مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی جهش‌های پیش از درمان منجر به مقاومت در برابر داروهای مهارکننده مستقیم ویروس هپاتیت سی در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن ژنوتایپ b ۱ در ایران

راضیه امینی سی سخت: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، و بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پونه رحیمی: بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) pooneh5376@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هپاتیت سی تنها میزبان آن انسان می‌باشد. در کشور ما ژنوتیپ‌های 1a، 3a و 1b شایع‌ترین ژنوتیپ‌ها هستند. هدف از این پژوهش تعیین فراوانی بروز جهشهای مقاوم به دارو در نواحی NS5A و NS5B که هدف دارو های جدید ضد ویروس هپاتیت C هستند در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتیپ 1b بود که با این داروها تحت درمان قرار داشتند.

روش کار: در این پژوهش تعداد ۲۹ بیمارشرکت داوطلبانه داشتند که مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتایپ 1b بودند و سابقه درمان ناموفق با ریباورین و انترفرون داشتند ولی از نظر درمان با داروهای مستقیم الاثر مورد بررسی در این طرح "بکر یا native" محسوب می‌شدند. ژنوم ویروس از نمونه سرم بیماران با استفاده از کیت استخراج RNAی ویروسی شرکت Roche استخراج شد. RT-PCR و nested PCR با استفاده از کیت تاکارا و پرایمرهای اختصاصی خارجی و داخلی نواحی هدف بطور جداگانه انجام گردید. سپس محصولات تعیین توالی شد و نتایج توسط نرم افزار Bio Edit ورژن (۷،۹،۵،۳) بررسی شد. سپس با استفاده از نرم افزار CLUSTAL W در نرم افزار MEGA ورژن (۶) هم ترازی توالی ها (Multiple Sequencing) صورت پذیرفت.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل توالی‌های هدف به‌منظورشناسایی جهش های مقاوم به داروهای مورد بررسی، بروز این جهش‌ها را در برابر دو داروی داکلاتاسویر و لدیپاسویر در ۵ بیمار (۱۷/۲۴٪) نشان داد. هرچند به‌دلیل عدم وقوع جهش‌های مقاوم به داروی سوفوسبوویر در ناحیه NS5B، تمام بیماران به درمان ضد ویروسی پاسخ دادند و این پاسخ در پیگیری‌های بعدی نیز پایدار بود.

نتیجه گیری: استفاده از داروی سوفوسبوویر در درمان بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتایپ 1b که سخت‌ترین ژنوتایپ این ویروس از نظر پاسخ به درمان‌های ضد ویروسی است با نتایج بسیار امیدوارکننده ای همراه بود و علیرغم شناسایی جهش‌های مقاوم به داروهای داکلاتاسویر و لدیپاسویر، استفاده از سوفوسبوویر به درمان قطعی بیماران انجامید. هرچند بدلیل ماهیت جهش پذیری ویروس پایش روند بروز جهش‌های احتمالی که ممکن است منجر به مقاومت در برابر سوفوبوویر شود تا حذف ویروس از کشور بسیار ضروری است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: این پروژه براساس طرح مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره ۱۰۱۲ و کد اخلاق IR.PII.REC.1397.61 انجام شده است.

کلیدواژه‌ها

هپاتیت C،
ژنوتایپ b ۱،
داکلاتاسویر،
لدیپاسیور،
سوفوسبوویر

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۱۳

تاریخ چاپ: ۹۹/۱۱/۰۵

شیوه استناد به این مقاله:

Amini Sisakht R, Rahimi P, Bahramali G. Detection of Pre-treatment mutations leading to resistance to direct hepatitis C virus blocking drugs in patients with chronic hepatitis C. Razi J Med Sci. 2021;27(11):15-24.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;27(11):15-24. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Detection of Pre-treatment mutations leading to resistance to direct hepatitis C virus blocking drugs in patients with chronic hepatitis C

Razieh Amini Sisakht: Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran, & Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Pooneh Rahimi: Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (* Corresponding author) pooneh5376@yahoo.com

Abstract

Background & Aims: Human is the only host of hepatitis C virus. This virus is a member of Hepacivirus genus in Flaviviridae family. It is an enveloped virus contains a positive single stranded RNA with approximately 9.6 Kb. The main rout of transmission is through the blood and secreted fluids so, HCV is considered as a blood- borne virus causing a spectrum of mild illness to end-stage liver disease such as hepatocellular carcinoma (HCC). There are 7 confirmed genotypes. It is estimated that the prevalence of HCV infection is between 0.3%- 0.5% among the general population to 32.1% among high-risk populations. According to studies, genotypes 1a, 3a and 1b are the most common genotypes in Iran. No effective vaccine against HCV infection has been developed instead, advances in antiviral treatment using drugs that directly affect specific viral genomic regions to inhibit virus replication have promising results, particularly in the treatment of genotype 1 of HCV virus as a hard to treat genotype. These drugs have been used in our country for few years to treat patients with chronic hepatitis C infection so, according to the mutation prone characteristic of HCV genome which could be resulted in drug resistance known as resistance associated substitutions (RASs). Monitoring of their effectiveness for early detection of resistant mutations has the great importance. As the treatment failure could be resulted from these DAAs resistance substitutions especially those to NS5A inhibitors so, they are considered a major challenge for HCV treatment and elimination. According to the European Association for the Study of Liver Diseases (EASL) recommendation baseline identification of RASs to DAAs including LDV/SOF and DCV/SOF for HCV genotypes such as 1b could be useful to decide on treatment strategy such as its duration or if needed adding other antiviral drugs like ribavirin (RBV).
The aim of this study was to determine the frequency of naturally occurring drug resistant mutations in NS5A and NS5B regions as targets of new hepatitis C antiviral drugs; Daclatasvir/Ledip and sofosbuvir in patients with chronic HCV-1b infection who were going to be under treatment with these drugs.
Methods: In this study, there were 29 volunteers with chronic HCV-1b infection who had failed to be treated with ribavirin and Peg-interferon and were considered "naïve" to direct acting anti-viral drugs such as Daclatasvir/Ladipasvir as the NS5A inhibitors and sofobuvir as the NS5B inhibitor The baseline HCV RNA level and HCV genotyping were measured in the diagnostic laboratories as commercial accredited services before the initiation of HCV antiviral therapy. The blood sampling procedures were explained to the patients clearly and the consent form for using their blood samples for further analysis was signed by each volunteer or their official custodian. This study was approved by the Ethics Committee of the Pasteur Institute of Iran (no: IR.PII.REC.1395.81) according to the standard biosecurity and institutional safety procedures. The current study was conducted according to the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Viral genome was extracted from serum specimens using theHighPure Viral Nucleic Acid kit, Roche, Germany. cDNA synthesis was done using Yekta Tajhiz Azma Kit (Iran), and nested PCR was performed by using specific external and internal primers separately by using the Ex Taq™ kit (TaKaRa, Clontech,

Keywords
Hepatitis C virus,
Genotype 1b,
Daclatasvir,
Ledipasvir,
Sofosbuvir

Received: 04/10/2020
Published: 24/01/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

Japan). The PCR products underwent electrophoresis on a 1.5% agarose gel containing safe stain (YTA, Iran) and the specific bands were purified using the Yekta Tajhiz Azma Gel and PCR purification kit (YTA, Iran). Then the purified PCR fragments accompanied by the related specific inner primers for each region were sent to GenFanavaran company to be sequenced (Sanger sequencing) in South Korea in both directions using a BigDye Terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer–Applied Biosystems Inc., CA). The chromatogram was used to assess the nucleotide substitutions in whole sequences, and nucleotide redundancy was considered when representing ≥15% of the sequence population. The results of nucleotide sequences were aligned against reference sequences of HCV-1b and were verified by BioEdit software version (7.9.5.3). Multiple alignment was performed by using CLUSTAL W software in MEGA version (6). The amino acid substitutions were analyzed using geno2pheno [hcv] web application.

Results: Resistance associated mutations in NS5A region against anti HCV drugs (Daclatasvir/Ledipasvir) in this study were identified in 5 (17.24%) patients out of 29 patients. The identified amino acid substitutions/RASs in the NS5A region of patients with HCV-1b infection were L28A 6.9%, L31I/M/V 10.34%, P58D 6.9%, and Y93H /N substitutions were identified in all 5 patients (17.24%). In this study, substitutions in aa 93 were the most identified substitutions (17.24%) while; substitutions in aa 28 and 58 each were detected only in two patients (6.9%). Paired NS5A amino acid substitutions were identified in 17.24% (5/29) patients including L28A+Y93H in 2 patients, L31M+P58D+Y93H in one patient, L31I+Y93N, and L31V+Y93H each in one patient.

All patients responded to anti-HCV therapy due to the absence of resistant associated mutations in NS5b region that is the viral genomic target region of sofosbuvir, and this response was sustained at follow-up.

Conclusion: Combinations of different Direct- Acting Antiviral drugs (DAAs) have been used to treat HCV infection to achieve Sustained Virologic Response (SVR) even in patients with chronic HCV infection with failure to previous HCV antiviral therapy. They are highly efficacious and have fewer side effects with shorter treatment duration. However, resistance associated substitutions (RASs) to these Direct-Acting Antiviral drugs may emerge either before treatment with DAAs or following drug exposure. The detection rate of NS5A amino acid substitutions/RASs in this study was 17.24% which is in concordance with other studies that suggest the overall proportion of NS5A RASs in baseline varies between <10% to >50%. Many researchers believed that achieving SVR is a multifactorial event such as liver conditions (cirrhosis), the previous history of IFN-based treatment, the existence of some IFNL3/4 polymorphisms, consuming alcohol, including infection with some genotypes like 1b, the presence of RASs, being mono-infected with HCV or co-infected such as HIV/HCV, and viral load could affect the treatment response in a negative way.

Use of Sofosbuvir in treatment of patients with chronic HCV-1b infection which is the most difficult to treat HCV genotypes, was very promising. Despite identification of resistant mutations against Daclatasvir and Ledipasvir the use of Sofosbuvir resulted in complete treatment of patients. However, due to the mutable nature of the virus, monitoring of occurrence of possible resistant mutations against Sofosbuvir is necessary to achieve HCV elimination in our country.

Conflicts of interest: None

Funding: Pasteur Institute of Iran (No., 1012).

Cite this article as:

Amini Sisakht R, Rahimi P, Bahramali G. Detection of Pre-treatment mutations leading to resistance to direct hepatitis C virus blocking drugs in patients with chronic hepatitis C. Razi J Med Sci. 2021;27(11):15-24.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

هپاتیت که از نظر لغوی به معنای التهاب کبـد اسـت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

می‌تواند در اثر عوامل مختلف از جمله بسیاری از داروها، ویروس‌های مختلف، بیماری های خود ایمنی و بیماری‌های ژنتیکی پدید آید. ویروس هپاتیت سی که تنها میزبان آن انسان است متعلق به خانواده فلاوی ویریده و جنس هپاسی ویروس (Hepacivirus) می باشد. ژنوم ویروس هپاتیت سی به صورت RNA تک رشته‌ای با پلاریته مثبت از مهمترین ویروس‌هایی است که با آلوده کرن سلول های کبدی، موجب التهاب کبد (هپاتیت) می شود. این ویروس همچنین می تواند موجب آسیب های دائمی کبد مثل سیروز (تنبلی کبد)، سرطان کبد و نارسایی کبد گردد. بلافاصله پس از اینکه فردی به ویروس هپاتیت سی آلوده شود، وارد مرحله ابتدایی (فاز حاد) بیماری می گردد. دربرخی افراد پس از این مرحله ویروس هپاتیت به طور دائمی از بدن پاک شده و هرگز مشکل کبدی پدید نمی آید ولی حدود ۸۵ درصد افرادی که به این ویروس مبتلا می شوند وارد فاز پیشرفته و طولانی مدت بیماری (هپاتیت سی مزمن) می شوند. بر اساس تخمین سازمان بهداشت جهانی ۱۷۰ میلیون ناقل هپاتیت سی در جهان وجود دارد که تقریبا ۸۰ درصد آنها مبتلا به نوع مزمن، و سرانجام تعدادی از آنها مبتلا به فیبروز کبد، سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار می‌شوند (۱). ویروس هپاتیت سی براساس تفاوت توالی نواحی NS5a Core,E1,5`UTR در سویه های ویروس، ۱۲ ژنوتیپ برای آن پیشنهاد شده است که ۷ ژنوتیپ آن با حدود ۱۵۹ ساب تایپ مورد تایید نهایی است. ژنوتیپهای 1a و 1b دارای بیشترین شیوع در سراسر جهان و همچنین در کشورما هستند، علاوه برآنها ژنوتایپ‌های 3a، 2 و 4 نیز از ژنوتایپهای شایع در کشور بشمار می‌روند. ژنوتایپ های این ویروس در شدت بیماری، احتمال مزمن شدن و همچنین در پاسخ به درمانهای ضد ویروسی با یکدیگر تفاوت دارند بطوریکه ژنوتایپ ۱ و بویژه ساب تایپ 1b از سخت ترین سابتایپ های این ویروس در پاسخ به درمان به شمار میرود.

علیرغم عدم موفقیت در ساخت واکسن موثر علیه این ویروس، طراحی و ساخت داروهای ضد ویروسی بویژه داروهای نسل جدید که تحت عنوان داروهای با اثر مستقیم و اختصاصی بر ژنوم ویروس شناخته می شوند. (Direct acting antiviral drugs;DAA) با نتایج چشمگیری در درمان عفونتهای هپاتیت سی همراه بوده است (۲، ۳).

روش کار

در این پژوهش تعداد ۲۹ بیمارشرکت داوطلبانه داشتند که مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتایپ 1b بودند. همه بیماران سابقه درمان ناموفق با ریباویرون و انترفرون داشتند ولی از نظر درمان با داروهای مستقیم الاثر مورد بررسی در این طرح "بکر یا Native" محسوب می‌شدند. پس از انجام مشاوره و ارائه توضیحات در مورد نحوه مشارکت در طرح، پرسشنامه توسط بیماران تکمیل شد و در ادامه رضایت‌نامه از بیماران داوطلب اخذ گردید. همچنین پروژه مذکورپس از بررسی در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران، با کد اخلاق IR.PII.REC.1397.61 مورد تصویب قرار گرفت. بیماران مذکور بطور مستمر تحت نظر جناب آقای دکتر علویان و تیم ایشان قرار داشتند و پیش از آغاز درمان با داروهای جدید، مراحل نمونه گیری و جداسازی سرم و همچنین انجام آزمایش سنجش بار ویروسی (Viral load) در آزمایشگاه مرکز بیماری‌های کبد خاورمیانه انجام گردید. سپس سرم‌ها در شرایط سرما به بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران ارسال و در فریزر ۸۰- نگهداری گردید. طراحی پرایمر بر اساس روش Nested PCR برای نواحی هدف داروها (NS5A و NS5B) بر اساس توالی های این دو ناحیه در ژنوتایپ 1b انجام گرفت. بیماران در طی درمان در فواصلی از نظر بار ویروسی تحت بررسی آقای دکتر علویان و همکاران ایشان قرار داشتند. طول مدت درمان براساس نظر پزشک معالج بین ۸ تا ۱۲ هفته بود. به‌منظور تایید پاسخ به درمان (sustained virologic response; SVR) پیگیری بیماران پس از درمان و عدم شناسایی ویروس در نمونه آن‌ها تا یکسال بعد نیز ادامه یافت.

طراحی پرایمرهای مورد استفاده برای ژنوتایپ 1b، نواحی NS5B و NS5A در ابتدا با استفاده از نرم افزار Gene Runner و بر اساس توالی‌های مرجع HCV 1b به دست آمده از NCBI انجام گرفت و سپس پرایمرهای طراحی شده مجدد با نرم افزار Primer blast بررسی شد. روش مورد استفاده برای تکثیر نواحی ژنی مورد نظر، برای ناحیه NS5A روش RT-PCR با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی و برای ناحیه NS5B به دلیل طولانی بودن این ناحیه ۲ مرحله nested-PCR در نظر گرفته شد بنابراین این ناحیه در طراحی پرایمر به ۲ قسمت همپوشان تقسیم شد تا در نهایت محصول داخلی که تعیین توالی می‌شود بیشترین طول این ناحیه را دربر بگیرد. توالی پرایمرهای اختصاصی هریک از نواحی در جداول زیر قابل مشاهده است. از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse به میزان ۱۰pmol مورد نیاز بود. به همین علت پرایمرها به میزان یک دهم رقیق شدند. مشخصات پرایمرهایی که در PCR مورد استفاده قرار گرفتند در جداول ۱-۵ آمده‌اند.

استخراج ژنوم ویروس

جهت استخراج ژنوم ویروس از نمونه سرم بیماران از کیت High pure viral Nucleic Acid Kit شرکت Roche.Cat. No.11858874001 استفاده گردید. تمام مراحل استخراج RNA در زیر هود انجام گرفت. پس از استخراج ژنوم ویروس RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی خارجی تکثیر کننده نواحی NS5A و NS5B به طور جداگانه انجام گرفت. همانگونه که قبلا اشاره شد، این ناحیه به ۲ بخش همپوشان تقسیم شد (NS5B1 و NS5B2) تا هر بخش به منظور طراحی پرایمر بر اساس Nested PCR هدف قرار گیرد.

برای تکثیر ناحیه NS5A ابتدا سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit شرکت یکتا تجهیز آزما برای ناحیه NS5A انجام گرفت. بر طبق دستورالعمل کیت، مخلوطی شامل ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رندوم هگزامر به ۱۲ میکرولیتر RNA به همراه ۰/۵ میکرولیتر آب به این مخلوط اضافه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت بعد روی یخ گذاشته شد و سپس ۴ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۵

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی (NS5A)

Name	Primer sequence (5’ to 3’)	(bp)Product size	Length	Start	Stop
Forward Primer	GACCCCTCYCAYATYACAGCAG	737	22	6858	6879
Reverse Primer	GGACATTGAGCAGCAKACGAC		21	7575	7595

جدول ۲- توالی پرایمر های خارجی (NS5B1)

Name	Primer sequence (5’ to 3’)	(bp)Product size	Length	Start	Stop
Forward Primer	CGAAGGCGTCCACAGTTAAGG	765	21	218	238
Reverse Primer	CCGCACTCTCACAGATAACGAC		22	982	961

جدول۳- توالی پرایمرهای داخلی (NS5B1)

Name	Primer sequence (5’ to 3’)	(bp)Product size	Length	Start	Stop
Forward Primer	GTCAACCACATCCGCTCCGT	612	20	346	365
Reverse Primer	GTCGTCTCCACACACACGAGCA		20	957	938

جدول٤- توالی پرایمرهای خارجی (NS5B2)

Name	Primer sequence (5’ to 3’)	Product size (bp)	Length	Start	Stope
Forward Primer	AGGCCATAAGGTCGCTCACAG	981	21	752	772
Reverse Primer	GGAGTAGGCAAAGCATGAACCAG		23	1732	1710

جدول ۵- توالی پرایمرهای داخلی (NS5B2)

Name	Primer sequence (5’ to 3’)	Product size (bp)	Length	Start	Stop
Forward Primer	ACATGTTACTTGAAAGCCTCTGCG	805	24	880	903
Reverse Primer	GATACACGTCTCCCCCGCTGTA		22	1684	1663

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

میکرولیتر RNasein و ۱ میکرولیتر M-MLV به آن اضافه و سانتریفیوژ شد. حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در انتها برای ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. برای تکثیر ناحیه NS5B، از کیت تاکارا Primescript one step RT- PCR kitver.2.Cat.NO.RR055A - 1 استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر 2X One Step Buffer، ۰/۵ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۵میکرولیتر Reverse Primer، ۱ میکرولیتر Prime Script one step Enzyme و ۱۰/۵ میکرولیتر RNA استفاده شد که حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس مستر میکس حاصل به دستگاه ترموسایکلر منتقل و برای ناحیه NS5B1 دمای ۵۸ درجه سانتی گراد و برای ناحیه NS5B2 دمای ۵۷ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد.

سپس مرحله دوم آزمایش PCR با استفاده ازکیت Takara Ex Taq (Mg2 + free Buffer) Cat. No. RR01AM و پرایمر های اختصاصی داخلی برای هر ناحیه انجام گرفت. طبق دستورالعمل کیت مقادیر ۵ میکرولیتر بافر، ۴ میکرولیتر MgCl2، ۴ میکرولیتر dNTP، ۱۴ میکرولیتر Forward Primer، ۱۴ میکرولیتر Reverse Primer، ۰/۲۵ میکرولیتر EX Taq، ۱۶/۸میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA Template مخلوط شد سپس مسترمیکس حاصل به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. تعداد ۴۵ چرخه برای ناحیه NS5A ۴۵ و دمای اتصال برای این ناحیه ۵۷ درجه سانتی گراد و برای ناحیه NS5B1 تعداد تکرار چرخه در مرحله یک ۳۵ بار و دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد وبرای ناحیه NS5B2 تعداد تکرار چرخه در مرحله یک ۳۵ بار و دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. همچنین تعداد تکرار چرخه برای ناحیه NS5B1 و NS5B2 در مرحله دو ۳۵ بار و دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی گراد برای هر کدام در نظر گرفته شد.

باند اختصاصی ۷۳۷ bp برای ناحیه NS5A و باند اختصاصی ۶۱۲ bp برای ناحیه NS5B1 و باند اختصاصی ۸۰۵ bp برای ناحیه NS5B2 بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد.

سپس باند مورد نظر با استفاده از کیت GEL / PCR Purification mini kit شرکت یکتا تجهیز تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت فزاپژوه ارسال گردید. نتایج تعیین توالی توسط همترازی سازی چند توالی (Multiple Sequencing Alignment) و با استفاده از توالیهای رفرانس ژنوتایپ 1b از نواحی NS5A و NS5B بدست آمده از سایت NCBI و توسط نرم افزار MEGA ورژن ۶ و نرم افزار داخلی آن CLUSTAL W، بررسی و تجزیه و تحلیل همردیف سازی ها با استفاده از نرم افزار Bio Edit ورژن (۷,۹,۵,۳) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از آنالیز آماری Chi Square Test (X^2) ارتباط بین متغیرجنس و جهش‌های مقاوم به دارو در نواحی مورد نظر بررسی شد.

یافته‌ها

حجم نمونه در این مطالعه ۲۹ بیمار براورد شده بود که ۱۶ بیمار مرد و ۱۳ بیمار زن بودند. میانگین سنی برای مردان ۶۰ و برای زنان ۵۲/۵ سال بود. نحوه ابتلا به ویروس هپاتیت سی در ۲۵ بیمار از طریق تزریق با سرنگ آلوده و در ۴ بیمار انتقال جنسی بود. همه بیماران سابقه درمان با ریباویرین و انترفرون آلفا داشتند که به شکست درمان و بازگشت بیماری منجر شده بود ولی هیچکدام سابقه مصرف داروهای مورد نظر در این بررسی یعنی داکلاتاسویر و لدیپاسویر که به‌همراه سوفوسبوویر تجویز می‌شوند را نداشتند. در نهایت از ۲۹ نمونه (۱۷/۲۴٪) دارای جهش در ناحیه NS5A بودند. در ناحیه NS5B (b1,b2) که محل تاثیر سوفوسبوویر است جهش مقاوم به دارو مشاهده نشد. این بیماران از نظر مقدار بار ویروسی (لود ویروس) و میزان آنزیم های کبدی قبل از آغاز درمان و در طی مصرف داروها بررسی می شدند و بدین ترتیب روند پاسخ به دارو مورد بررسی قرار می گرفت. تمام بیماران مطالعه حاضر بطور کامل درمان شدند.

نتایج PCR ناحیه NS5A ژنوتایپ 1b

cDNA سازی ناحیه NS5A ژنوتایپ 1b توسط کیت

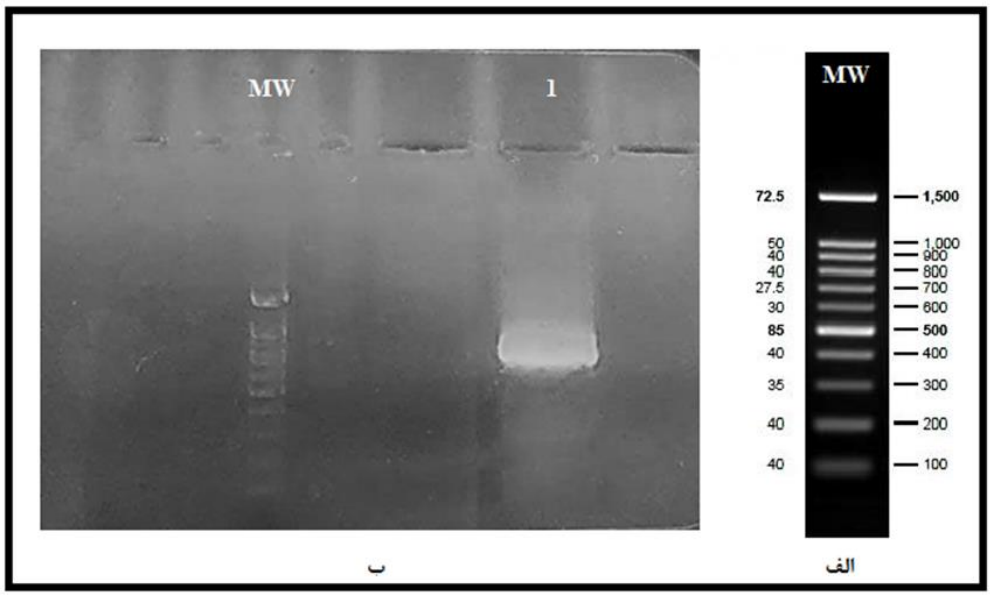
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

cDNA Synthesis Kit شرکت یکتا تجهیز آزما صورت گرفت. واکنش PCR ناحیه NS5A ژنوتیپ 1b توسط کیت تاکارا انجام شد و باند ۷۳۷ جفت بازی در ژل آگارز تایید شد که در شکل ۱ قابل مشاهده می باشد. سپس تخلیص محصول PCR از روی ژل آگاروز و توسط کیت تخلیص (GEL/PCR Purification Mini Kit) صورت گرفت.

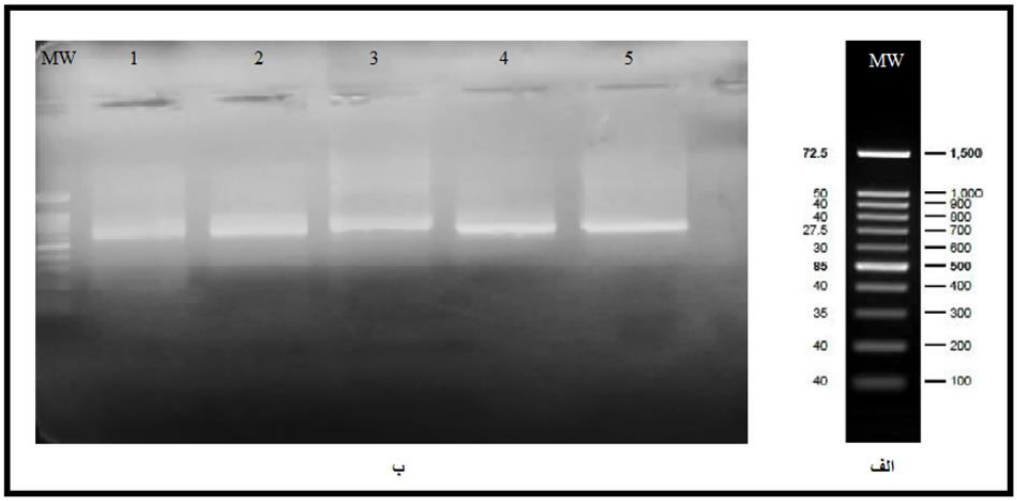
نتایج PCR ناحیه NS5B1 و NS5B2 ژنوتایپ 1b

cDNA سازی ناحیه NS5B1 و NS5B2 ژنوتایپ 1b توسط کیت Prime script one step RT-PCR Kitver2 صورت گرفت. واکنش PCR ناحیه NS5B1 و NS5B2 ژنوتایپ 1b توسط کیت تاکارا انجام شد و تخلیص محصول PCR مرحله دوم از روی ژل آگاروز مانند ناحیه NS5A انجام شد. در شکل ۲ باند (bp) ۶۱۲ مربوط به محصول نهایی ناحیه NS5B1 و در شکل ۳ (bp) ۸۰۵ مربوط به محصول نهایی ناحیه NS5B2 ژنوتایپ 1b می باشد مشخص شده است.

نتایج تعیین توالی ناحیه NS5A در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن نشان داد که جهش‌های مقاوم به

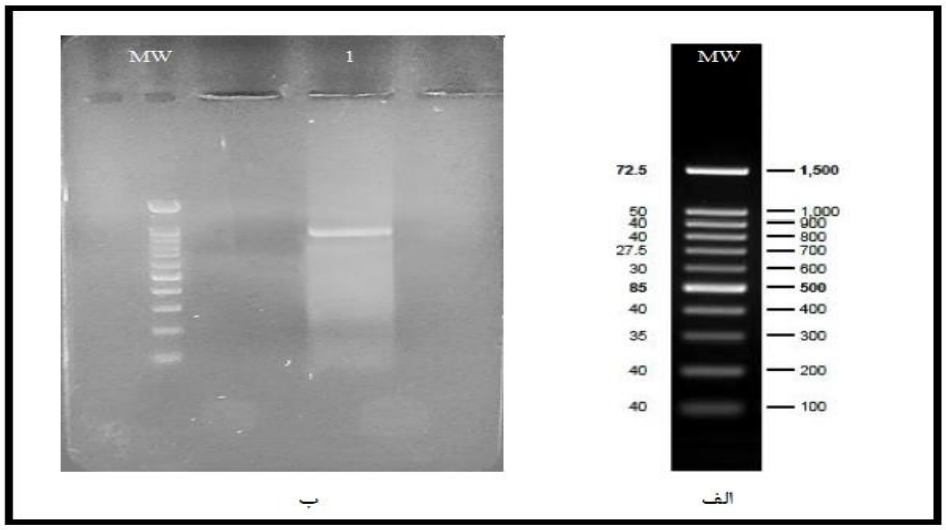


شکل ۱- نتایج حاصل از PCR: الف) MW شاخص وزن مولکولی. ب) ستون ۱ محصول PCR ناحیه NS5A پرایمر اختصاصی کیت تاکارا که باند ۷۳۷bp را نشان می‌دهد.



شکل ۲- نتایج حاصل از PCR: الف) MW شاخص وزن مولکولی. ب) ستون ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ محصول PCR ناحیه NS5B1 با پرایمر داخلی که هر ۵ نمونه باند bp ۶۱۲ را نشان می‌دهند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]



شکل ۳- نتایج حاصل از PCR: الف) MW شاخص وزن مولکولی. ب) ستون ۱ محصول PCR ژن NS5B2 با پرایمر داخلی کـه بانـد ۸۰۵bp را نشـان می دهند.

جدول ٦- نوع جهش های رخ داده در ناحیه NS5A ژنوتایپ 1b بر حسب موقعیت و نوع اسید آمینه

	L28A	L31 I/M/V	P58D	Y93H/N
۱۰۲۱۲	A		D	H
۱۰۴۷۰		I		N
۱۲۰۱۸		M	D	H
۱۲۲۱۸	A			H
۱۲۲۴۵		V		H

داروهای داکلاتاسویر و لدیپاسویر در مجموع در ۵ بیمار (۱۷/۲۴٪) شامل ۳ بیمار از ۱۶ بیمار مرد و ۲ بیمـار از ۱۳ بیمار زن شناسایی شد. در این ۵ بیمار جهش های L28A، L 31 I/M/V ، P 58D و Y93H/N شناسـایی شدند. جهش های ۹۳ و ۳۱ نسبت به سـایر جهـش هـا بیشتر(بترتیب ۱۷/۲۴٪ و ۱۰/۳۴٪) و جهش های ۲۸ و ۵۸ درمقایسه با سـایر جهـش‌هـا کمتـر شناسـایی شـد بطوریکه هر کدام از این جهـش‌هـا در ۲ بیمـار (۶/۹٪) شناسایی شدند.همزمانی جهشها در ناحیه NS5A درهر ۵ بیمـار (۱۷/۲۴٪) شناسـایی شـد و در ۲ بیمـار نیـز (۶/۹٪) هـمزمـانی ۳ جهـش (L28A+P58D+Y93H,L31M+P58D+Y93H) شناسـایی گردیـد. بـا آنـالیز آمـاری Chi Square Test (x^2) بـین جـنس و جهـش ارتبـاط معنـا داری مشـاهده نشـد. (P>0.05).

بحث

درمان بیماری هپاتیت سی در سال‌های اخیر با توجـه به معرفی داروهای ضد ویروسی مستقیم (DAA ها) به طور قابل توجهی تغییر کرده است. DAA ها می توانند پاسخ ویروسی بالقوه را نسبت به اینترفرون پگیلـه شـده (Peg-IFN) با ریباویرین (PR) بهبود بخشند (۴، ۵).

داروهای ضد ویروسی نسل جدید با اثـر مسـتقیم بـر مهار ژنهای ویروسی نتایج امیـدوار کننـده‌ای در درمـان بیماری هپاتیت سی داشـته انـد از آن جملـه داروهـای داکلاتاسویر و لدیپاسویر با اثر مستقیم بر روی پـروتئین NS5A بر همانند سازی ژنوم ویرس اثر مهاری دارنـد . هرچند بروز جهش های مقاوم به این داروها در ویـروس شناسایی شده است اما هنوز ایـن ۲ دارو در اکثـر رژیـم های درمانی استفاده می‌شوند (۶، ۷). در سـالهای اخیـر داروی سوفوسبوویر با اثر بر روی آنزیم پلیمراز ویروسـی کـه محصـول ناحیـه NS5B ویـروس اسـت بـا تحـول چشمگیری در درمان بیمـاران و همچنـین نـادر بـودن موارد جهش مقاوم نسبت به این دارو همراه بوده است و همـین امـر اسـتفاده از ایـن دارو را در کنـار داروهـای دیگری نظیر داکلاتاسویر و لدیپاسویر موجب شده است

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

(۷-۱۰). در کشور ما ژنوتایپهای 1a,3a و 1b به ترتیب ژنوتایپهای شایع ویروس هپاتیت سی میباشند (۵) و به همین دلیل، مطالعه بر روی بیماران مبتلا به هپاتیت سی با ژنوتایپ 1b با شیوع بسیار پایین این ژنوتایپ با محدودیت‌های فراوان در بیمار یابی همراه است.

در بیشتر کشورها نتایج پاسخ به درمان در موارد استفاده از سوفوسبوویر حتی در ژنوتایپ 1b به میزان بالای ۹۷درصد همراه بوده است (۶، ۷، ۱۱). در این بررسی میزان بروز جهش های مقاوم به داروهای داکلاتاسویر و لدیپاسویر در ناحیه NS5A ۱۷/۲۴ درصد (در ۵ بیمار از ۲۹ بیمار) شناسایی شد که با مطالعات انجام شده توسط سایر محققین هماهنگی دارد (۷، ۱۱، ۱۲). همچنین ، با آنالیز آماری Chi Square Test (x^2) بین جنس و جهش ارتباط معنا داری مشاهده نشد ($P>0.05$). هرچند میزان فراوانی و شناسایی این جهشها بر حسب جمعیت مورد مطالعه متغیر است. بطور مثال در مطالعه ای در غرب چین بر روی ۶۶ بیمار جهشهای مقاوم در ناحیه NS5A بمیزان ۴۲/۴۲ درصد شناسایی شده است (۱۳).

فراوانی جهش L31M و Y93Hدر بیشتر مطالعات بین ۴ تا ۸ درصد گزارش شده است (۹، ۱۴، ۷، ۱۳). در این بررسی این جهش به میزان ۳/۴ درصد (۱/۲۹ بیمار) و ۱۷/۲۴درصد (۵/۲۹ بیمار) شناسایی شد. هرچند فراوانی جهش L31M,I نسبت به جهش L31V بیشتر گزارش شده است (۷، ۱۱، ۱۴) اما در مطالعه حاضر فراوانی این جهشها یکسان بود (۱/۲۹). همچنین در مطالعات ، میزان جهشهای مقاوم به داروی لدیپاسویر نسبت به داکلاتاسویر در ژنوتایپ 1b بیشتر گزارش شده است (۶،۸،۹،۱۲). در این مطالعه جهش L28A (در برابر لدیپاسویر) و همچنین P58D نیز که جزو جهشهای مقاومت دربرابر لدیپاسویر است در ۲ بیمار شناسایی شد (۱۰، ۱۲، ۱۴). جهش در موقعیت ۹۳ (Y93H/N) از جهش های با ضریب تاثیر بالا در مقاومت ویروس نسبت به ۲ داروی مزبور است که در این مطالعه در ۵ بیمار شناسایی شد , (Y93H=4 Y93N= 1) (۸، ۱۱، ۱۵). هرچند که در مطالعات، همراهی جهش‌ها در موقعیتهای L31M و Y93H با بروز بیشتر مقاومت دارویی همراه بوده است (۴،۵،۱۲)، این همراهی در مطالعه حاضر تنها در ۱ بیمار شناسایی شد اما چنین مقایسه ای در این مطالعه بدلیل استفاده همزمان از سوفوسبوویر و عدم بروز جهشهای مقاوم به آن در بیماران امکانپذیر نبود. نتایج درمان با سوفوسبوویر در ژنوتایپ 1b که از سخت ترین ژنوتایپهای ویروس هپاتیت سی در پاسخ به درمان است، نتایج بسیار خو ب و امیدوار کننده ای بود و علیرغم شناسای جهش های مقاوم به داروهای داکلاتاسویر و لدیپاسویر، همه بیماران مورد بررسی پاسخ به درمان داشتند و با پیگیری یکسال پس از پایان درمان نیز موردی از بازگشت بیماری و یا عفونت مجدد با ژنوتایپ دیگر این ویروس در درمان شدگان این بررسی، گزارش نشده است. در مجموع هرچند استفاده از سوفوسبوویردر سالهای اخیر با نتایج درمانی بسیار امید بخشی همراه بوده است (۸، ۱۱، ۱۳، ۱۶). اما همچنان پایش موارد هپاتیت سی به ویژه در بیمارانی که در اثر عفونت با این ویروس به آسیب های کبدی نظیر سرطان کبد، فیبروز و یا سیروز مبتلا شده اند تا دستیابی به حذف هپاتیت سی ضروری خواهد بود.

نتیجه‌گیری

داروی سوفوسبوویر در درمان قطعی بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتایپ 1b که سخت ترین ژنوتایپ ویروسی در پاسخ به درمان است کاملا موثر بوده و در این بررسی جهش مقاوم به این دارو در هیچکدام از بیماران شناسایی نشد. با توجه به تولید موفقیت آمیز داروهای مستقیم الاثر ضد هپاتیت سی از جمله سوفوسبوویر در کشور که منجر به کاهش چشمگیر هزینه های درمانی شده است، شناسایی بیماران مبتلا به هپاتیت سی و درمان آنها راهگشای دستیابی به حذف این ویروس و بیماری ناشی از آن تا سال ۱۴۱۰ در کشور خواهد بود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تمام همکاران بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]

References

1. Sefidi FJ, Keyvani H, Monavari SH, Alavian SM, Fakhim Sh, Bokharaei-Salim F. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Iranian chronic infected patients. Hepatitis Month. 2013;13(1).
2. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice ChM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology. 2014;59(1):318-327.
3. Alaviyan SM. Rahnamaye jamee hepatite C baraye omoom. Pezeshkan salamat pajoohan kosar. 2015. (Persian).
4. Liver EA. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. J Hepatol. 2018;69(2):461-511.
5. Sefidi F, Salehi Vaziri M, Sadeghi F, Hashemi A. Hepatit C az roykarde molcouli. Hayyan. 2016. (Persian).
6. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. N Eng J Med. 2014;370(20):1889-1898.
7. Li Z, Chen ZW, Li H, Ren H, Hu P. Prevalence of hepatitis C virus-resistant association substitutions to direct-acting antiviral agents in treatment-naïve hepatitis C genotype 1b-infected patients in western China. Infect Drug Resist. 2017;10:377.
8. Nakamoto S, Kanda T, Wu Sh, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. World J Gastroenterol. 2014;20(11):2902.
9. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology (Baltimore, Md.). 2011;54(4):1433.
10. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Rajender Reddy K, Hassanein T, Jacobson I, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. N Eng J Med. 2014;370(3):211-221.
11. Maddali MM, Mathew M, Chandwani J, Alsajwani MJ, Sundar Ganguly Sh. Outcomes after rigid bronchoscopy in children with suspected or confirmed foreign body aspiration: a retrospective study. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2011;25(6):1005-1008.
12. Suwanthawornkul T, Anothaisintawee T, Sobhonslidsuk A, Thakkinstian A, Teerawattananon Y. Efficacy of second generation direct-acting antiviral agents for treatment naïve hepatitis C genotype 1 :a systematic review and network meta-analysis. PloS One. 2015;10(12):e0145953.
13. Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. J Infect Dis. 2013;207(Suppl-1):S33-S39.
14. Zhang Y, Cao Y, Zhang R, Zhang 1, Haiying Lu X, Wu Ch, et al. Pre-existing HCV variants resistant to DAAs and their sensitivity to PegIFN/RBV in Chinese HCV genotype 1b patients. PLoS One. 2016;11(11):e0165658.
15. https://www.hepatitisc.uw.edu/go/evaluation-treatment/treatment-goals-predicting-response/coreconcept/all., Goals and Benefits with HCV Treatment. 2019.
16. Thomas DL. Predicting the response to the treatment of hepatitis C virus infection. Clin Liver Dis. 2012;1(2):46.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-25]