Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.1, Apr 2016
Pages: 83-92

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۵
صفحه: ۹۲-۸۳

بررسی شیوع و تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت دلتا در بیماران HBs Ag مثبت مراجعه‌کننده به کلینیک تخصصی بعثت کرمان طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱

خه‌بات برخورداری [۱]، محمدجواد زاهدی [۲]، علیرضا پوینده‌روان [۳]، حمید ملایی [۴]، سید علی‌محمد عرب‌زاده [۵*]

خلاصه

مقدمه: عامل هپاتیت دلتا، ویروسی با میانگین قطر ۳۵ نانومتر است که جهت تکثیر و تجمع به آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B وابسته است. عفونت با عامل دلتا می‌تواند هم‌زمان با عفونت ویروس هپاتیت B رخ دهد. در این‌صورت معمولاً سبب هپاتیت حاد می‌گردد و یا به شکل عفونت ثانویه در بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت B بروز می‌نماید. ویروس هپاتیت دلتا دارای ژنوتیپ‌های مختلفی بر اساس آنالیز توالی ژنوم است که تظاهرات بالینی و گستره جغرافیایی متنوعی را از خود نشان می‌دهند. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع و ژنوتیپ ویروس هپاتیت دلتا در بیماران HBsAg مثبت است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع بررسی مقطعی و توصیفی بوده و بر روی ۴۰۰ نفر بیمار HBsAg مثبت انجام پذیرفت. تعیین ژنوتایپ با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز وهضم آنزیمی با روشRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) انجام شد. در آخر نیز تعیین سکانس نمونه‌ها برای تائیدنتایج حاصل ازRFLP انجام شد.

نتایج: از بین ۴۰۰ بیماری که در این تحقیق بررسی شد، ۶۷ مورد(۱۶/۷۵٪) دارای آنتی‌بادی برضد HDV بودند که از میان آنها ۷ مورد(۱/۷۵٪) HDV RNA در نمونه سرمی تشخیص داده شد. با بررسی توالی‌ها توسط آنزیم‌های برشی و آنالیز سکانس این ۷ نمونه، ژنوتایپ همه از نوع I تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: آنالیز سکانس ناحیه C-ترمینال ویروس هپاتیت دلتا و مقایسه آن با ایزوله‌های سایر کشورها، نشان از یکسان بودن ژنوتایپ ویروس با کشورهای همجواری چون ترکیه، مصر، اردن و پاکستان دارد.احتمالا این یافته‌ها می‌تواند حاکی از منشأ یکسان ویروس دلتا در منطقه خاورمیانه داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس هپاتیت دلتا، آنتی‌ژن هپاتیت دلتا، ژنوتایپینگ

۱،۴- کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲-دانشیار، گروه بیماری‌های داخلی، بیمارستان افضلی‌پور، بخش بیماری‌های گوارشی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳-کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۵-دکترا، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن:۰۹۱۳۱۴۰۴۵۱۴، پست الکترونیکی: a_arabzadeh@kmu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

ویروس هپاتیت دلتا(Hepatitis D Virus)HDV، ویروسی ناقص است که برای تجمع و عفونت، به آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B وابسته است(۱). این ویروس برای نخستین بار به‌عنوان آنتی‌ژنی به اسم "آنتی‌ژن دلتا" (Delta Antigen) در نمونه‌های بیوپسی کبد بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن شناسایی شد. منبع این آنتی‌ژن بعدها در سال ۱۹۸۰، ویروسی ناقص و وابسته به ویروس هپاتیتB، تشخیص داده شد(۲). ویروس هپاتیت دلتا که در میان ویروس‌های جانوری منحصر به‌فرد است، دارای RNA تک‌رشته‌ای حلقوی با سنس منفی، شبیه به پاتوژن‌های گیاهی مانند ویروئید می‌باشد که دارای میانگین ۳۵nm قطر و حدود ۱/۷کیلوباز طول ژنوم است(۳). HDVبر اساس آنالیز سکانس ژنوم، ابتدا در سه کلاس طبقه‌بندی شد. اما امروزه به هشت دسته (Clade) تقسیم می‌شود که سه ژنوتایپ آن دارای گستره جغرافیایی و بیماری‌زایی بیشتری است(۴). ژنوتایپ II، حدود ۷۷ درصد با ژنوتایپ I تشابه دارد وبه دو تایپ IIa و IIb تقسیم شده است. ژنوتایپ III حدود ۶۵-۶۰ درصد با ژنوتایپ I و II دارای همولوژی است(۵). ژنوتایپ I در ایزوله‌های نقاط مختلف دنیا جدا شده و توزیع جغرافیایی گسترده‌ای دارد(۶). ژنوتایپII مربوط به ایزوله‌های جدا شده از کشورهای آسیای شرقی(ژاپن و تایوان) است (۷) و ژنوتایپ III مربوط به مناطق شمالی آمریکای جنوبی است(۸). ژنوتایپ‌های مختلف HDV ، تظاهرات بالینی و پاتوژنز متنوعی را از خود نشان می‌دهند(۱۱-۹). ژنوتایپ I عامل طیف گسترده‌ای از بیماری‌های هپاتیت از ملایم تا شدید می‌باشد که هپاتیت حاد و اغلب سیروز(Liver Cirrhosis یا LC) و کارسینومای هپاتوسلولار(hepato cellular carcinoma یا HCC) ایجاد می‌کند(۱۱). از طرف دیگر ژنوتایپ II دارای بیماری‌زایی و تظاهرات قابل مشاهده‌تری نسبت به ژنوتایپI است. واریته IIa عامل هپاتیت شدید قابل مقایسه با ژنوتایپ I می‌باشد(۱۰). این یافته‌ها مبین آن است که ساختار ژنتیکی HDV می‌تواند تأثیر بسزایی بر پاتوزنز و آسیب کبدی در عفونت HDV داشته باشد (۱۲). با روش‌هایی چون هیبردیزاسیون و تعیین سکانس مستقیم با آنالیز محصول RT-PCR توسط روش(RFLP(restriction fragment length polymorphism، می‌توان ژنوتایپ ویروس هپاتیت دلتا را تعیین کرد. هدف از تعیین ژنوتایپ و سایر آنالیزهای ژنتیکی، یافتن مسیر کوتاهی برای درمان عفونت HDVاست(۱۲).

درمان عفونت HDV بسیار مشکل است. اگرچه با اینترفرون ممکن است تغییراتی درروند بیماری در بعضی از مبتلایان حاصل شود، ولی پاسخ ویروسی پایین بوده و عود عفونت شایع است(۱۳). تحقیقات بر روی مارکرهای سرولوژیکی عفونت HDV در جمعیت اهداکنندگان خون در کشورهای ژاپن، تایوان، یونان و ایتالیا نشان داد که طیف عوارض هپاتیت دلتا بسیار گسترده و غیریکنواخت است. این امر مشابه عفونت با سایر ویروس‌های شناخته شده هپاتیت است که می‌توانند از علائم خیلی ملایم، عفونت مخفی کلینیکی، تا هپاتیت حاد فعال و سیروز غیرقابل برگشت را ایجاد کنند. مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که شیوع عفونت هپاتیت D در بین ناقلین هپاتیت B حدود ۵٪ در سراسر دنیا است(۱۴). برای مثال در ایتالیا بررسی‌های متوالی ناقلین HBs-Ag با بیماری کبدی نشان داد که ۲۴/۶٪ در سال ۱۹۸۳، ۲۳٪ در سال ۱۹۸۷، ۱۴٪ در سال ۱۹۹۲، و ۸/۳٪ در سال ۱۹۹۷ دارای anti-HD بودند(۱۵). مطالعه‌ای دیگر در این کشور شیوع HDV را در سال ۲۰۰۷، ۱۱٪ نشان داده است(۱۴). مطالعات قبلی که در ایران انجام گرفته، نشان می‌دهد که ۲۰/۷٪-۲/۲٪ از بیماران مبتلا به HBV به‌طور همزمان به عفونت HDV ابتلا داشته‌اند(۱۶). با واکسیناسیون و کنترل HBV، ممکن است تغییراتی در فراوانی ویروسHDV در بیماران HBsAg مثبت ایجاد شده باشد.

با توجه به تمامی موارد ذکر شده مبنی بر تنوع در تظاهرات بالینی بیماری و نیز تفاوت در پاسخ به درمان در مبتلایان به HDV بر اساس ژنوتایپ این عامل عفونی، لذا بر آن شدیم طی مطالعه کنونی در ابتدا شدت و شیوع بیماری را در سطح یکی از کلنیک‌های مهم استان کرمان که تعداد بالایی از بیماران در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

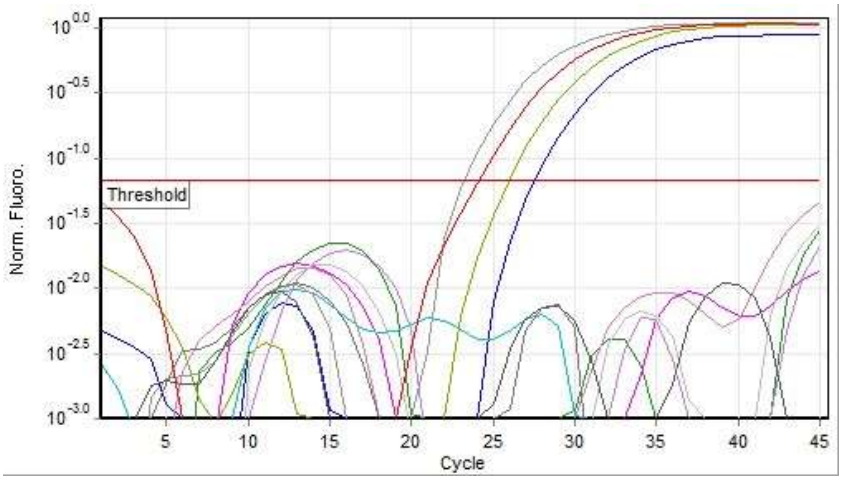
سال به آنجا مراجعه می‌نمایند برآورد نماییم. در درجه بعدی نوع ژنوتایپ بیماران نیز مشخص شد. بر اساس این یافته‌ها می‌توان منشاء احتمالی آلودگی در این استان را مشخص نموده و با اتخاذ سیاست‌های مناسب مانع گسترش بیماری شد. با تعیین ژنوتایپ غالبHDV در این استان نیز می‌توان به متخصصین امر در جهت انتخاب راهکارهای مناسب درمانی کمک شایانی نمود.

روش بررسی

جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها: پژوهش انجام شده از نوع بررسی مقطعی است. با توجه به میانگین شیوع ۱۰ درصدی هپاتیت D در سایر مطالعات، حجم نمونه با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه شد و تعداد ۲۲۵ بیمار بدست آمد، لکن جهت بالا بردن توان علمی مطالعه، تعداد آن را به ۴۰۰ بیمار افزایش دادیم. بیماران مورد مطالعه افراد مبتلا به هپاتیت B مراجعه‌کننده به کلینیک تخصصی بعثت کرمان در سال‌های ۹۱ و ۹۲ می‌باشند که توسط پزشک متخصص گوارش و کبد بعنوان همکار مطالعه کنونی، معرفی گردیدند. از بیماران مذکور مصاحبه به عمل آمد و ریسک فاکتورهای بیماران تحت عنوان فرمی، ثبت شد. پس از اخذ رضایت‌نامه، نمونه‌گیری از خون محیطی آنها انجام شد. جمع‌آوری نمونه‌ها از اول پاییز ۹۱ تا پایان اردیبهشت ۹۲ به طول انجامید. تمامی آزمایش‌ها در کلینیک بعثت کرمان و گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی انجام گردید. به میزان ۵ میلی‌لیتر خون کامل بیمار در لوله‌های استریل Venoject حاوی ماده ضدانعقاد EDTA اخذ شد. سپس برای جداسازی پلاسما، لوله‌های خون به مدت ۵ دقیقه در دور Rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. پلاسمای حاصل در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و در دمای منفی هفتاد درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری گردید.

ابتدا روی نمونه پلاسمای بیماران آزمایش anti-HIV Ab و anti-HCV Ab با روش الیزا و با استفاده از کیت کیاژن ساخت آلمان انجام شد و در صورت منفی بودن نتیجه آزمایش از نظر این آنتی‌بادی‌ها، آزمایشات بعدی به عمل آمد.

تعیین ابتلا به هپاتیت B و D: برای بررسی عفونت هپاتیت D و هپاتیت B، ابتدا به روش الیزا و با استفاده ازکیت شرکت کیاژن روی نمونه پلاسمای بیماران آزمایش‌هایHBs Ag، HBe Ag ، anti-HDV Ab انجام شد. برای ردیابی حضور ژنوم ویروس هپاتیت D در پلاسمای بیماران anti-HDV Ab مثبت، ابتدا RNA از این نمونه‌ها استخراج شد. برای اطمینان از نتایج صحیح حاصل از آزمایش الایزا، تست Real-timePCR بر روی نمونه‌های مثبت حاصل از الایزا انجام شده و نتایج مثبت آن طبق شکل ۱تفسیر گردید.



شکل ۱ : خطوطی که از حد آستانه بالاتر رفته‌اند، مثبت در نظر گرفته شده‌اند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

در مرحله بعد با استفاده از کیت شرکت کیاژن cDNA(Complementary DNA) نمونه‌های استخراج شده‌ای که نتایج آنها در آزمایش qPCR مثبت شده بود، سنتز شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه C ترمینال HDAg این ویروس با روش RT-nested PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. در این روش ابتدا از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر توالی ناحیه C ترمینال HDAg استفاده شد. نتایج مرحله اول، بعد از تائید با روش الکتروفورز، برای مرحله دوم PCR آماده شدند. در مرحله دوم، از پرایمرهای داخلی‌تر برای تکثیر ناحیه C ترمینال HDAg، استفاده شد.پرایمرهای مورد استفاده در مرحله اول و دوم PCR به شرح جدول ۱ است.

جدول ۱ : پرایمرهای مربوط به دور اول و دوم PCR

مرحله	نام	نوع پرایمر	پرایمر ها سکانس
مرحله اولPCR	D120	سنس	5'-ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA-3'
	DH1	آنتی سنس	5'-GGCCTCTCAGGGGAGGATTCAC-3'
مرحله دومPCR	D120	سنس	5'-ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA-3'
	D118	آنتی سنس	5'-CTCAGGGGAGGATTCACCGACA-3'

بعد از تائید نتایج PCR مرحله دوم توسط الکتروفورز، نمونه بیمارانی که از نظر HDV-RNA پلاسمایی مثبت بوده‌اند و توالی آنها در دو مرحله PCR تکثیر شد، برای تعیین نوع ژنوتیپ ویروس هپاتیت D با استفاده از روش RFLP ژنوتیپ شدند. برای برش توالی‌ها، از آنزیم‌های برش‌دهنده مندرج در جداول ۲ و ۳ استفاده شد.

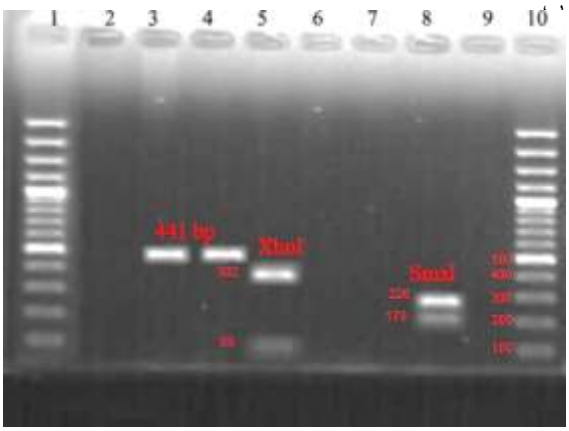
جدول ۲: الگوی برش آنزیم SmaI روی قطعه کد کننده HD Ag

نمونه	اندازه قطعات بعداز برش با آنزیم SmaI
ژنوتیپ I	۱۷۹,۲۲۶
ژنوتیپ II	۴۰۵
ژنوتیپ III	۳۰۱,۱۰۴
نمونه کرمان	۲۲۶,۱۷۹

جدول ۳ : الگوی برش آنزیم xhoI روی قطعه کد کننده HD Ag

نمونه	اندازه قطعات بعداز برش با آنزیم xhoI
ژنوتیپ I	۳۸۲,۵۹
ژنوتیپ II	۱۵۹,۸۱,۳۰
ژنوتیپ III	۳۵۸,۸۳
نمونه کرمان	۳۸۲,۵۹

نمونه‌ها پس از برش با آنزیم‌های محدودکننده، وارد ژل الکتروفورز شده و با توجه به شکل ۲، نتایج آنها تفسیر شد.



شکل ۲: باند(bp) ۴۴۱ مربوط به محصول PCR دوم، آنزیم Sma I توالی را در(bp)۲۲۶,۱۷۹و آنزیم Xho I توالی را در(bp)۳۸۲,۵۹ برش داد.

برای تائید نوع ژنوتیپ ویروس هپاتیت D تعیین‌شده با RFLP، محصول مرحله دوم PCR، تعیین توالی گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: بدین منظور از نرم‌افزار آماری SPSS و برای آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی، از نرم‌افزارهای Bio Edit و MEGA 5 استفاده شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج

از بین ۴۰۰ بیمار HBV با جواب مثبتی که در کرمان مورد بررسی قرار گرفته شد، جمعیت مردان(۶۰/۵ درصد، ۲۴۲نفر) به طور مشخصی از زنان(۳۹/۵درصد، ۱۵۸نفر) بیشتر بود. کمترین سن ابتلا ۱۲ سال و بیشترین سن ۷۲ سال با میانگین سنی ۳۸ سال است. ۶۷ مورد(۱۶/۷۵درصد) از بیماران دارای آنتی‌بادی برضد HDV در سرم بودند که از میان این تعداد، HDV-RNA در نمونه سرمی ۷ مورد از بیماران با تکنیکReal-time PCR تشخیص داده شد. بعد از بررسی، هر ۷ مورد دارای محل برش برای آنزیم‌هایSma I و Xho I بودند که ژنوتایپ آنها تیپI تشخیص داده شد.در بررسی سکانس این ۷ نمونه، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Genbank-NCBI و Ref-seq NCBI، ژنوتایپ هر ۷ مورد تائید و از نوع I تشخیص داده شد.

مطالعه ریسک فاکتورهای مختلف، یک ارتباط معنی‌داری را بین سابقه جراحی دندان، سابقه ابتلا به هپاتیت B در خانواده، سابقه عمل جراحی و تماس با بیمارن مبتلا به عفونت HDV نشان داد.

بحث

گزارش حاضر، از معدود مطالعاتی است که در مقیاس گسترده، برای تعیین ژنوتایپ و شیوع HDV در منطقه کرمان انجام پذیرفته و نتایج آن با سایر مناطق کشور، مقایسه شده است. گزارش‌های متفاوتی از عفونت همزمانHDV در میان بیماران آلوده به HBV، در ایران گزارش شده است. بر اساس مطالعات اختلاف شیوع این عفونت از صفر درصد در شمال ایران(مازندران) تا ۱۷/۳ درصد در غرب ایران(همدان) است(۱۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۴۰۰ بیمار HBsAg مثبت در شهر کرمان، ۶۷ نفر(۱۶/۷۵ درصد) دارای آنتی‌بادی ضد HDV بودند. این نتیجه، مقدار بسیار بالاتر از شیوع کلی ۶/۶٪ برای ایران، را نشان می‌دهد(۱۸). با این حال شیوع حاصله در مطالعه کنونی کمتر از مناطقی مانند همدان است. احتمالاً میزان شیوع بالای این عفونت در استان کرمان نسبت به کل ایران را می‌توان با پدیده مهاجرت اتباع خارجی از کشورهای افغانستان و پاکستان به این استان مرتبط دانست. از آنجا که شیوع HDV در کشورهای همسایه پاکستان و افغانستان به ترتیب ۳۷٪ و ۲۸/۶٪ است(۱۹،۲۰) و از سوی دیگر استان کرمان به‌عنوان محلی برای تردد و اقامت اتباع کشورهای یاد شده است، لذا ترکیب جمعیتی مهاجران با جمعیت بومی استان می‌تواند توجیه منطقی برای شیوع بالای ابتلا به عفونت HDV در این استان باشد. مطالعاتی که در آسیای میانه انجام شده است، بیانگراین مطلب هستند که شیوع HDV در افراد مبتلا به HBV بالاتر از میزان گزارش داده شده در کشورهای اتحادیه اروپا می‌باشد. برای مثال این شیوع در ترکیه ۲۷٪ و در مصر۳۰٪ درصد است. در حالی‌که شیوع در اسپانیا، انگلستان و آلمان به ترتیب ۴/۹، ۷/۱، ۱۰/۵٪ گزارش شده است(۲۱).

HDVچالشی مهم برای سلامت عمومی در جهان به‌ویژه مناطق اندمیک، از جمله ایران است. در راستای تعیین شیوع و ژنوتایپ هپاتیت D در کرمان و به‌منظور تکمیل مطالعات صورت گرفته، مطالعه حاضر انجام شد. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۳۸ سال بود. در مطالعه کنونی ۶۴/۹٪ از بیماران HDV مثبت را مردان و ۳۵/۱٪ را زنان تشکیل می‌دادند که با توزیع جنسی در کشورهایی از قبیل رومانی(۲۲) و عراق(۲۳) مشابه است. البته مطالعه دیگری نشان داده است که فراوانی HDV مثبت در مردان و زنان تفاوتی نداشته است(۲۴). در این مطالعه نتایج حاصله، شیوع سرولوژیکی ۱۶/۷۵٪ HDV را در میان بیماران آلوده با HBV مراجعه‌کننده به کلینیک تخصصی بعثت کرمان نشان می‌دهد. این میزان در سایر مطالعات انجام گرفته در ایران، به میزان تقریباً مشابهی شامل ۱۳/۹٪ و ۹/۷٪به ترتیب در سال‌های ۱۹۸۹(۲۵) و۲۰۱۱ در شیراز(۲۶)، ۹/۳٪ در مطالعه چند مرکز به‌صورت همزمان در تبریز و تهران، سال ۲۰۰۹(۳) و ۱۷/۳٪ در همدان، سال ۲۰۱۰(۲۷)گزارش شده است. در بعضی مطالعات نتایج نسبتاً متفاوت شامل شیوع

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

۲/۵٪ در تهران، سال ۱۹۹۰(۲۵)، ۲/۴٪ در همدان، سال ۱۹۹۳(۲۸) و ۲٪ در بابل، سال ۲۰۰۲(۲۹)، ۶/۱۵٪ در تبریز، در سال ۲۰۰۳(۳۰)، ۵/۷٪ در تهران، سال ۲۰۰۵(۳۱) و ۵/۸٪ در گلستان، سال ۲۰۰۷(۳۲) گزارش شده است. با این تفاسیر نمی‌توان برطبق مطالعات موجود میزان شیوع HDV را در ایران به‌طور دقیق بیان کرد. نتایج حاصل از مطالعه ریسک فاکتورهای ابتلا به HBV و HDV نشان داد که ۶۴/۴٪ از بیماران دارای سابقه جراحی دندان، ۴۵/۵٪ دارای سابقه ابتلا به HBV در خانواده، ۴۳/۴٪ دارای سابقه عمل جراحی، ۲۷/۳٪ دارای ارتباط پرخطر با بیمار مبتلا به HBV، ۲۱/۲٪ دارای سابقه سوراخ کردن گوش و تنها ۲٪ از آنها نیز دارای سابقه مصرف مواد مخدر تزریقی بوده‌اند. این نتایج تقریباً مشابه مطالعات دیگر در سایر استان‌ها است و تنها اختلاف بین نتایج مطالعه ریسک فاکتورها در این مطالعه و سایر مطالعات، پایین بودن درصد بیماران با سابقه مصرف مواد مخدر تزریقی در بین بیماران مطالعه حاضر است که می‌تواند در نتیجه دسترسی آسان‌تر به مواد مخدرغیر تزریقی، در این استان باشد(۱۸).

مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، منفی بودن HDV RNA در سرم بیماران دارای آنتی‌بادی برضد HDAg را به‌دلایل زیر نسبت داده‌اند: ۱) HDV IgG برای چندین سال بعد از عفونت خودمحدود شونده، ثابت باقی‌مانده است. ۲) سطح HDV RNA کمتر از حد آستانه تشخیص با Nested PCR بوده که می‌تواند به دلیل بار ویروس کمتر در سرم و یا میزان تکثیر پایین ویروس در موارد عفونت مزمن باشد(۳۳). در مقابل می‌توان مثبت شدن آنتی‌بادی ضد HD Ag در نمونه‌های فاقد HDV RNA را به دلیل واکنش متقاطع بین آنتی‌ژن‌های HBV وHDV، مثبت کاذب بودن نتایج و ضعف تکنیک‌های تشخیصی رایج دانست. یکی از ایرادات وارد به مطالعه حاضر، فاصله زمانی طولانی بین نمونه‌گیری و استخراج ژنوم می‌تواند باشد. ممکن است انجماد طولانی مدت باعث تخریب ویروس گشته و بنابراین باعث اختلاف بین نتایج ELISA و PCRشده باشد.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته می‌توان نتیجه گرفت که مطالعات قبلی و کنونی صورت گرفته بر روی ژنوتایپینگ ویروس هپاتیت D در ایران، نتایج مشابه با مطالعات انجام شده در سایر کشورهای همسایه از قبیل افغانستان(۱۹)، ترکیه(۱۲)، پاکستان(۲۰)، لبنان(۱۲) و مصر(۳۴)را نشان می‌دهد. جایی دسته I غالب است و این موضوع منشاء احتمالی یکسان عفونت HDV را در منطقه نشان می‌داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل تصویب و تأمین مالی مطالعه کنونی تقدیر و قدردانی به عمل می‌آورند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

References:

1- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. ***Hepatitis delta virus.*** The Lancet 2011; 378(9785): 73-85.

2- Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. ***Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees.*** J InfecDiseases 1980; 141(5): 590-602.

3- Rizzetto M. ***Hepatitis D: thirty years after.*** J hepato 2009; 50(5): 1043-50.

4- Shang D, Hughes SA, Horner M, Bruce MJ, Dong Y, Carey I, et al. ***Development and validation of an efficient in-house real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the quantitative detection of serum hepatitis delta virus RNA in a diverse South London population.*** J Viro methods 2012; 184(1): 55-62.

5- Hollinger FB. ***Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult.*** Transfusion 2008; 48(5): 1001-26.

6- Jayan GC, Casey JL. ***Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression.*** J Viro 2002; 76(23): 12399-404.

7- Chang MF, Baker SC, Soe LH, Kamahora T, Keck JG, Makino S, et al. ***Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity.*** J Virolo 1988; 62(7): 2403-10.

8- Altuğlu I, Özacar T, Sertoz RY, Erensoy S. ***Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey***. Inter J Infectious Dis 2007; 11(1): 58-62.

9- Casey JL, Bergmann KF, Brown TL, Gerin JL. ***Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing mechanism.*** Proceedings National Academy Sci 1992; 89(15): 7149-53.

10- Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, et al. ***Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia.*** J General Viro 2001; 82(11): 2709-18.

11- Wu JC, Chen TZ, Huo TI, Lee SD, Choo KB, Chen CM. ***Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D.*** The Lancet 1995; 346(8980): 939-41.

12- Altuğlu I, Özacar T, Sertoz RY, Erensoy S. ***Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey.*** Inter J Infec Diseases 2007; 11(1): 58-62.

13- Niro GA, Gioffreda D, Fontana R. ***Hepatitis delta virus infection: open issues.*** Digestive Liver Disease 2011; 43: S19-S24.

14- Sagnelli E, Stroffolini T, Ascione A, Bonino F, Chiaramonte M, Colombo M, et al. ***The epidemiology of hepatitis delta infection in Italy over the last 18 years.*** Progress Clinic Biological Res 199; 382: 287-94.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

15-Sagnelli E, Stroffolini T, Ascione A, Chiaramonte M, Craxì A, Giusti G, et al. ***Decrease in HDV endemicity in Italy.*** J Hepato 1997; 26(1): 20-4.

16- Bakhshipour A, Mashhadi M, Mohammadi M, Nezam SK. ***Seroprevalence and risk factors of hepatitis delta virus in chronic hepatitis B virus infection in Zahedan.*** Acta Med Iranica 2013; 51(4): 260-64.

17- SirusJedary S, MasoudSabouri G. ***A Study of HDV in HBsAg positive patients in Tabriz, northwestern Iran.*** Hepatitis Monthly 2010; 10(2): 110-15.

18- Motamedifar M, Taheri M, Lankarani KB, Gholami M. ***The Prevalence and Risk Factors of Hepatitis Delta Virus in HIV/HBV Co-Infected Patients in Shiraz, Iran, 2012.*** Iranian JMed Sci 2015; 40(5): 448-53. [Persian]

19- Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. ***Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I.*** Viro 1997; 234(1): 160-67.

20- Moatter T, Abbas Z, Shabir S, Jafri W. ***Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi.*** World J Gastroentero 2007; 13(18): 2604-07.

21- Niro GA, Smedile A, Ippolito AM, Ciancio A, Fontana R, Olivero A, et al. ***Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study.*** J hepato 2010; 53(5): 834-40.

22- Gheorghe L, Iacob S, Simionov I, Vãdan R, Gheorghe C, Iacob R, et al. ***Natural history of compensated viral B and D cirrhosis.*** Rom J Gastroenterol 2005; 14(4): 329-35.

23-Yurdaydin C. ***Delta hepatitis in Turkey: decreasing but not vanishing and still of concern.*** Turk J Gastroenterol 2006; 17(1): 74-5.

24- Somi MH, Farhang S, Miri SM, Pouri AA, Mjidi G, Alavian SM. ***The frequency of hepatitis D virus in patients with hepatitis B in Iran: an increasing rate?*** Tropical doctor 2009; 39(3): 154-56. [Persian]

25- Rezvan H, Taroyan S,Forouzandeh B, Fadaiee S, Azordegan F. ***A study on delta virus infection and its clinical impact in Iran.*** Infec 1990; 18(1): 26-8. [Persian]

26- Taghavi SA, Sedighi S, Mehrabani D, Khademolhosseini F. ***Hepatitis D in Chronic Active Hepatitis B: Prevalence, Liver Enzyme Levels and Histopathology-an Epidemiological Study in Shiraz, Southern Iran, 2003-2004.*** Hepatitis Mon 2008; 8(4): 248-51. [Persian]

27- Alizadeh AHM, Ranjbar M, Tehrani ASS, Keramat F, Mamani M, Rezazadeh M, et al. ***Seroprevalence of hepatitis D virus and its risk factors in the west of Iran.*** J Microbio Immuno Infec 2010; 43(6): 519-23. [Persian]

28- Amini S, Mahmoodi MF, Andalibi S, Solati AA. ***Seroepidemiology of hepatitis B, delta and human immunodeficiency virus infections in Hamadan province, Iran: a population based study.*** J tropic Med hygiene 1993; 96(5): 277-87. [Persian]

29- Hassanjani-Roshan MR, Taheri H. ***Frequency of chronic active hepatitis in asymptomatic HBV carriers in Babol, Iran.*** Arch Iranian Med 2002; 5(2): 90-100. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

30- Torabi SE, Ebrahimpoor S, Maljaei SH, Naghili B. ***Seroepidemiological studies of Hepatitis Delta (HDV) in HBsAg positive individuals in Tabriz.***J Urmia Uni Med Sci 2003. [Persian]

31- Alavian SM, Alavian SH. ***Hepatitis D virus infection; Iran, Middle East and Central Asia.*** Hepat Mon 2005; 5(4): 137-43. [Persian]

32- Roshandel G, Semnani S, Abdolahi N, Keshtkar A-A, Besharat S, Joshaghani H, et al. ***Prevalence of hepatitis D virus infection in HBsAg positive subjects in Iran.*** Pak J Biol Sci 2007; 10(10): 1751-54. [Persian]

33- Mirshafiee H, Mahmoodian-Shooshtari M, Sharifi Z, Hosseini S-M. ***Genotype analysis of hepatitis delta virus from hepatitis B surface antigen-positive patients using PCR-RFLP in Tehran, Iran.*** Archives Iranian Med 2009; 12(3): 238-43. [Persian]

34- Saudy N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Aal AA, Zaid MA, et al. ***Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and delta viruses in Egypt.*** J Med Viro 2003; 70(4): 529-36.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

Prevalence and Genotyping of Hepatitis D Virus among HBs Ag Positive Patients Referred to Besat Clinic, Kerman during 2012-2013

Khabat Barkhordari (MSc)[1], Mohammad Javad Zahedi (MD) [2]
Alireza Pouyandeh Ravan (MSc)[3], Hamid Molaie (MSc) [4], Seyed Ali Mohammad Arab-zadeh(PhD) [*5]

[1,4,5] *Department of Virology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.*
[2] *Department of Gastroenterology, Afzalipour Hospital, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.*
[3] *Department of Biochemistry, School of Para Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.*

Received: 2 Aug 2015 ***Accepted:*** 29 Oct 2015

Abstract

Introduction: Hepatitis D virus (HDV) is a 35 nm in diameter agent that depends on hepatitis B surface antigen in order to proliferate and accumulate. Infection with delta agent can occur spontaneously with hepatitis B virus infection and it cause acute hepatitis or develop as secondary infection in the patients with hepatitis B. Hepatitis D virus (HDV) has several genotypes based on genome sequence analysis, which shows a variety of clinical protests and geographical scope. The aim of this study was to determine the prevalence of hepatitis delta virus genotype in patients with positive HBs Ag.

Methods: This cross-sectional and descriptive study was performed on 400 HbsAg-positive patients. Genotype identification was performed using polymerase chain reaction and RT-nested PCR and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Finally sample sequencing was considered to approve RFLP gained results.

Results: Among 400 patients in this study, 67 participants (16.75 %) were containing anti-HDV antibody, and it was found HDV RNA in just 7 (1.75%) serum samples. By examining the sequences using analysis of these 7 positive HDV RNA samples by restriction enzyme and MEGA4 software showed that all of them have genotype I.

Conclusion: Sequence analysis of C-terminal region of Hepatitis D virus (HDV) and its comparison with other countries showed that it was the same genotype that present in countries such as Turkey, Egypt, Jordan and Pakistan. These finding indicated that there was the same origin of Hepatitis D virus (HDV) in Middle East.

Keywords:Genotyping Technique; Hepatitis Delta Virus; Hepatitis Delta Antigens

This paper should be cited as:
Khabat Barkhordari, Mohammad Javad Zahedi, Ali Reza Pouyandeh Ravan, Hamid Molaie, Seyed Ali Mohammad Arab-zadeh.***Prevalence and genotyping of hepatitis d virus among hbs ag positive patients referred to besat clinic, kerman during 2012-2013.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(1): 83-92.

****Corresponding author: Tel: 09131404514, email: a_arabzadeh@kmu.ac.ir***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]