش به عمل آمده، به نظر می‌رسد که واکسیناسیون‌های برنامه ریزی شده در گروه‌های پر خطر، بخصوص زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی، آموزش این افراد جهت پیشگیری از ابتلا به این عفونت و همچنین تقویت کلینیک‌های مثلثی در سطح زندان‌ها و درمانهای ضد ویروسی اختصاصی با لامی ودین و سایر نوکلئوزیدها علیه HBV-Genotype D درافراد آلوده و مبتلا به هپاتیت B می‌تواند انتقال HBV (از نوع ژنوتیپ D) را در جمعیت‌های در معرض خطر، کاهش دهد.[۴۷] لذا همچنان برخورد ریشه ای و کارشناسی با موضوع اعتیاد و رسیدگی عاجل به وضع بهداشتی زندانهای کشور کماکان باید در رأس برنامه‌های سیاستگزاران و دست اندرکاران مربوطه در جهت رفع این معضل اجتماعی بهداشتی قرار گیرد.

فهرست منابع

1- Kane M. Gloal program for control of hepatitis B infection. vaccine. 1995; 13: S47-S49

2- MaddrayW.C: Hepatitis B: an important public health issue.J Med Virol. 2000; 61: 362

3- Lusida MI, Surayah, Sakugawa H, Nagano-Fujii M, Soetjipto, Mulyanto, et al. Genotypes and sub types analyses of hepatitis B virus and possible co-infection of HBV and Hepatitis C (HCV) or Hepatitis D (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in surabaya, Indonesia, Microbial. Immunol. 2003; 47(12): 969-75

4- Neurath AR, Adamowicz P, Kent SB, Riottot MM, Strick N, Parker K, et al. characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-s2 region of the hepatitis B virus envelope protein .Mol. Immunol 1986; 23: 991-97

5- Neurath AR, Parker A M. Antibodies to a synthetic peptide from the pre- s 120-145 region of the hepatitis B virus envelope .neutralizing Vaccine.1986; 4: 35-37

6- Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of two new outomated assayes for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection. J. Clin. microbial . 2003; 41:135-43

7- McMillan. Mutations in the hepatitis B virus precore /core gene and core promoter in patients with sever recurrent disease following liver transplantation. Hepatology. 1996; 24(6): 1371-378

8- Norder H , Courouce AM. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived world wide : Genotyes , sub genotypes and HBsAg subtypes. Intervirology 2004; 47: 289-309

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

9- Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile , spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 17: 165-70

10- Sanchez-Tapias JM, Costa J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long term out come of chronic hepatitis B in western patients. Gastroenterology 2002; 123: 1848-856

11- Fields B N, Knipe D M, Howley P M. Fields virology.3 rd ed. Philadelphia, Pa. Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1521-551

12- Kobayshi M, Arase Y , Ikeda K, Tsubota A , Suzuki Y, saitoh S, et al. Clinical characteristics of patients infect with hepatitis B virus genotypes A,B, and C. J Gastroenterol. 2002; 37: 35-39

13- Teles SA, Martins RM, Gomes SA, Gaspar AM, Araujo NM, Souza KP, et al . Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: Serological and molecular follow-up. J Med Virol. 2002; 68: 41-49

14- Stuyver L ,De Gendt S, Van Geyt C , Zoulim F , Fried M , Schinazi RF , et al . A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol. 2000; 81(pt1): 67-74

15- Alavian SM .Fallahiyan F , Lankarani KB. The changing of epidemiology viral hepatitis B in Iran. J Gastrointestin Liver Dis . 2007; 16: 403-6

16- Kao JH,Wu NH,Chen DS.Hepatitis B and the response to interferon therapy. J Hepatol.2000;3:998-1002

17- Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL.A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment lenghth polymorphism patterns of S gene amplicons. World Gastroenterol. 2004; 10(21): 3132-136

18- Lavanchy D. Hepatitis B Virus epidemiology diseases burden, treatment, and current and emerging prevention and control; measures . J Viral Hepat. 2004; 11: 97-107

19- Yoshihiro K, Richard WC. Molecular Biology of Virus,CRC press. Inc.1994; chapter 8: 89-123

20- Merat S, Malek zadeh R, Rezvan H , Khatibian M. Hepatitis B in Iran. Arch Iran Med. 2000; 3:192-201

21- Keppler k, Stover H. Transmission of infectious diseases during imprisonment –result of a study and introduction of a model project for infection prevention in Lower Saxony, Germany. Gesundheitswesen. 1999; 61: 207-13

22- Ichimura H, Kurimura O, Tamura I, Tsukue I, Tsuchie H, Kurimura T. Prevalence of blood-borne viruses among intravenous drug users nd alcoholics in Hiroshima, Japan. International Journal of STD and AID. 1995; 6: 441-43

23- Long J, Allwright S, Barry J, Reynolds SR, Thornton L, Bradley F, et al. Prevalence of antibodies to Hepatitis B, Hepatitis C and HIV and risk factors entrants to Irish prisons, a national cross sectional survey. BMJ. 2001; 323(7323): 1209-13

24- Anonymous. Hepatitis B vaccination of inmates in correctional facilities. MMWR Center for disease control and prevention. 2004; 53(30): 681-83

25- Christensen PB, Krarup HB, Niesters HG, Norder H, Georgsen J. Prevalence and incidence of blood borne viral infections among Danish prisoners. Eur J Epidemiol. 2000; 16(71):1043-49

26- Samuel MC, Doherty PM, Bulterys M, Jenison SA. Association between heroin use needle sharing and tattoos received in prison with hepatitis B and C positivity among street-recruited injection drug users in new Mexico USA. Epidemiol Infect. 2001; 127(3): 475-84

27- Saha MK, Chakrabarti S, Panda S, Naik TN, Manna B, Chatterjee A, et al. Prevalence of HCV and HBV infection amongst HIV seropositive intravenous drug user and their non-injecting wives in Maipur, Indian. J Med Res. 2000; 111: 37-39

28-Alaf A, Shah SA, Zaidi NA, Memon A, Nadeem-ur-Rehman, Wray N. High risk behaviors of injection drug users registered with harm reduction program in Kraachi, Pakistan. Harm Reduct J. 2007; 4: 7

29- Alizadeh AH, Alavian SM, Jafari K, Yazdi N. prevalence of hepatitis C virus infection and its related risk factor s in drug abuser prisoners in Hamean-Iran.World J Gastroenterol. 2005; 11(26): 4085-89

30- Zamani S, Ichikawa S, Nassirimanesh B, Vazirian M, Ichikawa K, Gouya MM, et al. Prevalence and correlates of hepatitis C virus infection among injecting drug users in Tehran. Int J Drug Policy. 2007;18(5): 359-63

31- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, et al. Hepatitis B virus genotypes distribution among chronic hepatitis B virus carriers in shanghais china. Intervirology. 2001; 44: 43-47

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

40-Sallam TA, William Tong CY. African links and Hepatitis B virus genotypes in the republic of Yemen. J Med Virol. 2004; 73: 23-28

41-Saudy N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Aal AA, Zaid MA, et al. Genotypes and phylogenetic characterizations of hepatitis B and delta viruses in Egypt . J Med Virol. 2003; 70: 529-36

42-Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of Hepatitis B virus strains in Karachi. BMC Gastroenterology. 2006; 6: 20

43-Flodgren E, Bengtsson S, knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, et al. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: Molecular analysis of prevailing Hepatitis B and D virus strains. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3311-316

44- Kar P, Polipalli SK, Chttopadhyay S, Hussain Z, Malik A, Husain SA, et al. Prevalence of Hepatitis B virus genotype D in precore mutants among chronic liver diseases patients from New Dehli ,India. Dig Dis Sci. 2007; 52: 565-69

45- Alaviyan SM, Keyvani H, Rezaie M, Ashayeri N, Sadeghi HM . Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. World J Gastroenterol. 2006; 12: 5211-213

46- Vaezjalali M, Alavian SM, Jazayeri SM, Nategh R, Mahmoodi M, Hajibeigi B, et al. Genotype of hepatitis B virus Isolated from Iranian Chronic Carriers of the Virus. Hepatitis Monthly. 2008; 8(2): 97-100

47- Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with sever liver disease in northern India than is genotype D . Indian J Gatroenterology. 2005; 24: 19-22

32-Locarnini S, McMillan J , Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. Semin liver Dis. 2003; 23: 5-20

33-Swenson PD, Riess JT, Krueger LE. Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies.Virol Methods. 1991; 33: 27-38

34-Courouce–Pauty AM, Plancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. Vox sang. 1983; 44:197-211

35-Karin K– Ljunggren. Genetic Variability in Hepatitis B Viruses. J of General Virology. 2000; 83: 1267-280

36-Chane HL, Tse CH, Mo F, Koh J , Wong VW, Wong GL, et al. High Viral load and Hepatitis B virus subgenotype Ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol. 2008; 26: 177-82

37-Erhardt A, Heineke U, Blondin D, Gerlich W, Adams O, Heintges T,et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. Hepatology 2000;31:716-725.

38-Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J. et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotype in china. J Viral Hepat. 2005; 12: 609-17

39-Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, et al. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. Infection. 2004; 32: 24-29

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

Using RFLP -PCR and Direct Sequencing to Determine HBV Genotypes in Intravenous Drug User Prisoners in Tehran Province

F.Salem,BS [I] M.R.Aghasadeghi,PhD [II] F.Javadi,MS [III]
F.Roohvand,PhD [II] M.Joolaee,BS [IV] G.Bahramali,MS [V]
F.Mostafavi,PhD [VI] H.Gholami,MD [VII] *S.Hekmat,DVM [VIII]

Abstract

Background & Aim: Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem. Current researches indicate that 500,000 to 1.2 million deaths per year are caused by chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). HBV genotyping and subtyping provide epidemiological data that may contribute to vaccination and antiviral treatment strategies, diagnostic development, and determination of the course of the disease. Hereby we decided to evaluate the genotype of this virus in prisoners who are addicted to some kinds of injection drugs.

Patients and Method: In this cross- sectional study which was done in Tehran province in 2008, HBV genotypes of serum samples from 122 HBsAg positive intravenous drug user prisoners were determined using cost-effective and standard methods such as PCR and RFLP. Then direct sequencing was utilized to confirm and revaluate the results of PCR-RFLP. The phylogenetic tree was drawn by computer biosoftware (Bioedit,Mega,ClustalW) and the results were assessed by statistical analysis SPSS v.16 ($P<0.05$)as well.

Results: 115 samples were reported positive when analyzed by nested PCR. All of these positive samples were reported to be genotype D by RFLP using BsrI , StyI, EaeI ,DpnI , and HpaI enzymes. In addition,phylogenetic tree drawn by Neighbor-Joining method in 100% of the subjects confirmed the existence of genotype D(subgenotype D1, subtype ayw2).

Conclusion: 115 HBV isolates from prisoners represent homogenous genotypic diversity , and our results concur with other reports from Iran, all showing that genotype D is the only detectable genotype in this study.This genotype with a low rate of severe liver diseases caused by HBV (cirrhosis, hepatocellular carcinoma) is in accordance with our results.

Key Words: 1) Hepatitis B Genotype 2) HBsAg positive Intravenous Drug User 3) PCR 4) RFLP

This article is an abstract of Ms.Salem's thesis advised by Dr.Aghasadeghi and read by Dr.Hekmat in partial fulfillment of an MS degree in biochemistry.
I)MS Student of Biochemistry.Payame Noor University.Tehran, Iran.
II) Assistant Professor of Biotechnolog. Hepatitis and AIDS Department. Pasteur Institute.Tehran. Iran.
III) MS in Molecular Biology. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran. Iran.
IV) BS in Biology. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran. Iran.
V)MS in Genetics. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran. Iran.
VI) PhD in Statistics.Department of Epidemiology. Pasteur Institute.Tehran. Iran.
vII) MD in Laboratory Sciences. Executive Deputy of Health Reference Laboratory.Tehran, Iran.
*VIII)Doctor of Veterinary Medicine(DVM). Hepatitis and AIDS Department. Pasteur Institute.Tehran. Iran. (*Corresponding author)*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]