

Application of Semi-nested PCR RFLP for Detection and Genotyping GBV-C among HBV-infected Patients

Laleh Yazdani¹, Mehrdad Ravanshad^{2*}, Zahra Khanlari³, Ramin Yaghoobi⁴

1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ravanshad@modares.ac.ir

Received: 01/Oct/2011, Accepted: 26/Dec/2011

Abstract

Objective: GBV-C is a virus transmissible via blood transfusion and sexual routes. Because of the shared transmission routes in GBV-C and hepatitis B virus (HBV) we have attempted to detect GBV-C in HBsAg-positive patients using the more sensitive semi-nested PCR. We used restriction fragment length polymorphism (RFLP) to determine genotype.

Methods: A total of 100 serum samples were collected from HBsAg-positive patients from 1389-1390. After designing specific primers and optimizing the semi-nested PCR, sequences of PCR products were analyzed by Neb Cutter software. Restriction enzyme sites were determined and suitable enzymes selected for RFLP.

Results: Semi-nested PCR shows acceptable sensitivity for the detection of GBV-C and its genotype determination. This technique is more affordable than other techniques.

Conclusion: There appears to be a high rate of GBV-C infection among Iranian HBV patients. In this study, the majority of patients co-infected with GBV-C were of HBV genotype 2, which is similar to the pattern seen in the US and Europe.

Keywords: GBV-C, HBs-Ag Positive, RFLP, Genotyping, Semi-Nested PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 81-91

به کارگیری روش Semi Nested-PCR-RFLP برای تشخیص و تعیین ژنوتیپ GB ویروس C در بین افراد آلوده به عفونت ویروس هپاتیت B

لاله یزدانی^۱، مهرداد روانشاد^{۲*}، زهرا خانلری^۳، رامین یعقوبی^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی
Email: ravanshad@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۰۶

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۰۹

چکیده

هدف: GB ویروس C جزء ویروس های منتقل شونده از راه خون، فرآورده های خونی و از طریق جنسی است و از آنجا که راه انتقال آن با ویروس های عامل هپاتیت مشترک است، طی این مطالعه ویروس را در بین افراد HBsAg مثبت با روش حساس تر Semi Nested-PCR جداسازی کرده و ژنوتیپ های ویروس با روش RFLP تعیین شد.
مواد و روش ها: در تحقیقی که به صورت مقطعی بین سال های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰، روی ۱۰۰ نمونه سرمی افراد HBsAg مثبت انجام شد، پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی GB ویروس C و بهینه سازی روش Semi Nested-PCR، توالی های محصول PCR برای تعیین ناحیه هضم آنزیمی با استفاده از نرم افزارهایی مانند Neb Cutter بررسی و آنزیم های مناسب برای عمل RFLP انتخاب شد.

نتایج: با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که روش به کار رفته برای تشخیص و جداسازی GB ویروس C و تعیین ژنوتیپ های آن از کارایی قابل قبولی برخوردار بوده و در مقایسه با سایر روش ها به هزینه کمتری برای انجام آزمون نیاز دارد.
نتیجه گیری: در این تحقیق مشخص شد که میزان آلودگی به این ویروس در افراد مبتلا به عفونت ویروس هپاتیت B در ایران بالا بوده و ژنوتیپ در گردش GB ویروس C در جمعیت مورد مطالعه، ژنوتیپ ۲ است. نتایج به دست آمده نشانگر این مطلب است که الگوی ژنوتیپ در این مطالعه مشابه با الگوی ژنوتیپ های غالب در اروپا و آمریکا است.

کلیدواژگان: GB ویروس C، HBsAg مثبت، RFLP، تعیین ژنوتیپ، Semi Nested-PCR

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۸۱-۹۱

مقدمه

زمان شناسایی، با حروف لاتین نامگذاری شده است [۱-۳]. در بین اعضای این جنس، GBV-C به دلیل ایجاد آلودگی در انسان بیشتر مورد توجه قرار دارد [۳، ۴]. تاکنون ۶ ژنوتیپ از این ویروس شناسایی و براساس توالی 5'UTR از ۱ تا ۶ نامگذاری شده و تعدادی از آنها دارای زیرتیپ هایی نیز هستند

GB ویروس C (GB virus C: GBV-C) در خانواده فلاوی ویریده (Flaviviridae) و در جنس پگی ویروس (Pegivirus) طبقه بندی می شود. [۱]. در این جنس تاکنون ۴ ویروس GBV-A، -B، -C و -D طبقه بندی شده و به ترتیب

توانایی ژنوتیپ‌های مختلف GBV-C در پاسخ به درمان با HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) را نشان داده‌اند [۱۷-۲۰]. این یافته‌ها کنکاش بیشتر در مورد عفونت همزمان این ویروس با عوامل هپاتیت را تشدید می‌کند و منجر به برانگیختن سؤالاتی در ذهن می‌شود مبنی بر این‌که آیا این ویروس یا ژنوتیپ‌های مختلف آن می‌تواند اثری مثبت مانند آنچه بر سیر بیماری و روند مقاومت دارویی در بیماران HIV مثبت دارند را در عفونت همزمان با HBV داشته باشند؟! نقش ژنوتیپ‌های مختلف ویروس در پاسخ به درمان برخی از ویروس‌ها همانند HIV اهمیت ژنوتیپ‌بندی آن را مشخص کرده است [۲۰]. در مطالعات مختلف ارتباط این ویروس با پیشرفت بیماران مبتلا به هپاتیت B به سمت سرطان کبد نتایج متضادی داشته‌اند؛ پس نقش این ویروس و ژنوتیپ‌های آن در عفونت همزمان با ویروس‌های مولد بیماری هپاتیت، روند پاسخ به درمان و مقاومت‌های دارویی، نیاز به مطالعات بیشتری دارد [۲۱-۲۳]. در حال حاضر هیچ‌گونه تحقیقی در خصوص عفونت GBV-C در بین مبتلایان به هپاتیت B در ایران انجام نگرفته است و علاوه بر آن ژنوتیپ غالب و در گردش بین این افراد شناسایی نشده است. هدف از این مطالعه تشخیص عفونت GBV-C در بین این افراد و مشخص نمودن ژنوتیپ غالب و در گردش آن برای دستیابی به اطلاعات بالینی مفید در مطالعات آینده است.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرها (Primers)

با بررسی در NCBI (National Center for Biotechnology Information) تعداد ۴۴ توالی‌های ثبت شده GBV-C انتخاب و عمل هم‌ردیفی انجام شد. تعدادی از جدایه‌های مرجع شامل ژنوتیپ ۱: U36380 و AB013500، ژنوتیپ ۲: AF121950 و ژنوتیپ ۳: AF309966، ژنوتیپ ۳: D87710 و AB008335، ژنوتیپ ۴: AB018667 و AB21287، ژنوتیپ ۵: AF131117 و ژنوتیپ ۶: AF131112 و ژنوتیپ ۶: AB003292 می‌باشند. نتایج نشان

[۱، ۵]. این ویروس دارای ژنوم تک‌رشته RNA با حس مثبت و با طولی برابر ۹/۴ کیلوباز است. از لحاظ ساختار ژنومی دارای یک قالب باز خواندن (Open Reading Frame: ORF) بلند بوده که تولید یک پلی‌پروتئین با طول ۳۰۰۰ اسیدآمینو می‌کند و همچنین دارای پروتئین‌های E1 و E2 به‌عنوان گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس در یک سوم انتهای ۵' و چند پروتئین غیرساختاری (-NS2-NS3-NS4a-NS4b) در دو سوم باقیمانده ژنوم است. UTR ۵' این ویروس حفاظت شده‌ترین ناحیه ژنوم بوده و از این ناحیه در اغلب مطالعات و در تشخیص استفاده می‌شود [۳، ۵، ۶]. براساس ساختار ژنومی، ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus: HCV) شبیه‌ترین ویروس به GBV-C است با این تفاوت که HCV هپاتوتروپیک (Hepatotropic) بوده ولی GBV-C یک ویروس لنفوتروپیک (Lymphotropic) است [۷، ۸]. انتقال ویروس اغلب از راه خون، فرآورده‌های خونی و تماس جنسی است. عفونت با GBV-C نسبتاً شایع بوده و دارای انتشار جهانی است و آلودگی همزمان آن با HBV، HCV، HIV (Hepatitis B Virus) و (Human Immunodeficiency Virus) ثابت شده است [۹-۱۱]، به همین دلیل محققان متعددی در نقاط مختلف جهان، علاقمند به مطالعه و بررسی ارتباط بین این ویروس و بیماری‌زایی در انسان شده‌اند و تحقیقات فراوانی صورت گرفته که در اکثر آن‌ها همراهی GBV-C با بیماری در انسان رد شده است [۱۲-۱۴]. عفونت این ویروس در مرحله حاد خیلی خفیف بوده و در ۵ تا ۱۰ درصد موارد به‌طور پایدار برای ۱ تا ۹ سال به شکل مزمن در بدن فرد باقی می‌ماند و در بقیه موارد به‌طور خودبه‌خودی از بدن پاک‌سازی می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که تشکیل آنتی‌بادی بر علیه پروتئین E2، مقارن با از بین رفتن ویرمی (Viremia) است [۱۵، ۱۶]. همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که عفونت همزمان HIV برای فرد مبتلا به عفونت HIV سودمند بوده و پیش‌آگهی بهتر و پیشرفت آهسته‌تر بیماری به سمت ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) را در پی دارد. از طرفی، نتایج برخی از تحقیقات تفاوت در

طراحی شده روش مورد نظر راه اندازی شد و پس از بهینه سازی و تأیید نهایی، آغازگرها در واکنش Semi Nested-PCR استفاده شدند. دو آغازگر خارجی مربوط به مرحله اول قطعه ۲۶۲ جفت بازی را سنتز کردند و مرحله دوم با دو آغازگر داخلی و خارجی ادامه یافت که در این مرحله قطعه ای به طول ۲۳۷ جفت باز تولید شد. آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت Alfa Sequencing (انگلستان) ساخته شد (جدول ۱).

داد که بهترین ناحیه از لحاظ حفاظت شدگی برای طراحی آغازگرها در این ویروس ناحیه ۵' UTR ابتدای ژنوم است؛ علاوه بر آن این ناحیه برای شناسایی ژنوتیپها نیز مناسب است. برای طراحی آغازگرها و تأیید انتخاب بهترین آغازگر از ویژگی های متفاوت نرم افزارهای Mega۴ و NCBI Blast استفاده شد و بهترین آغازگرها از نظر حساسیت و اتصال اختصاصی انتخاب شد. در این تحقیق با کمک دو جفت آغازگر

جدول ۱ توالی، مکان اتصال و طول محصول آغازگرهای طراحی شده برای تشخیص GBV-C

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول	مکان اتصال
آغازگر خارجی/IS۱	۵'-GGTCGTAAATCCCGGTCACC-۳'	۲۶۲ جفت باز	۱۳۹ تا ۴۰۰
آغازگر خارجی/OS۱	۵'-CCCCTGGTCTCTGTCAACT-۳'		
آغازگر داخلی/IS۲	۵'-TAGCCACTATAGGTGGGTCT-۳'	۲۳۷ جفت باز	۱۶۳ تا ۴۰۰
آغازگر داخلی/OS۲	۵'-ATTGAAGGGCGACGTGGACC-۳'		

داخل یک میکروتیوب عاری از RNase، DNase ریخته شد و برای ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و سپس به سرعت روی یخ قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه موجود در RNA باز شوند. سپس به میزان ۰/۵ میکرولیتر از مهار کننده ریبونوکلیاز (Ribonuclease Inhibitor) و ۳/۵ میکرولیتر آب دی اتیل پیرو کربونات (DEPC Water) و ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۲ میلی مولار) و ۲ میکرولیتر بافر RT ۱x به ازای هر نمونه به هر میکروتیوب اضافه شد و برای ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد داخل ترموسایکلر قرار گرفت؛ در مرحله بعد به ازای هر نمونه ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه بردار معکوس M-MuLV وارد واکنش شد و مخلوط حاصل برای ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای غیرفعال شدن آنزیم قرار گرفت تا پایان واکنش رخ دهد. پس از پایان این مراحل میکروتیوبها از دستگاه ترموسایکلر خارج و روی یخ منتقل شد. محصول این واکنش به عنوان الگوی مراحل Semi Nested-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

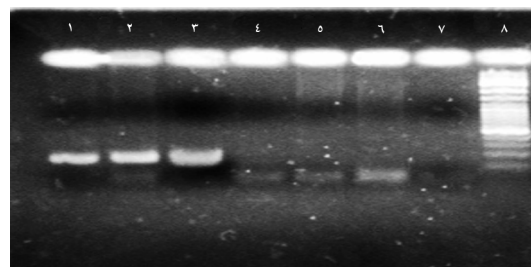
جمع آوری نمونه ها و استخراج RNA ویروسی و نسخه برداری معکوس

تعداد ۱۰۰ نمونه سرم (Hepatitis B surface) HBsAg (Antigen) مثبت از مراکز انتقال خون تهیه شد که برای تأیید مثبت بودن آنها آزمون الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) (با استفاده از Enzygnost 0.6 Kit، شرکت Siemens، ساخت کشور آلمان) انجام گرفته بود. پس از تأیید نتایج سرولوژیکی سرمها داخل میکروتیوب جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تهیه نمونه ها مراحل مربوط به اخذ مجوزهای لازم از کمیته ایمنی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

۱۴۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم برای استخراج RNA (با استفاده از QIAamp RNA Viral Mini Kit ساخت شرکت QIAgene آلمان) استفاده شد و RNA استخراج شده از نمونه های مورد مطالعه برای ساخت cDNA استفاده شد. در مرحله ساخت cDNA ابتدا ۱۰ میکرولیتر از RNA همراه با ۲ میکرولیتر از آغازگر اختصاصی OS1 (۱۰ پیکومول)

Semi Nested-PCR-RFLP برای تشخیص و تعیین ژنوتیپ GB ویروس C

محصول به دست آمده از مرحله دوم PCR به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) و تحت اثر اشعه ماورای بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه قطعات تکثیری و تأیید وجود قطعات مورد نظر، از نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی ساخت شرکت Fermentas (کانادا) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱ ستون‌های ۱، ۲، ۳ نمونه‌های مثبت از نظر GBV-C. ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۷ نمونه‌های منفی از نظر GBV-C. ستون ۷ کنترل منفی، ستون ۸ نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی

انتخاب آنزیم‌های محدود کننده

برای تعیین ژنوتیپ (Genotyping) با روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ضروری است که موقعیت‌های ژنومیک ویروس که تفاوت‌های ژنوتیپ‌ها را مشخص می‌کند و همچنین حاوی جایگاه‌های برش هستند با دقت تعیین شود. این روش در مطالعات اپیدمی برای تشخیص سریع و واقعی حجم بالایی از نمونه‌ها مناسب است [۲۴]. بنابراین برای تعیین ۶ ژنوتیپ GBV-C با روش RFLP ابتدا کلیه ژنوتیپ‌های ذخیره شده موجود در NCBI را انتخاب و یک به یک ناحیه UTR ۵' آن‌ها را با نرم‌افزارهای Web cutter و Neb cutter بررسی و آنزیم‌های برش دهنده ناحیه محصول مقایسه شد تا حداقل تعداد آنزیم‌های برش دهنده و تعیین کننده ۶ ژنوتیپ انتخاب شود. در نهایت ۳ آنزیم انتخاب شد که قابلیت شناسایی ۶ ژنوتیپ ویروس را داشت که شامل ۳ آنزیم محدود کننده (*BanII* (FriOI), *DraII* (ECO 0109I), *AvaII* (Bme18I) بود (جدول ۲).

جدول ۲ نام آنزیم‌های محدود کننده و نوع برش در ناحیه 5'UTR ویروس GB

نام آنزیم	مکان شناسایی
<i>DraII</i> (ECO 0109I)	۵'RG ⁺ GNCY ⁺ ۳' ۳'YCCNG ₁ GY ⁺ ۵'
<i>AvaII</i> (Bme18I)	۵'G ⁺ GWCC ⁺ ۳' ۳'CCWG ₁ G ⁺ ۵'
<i>BanII</i> (FriOI)	۵'GRGCY ⁺ C ⁺ ۳' ۳'C ₁ YCGRG ⁺ ۵'

Semi Nested-PCR

برنامه PCR طبق مراحل آزمایش برنامه‌ریزی شده برای GBV-C تنظیم شد. این واکنش به صورت دو مرحله‌ای انجام شد که در مرحله اول از آغازگرهای خارجی IS1 و OS1 استفاده شد. مخلوط واکنش مرحله اول بدین شرح بود: ۰/۵ میکرولیتر از (مخلوط dNTP ۰/۲ میلی‌مولار)، ۰/۷۵ میکرولیتر از کلرید منیزیم (۱/۵ میلی‌مولار) و ۲/۵ میکرولیتر از محلول بافر ۱x PCR و آغازگرهای خارجی هر کدام ۰/۴ میکرولیتر و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم *Taq* (۵ واحد در میکرولیتر) همراه با ۵ میکرولیتر از cDNA ساخته شده مرحله قبل که با DEPC (Diethylpyrocarbonate) آب مقطر دو بار تقطیر زده شده، به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. مراحل PCR به این ترتیب بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۳۲ چرخه به این ترتیب: ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۵۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه و در نهایت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس برای مرحله دوم از آغازگرهای IS2 و OS1 استفاده شد و مخلوط واکنش مشابه مرحله اول با این تفاوت که مقدار ۱ میکرولیتر از محصول مرحله اول وارد واکنش شد و مراحل PCR در این مرحله به این ترتیب بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۳۲ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه و ۶۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه و در آخر ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه. سپس

برش با آنزیم‌های محدود کننده

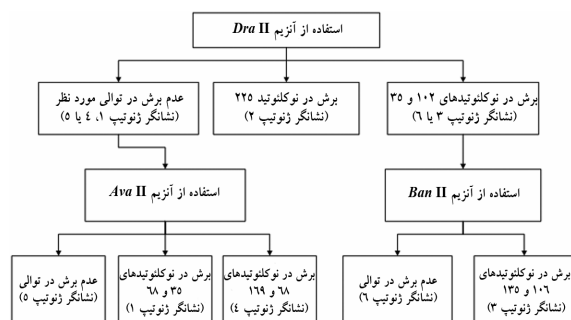
در این مطالعه، روند واکنش‌های هضم با آنزیم‌های محدود کننده، در سه مرحله برنامه‌ریزی شد:

ابتدا در مرحله اول ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به‌دست آمده در مرحله قبل طبق برنامه شرکت سازنده آنزیم، با ۱ میکرولیتر آنزیم *DraII* ۱۰ واحد در میکرولیتر ۲ و میکرولیتر بافر ۱۰x مخصوص آنزیم (Tango) داخل میکروتیوب مخلوط و به‌وسیله آب مقطر دو بار تقطیر DEPC زده شده به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و برای تعیین ژنوتیپ‌ها، میکروتیوب‌ها برای ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله اول طبق بررسی‌های نرم‌افزاری صورت گرفته، انتظار می‌رفت که استفاده از آنزیم *DraII* به سه صورت عمل کند: (۱) ایجاد برش در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۲۵ و ایجاد قطعات ۲۲۵ و ۱۵ جفت‌بازی که نشان دهنده ژنوتیپ ۲ است. (۲) عدم ایجاد برش در محصول به‌صورت حضور قطعه ۲۳۷ جفت‌بازی در ژل که نشان دهنده ژنوتیپ‌های ۱ و ۴ و ۵ است و (۳) برش در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۳۵ و ۱۰۲ و ایجاد سه قطعه ۳۵ و ۱۰۲ و ۱۰۰ جفت‌بازی که نشان دهنده ژنوتیپ‌های ۳ یا ۶ است.

در مرحله دوم روند هضم آنزیمی محصول با آنزیم ۳۰ واحد در لیتر *AvaII* همراه با بافر ۱۰x مخصوص آنزیم طبق برنامه شرکت سازنده آنزیم قبل ادامه یافت و پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، با استفاده از این آنزیم پیش‌بینی شد که (۱) عدم برش محصول، نشان دهنده حضور ژنوتیپ ۵ است؛ (۲) برش در موقعیت‌های ۳۵ و ۶۸ و تولید سه قطعه ۳۵ و ۳۳ و ۱۷۲ جفت‌بازی نشان دهنده ژنوتیپ ۱ و در نهایت (۳) برش در موقعیت‌های ۶۸ و ۱۶۹ و ایجاد قطعات ۶۸ و ۱۰۱ و ۷۱ جفت‌بازی نشان دهنده ژنوتیپ ۴ است.

در مرحله سوم و نهایی، محصول با آنزیم ۳۰ واحد در لیتر *BanII* همراه با بافر ۱۰x مخصوص آنزیم و آب مقطر دو بار تقطیر DEPC زده شده و ۱۰ میکرولیتر نمونه، مخلوط و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۶ ساعت ادامه یافت

که در نهایت (۱) عدم برش به منزله وجود ژنوتیپ ۶ بود و (۲) برش در موقعیت‌های ۱۰۶ و ۱۳۵ و ایجاد قطعات ۱۰۶ و ۲۹ و ۱۰۵ جفت‌بازی، نشان دهنده ژنوتیپ ۳ بود (نمودار ۱).



نمودار ۱ مربوط به مراحل انتخاب آنزیم‌های محدود کننده

نتایج

در این مطالعه با به‌کارگیری روش Semi Nested-PCR، ژنوتیپ‌های ویروس به روش RFLP و با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *BanII* (FriOI)، *AvaII* (Bme18I)، *DraII* (ECO 0109I) و شناسایی الگوی ژنوتیپی نمونه‌های مورد مطالعه، مشخص شد. نتایج هضم آنزیمی در این مطالعه به‌ترتیب زیر به‌دست آمد: از تعداد ۱۰۰ نمونه سرم HBsAg مثبت، تعداد ۱۲ عدد آن‌ها از نظر ژنوم GBV-C مثبت بودند که از این تعداد، در مرحله اول، ۱۲ عدد با آنزیم *DraII* برش خورده و ایجاد قطعات ۲۲۵ و ۱۵ جفت‌بازی کردند که نشان دهنده حضور ژنوتیپ ۲ بود. در ادامه کار، برای تعیین ژنوتیپ تنها نمونه باقیمانده از مرحله قبل که با آنزیم *DraII* برشی متفاوت از سایر نمونه‌ها داشت، طبق روش طراحی شده (مرحله اول ۲-۵)، از آنزیم *BanII* استفاده شد که نتیجه حاصل، تولید قطعات ۱۰۶ و ۲۹ و ۱۰۵ جفت‌بازی و نشان دهنده ژنوتیپ ۳ بود. با توجه به برش آنزیمی هر ۱۲ نمونه در مرحله اول، مشخص شد که ژنوتیپ‌های ۱، ۴ و ۵ در بین نمونه‌های مورد مطالعه حاضر وجود نداشته و نیازی به استفاده از آنزیم *AvaII* برای برش و تأیید حضور ژنوتیپ‌های نامبرده

Semi Nested-PCR-RFLP برای تشخیص و تعیین ژنوتیپ GB ویروس C

نقش ژنوتیپ‌های ویروس در پاسخ به درمان ضد ویروسی انجام شده است [۱۱، ۲۰]. طی پژوهش‌های به عمل آمده، شیوع GBV-C در اهداکنندگان سالم خون ۱ تا ۴ درصد در آمریکای شمالی و اروپا و ژاپن، ۲ تا ۶ درصد در آسیا و ۵/۵ تا ۱۴/۵ درصد در آمریکای لاتین و در برخی از کشورهای آفریقایی از ۱۰ تا ۱۸ درصد گزارش شده است، همچنین در همودیالیزی‌ها تا ۶/۸ درصد، در HIV مثبت‌ها تا ۱۸/۲ درصد، در HCV مثبت‌ها تا ۲۴/۴ درصد و در معتادین تزریقی تا ۲۸/۸ درصد و در هموفیلی‌ها ۳۵/۲ درصد گزارش شده است [۲۵، ۲۶]. میزان شیوع این ویروس طی مطالعات انجام شده در ایران بین جمعیت افراد آلوده به HIV تا ۱۵/۵ درصد و در مبتلایان به HCV تا ۴۳/۶ درصد و در هموفیلی‌ها ۴۱/۴ درصد و در تالاسمی‌ها ۳۳/۴ درصد و در جمعیت اهداکنندگان سالم خون تا ۸/۶ درصد گزارش شده است [۱۱، ۲۷، ۲۸].

با کمک روش‌های نوین مولکولی و طراحی آغازگرهای حساس، روش‌های تشخیص ژنوم GBV-C ساده و دقیق بوده و با کمک اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه گلیکوپروتئین سطحی ویروس (E2) می‌توان به حضور سابق ویروس و مزمن بودن فرد آلوده پی برد. همچنین روش‌های متعددی برای تعیین ژنوتیپ ویروس موجود است از جمله به‌کارگیری روش زنجیره پلیمرز از کل ژنوم یا ناحیه 5'UTR ویروس توسط آغازگرهای اختصاصی، تعیین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس، استفاده از روش تعیین توالی مستقیم، روش سنتز کاوشگر اختصاصی ناحیه 5'UTR، به‌کارگیری روش سرولوژیک و ساخت آنتی‌بادی‌های اختصاصی یا روش RFLP و استفاده از آنزیم‌های محدود کننده. هرکدام از این روش‌های نامبرده فواید و معایبی دارند برای مثال در روش سرولوژیک سهولت انجام آزمون از فواید و فقدان اختصاصیت لازم از معایب آن به حساب می‌آیند و از معایب تعیین توالی می‌توان به نکات زیر اشاره کرد: عدم دسترسی آسان و استفاده از این روش در تمام کشورها، هزینه بالا، وقت‌گیر و پر زحمت بودن آن و عدم قابلیت تشخیص سوش‌های جهش‌یافته در

نبود. بنابراین طی این پژوهش، ژنوتیپ ۲ با تعداد ۱۱ مورد (۹۱/۶ درصد) و ژنوتیپ ۳ با ۱ مورد (۸/۳ درصد) مجموع ژنوتیپ‌ها را در نمونه‌های مورد آزمایش تشکیل داد. برای افزایش دقت کار، پس از تهیه و آماده‌سازی ژل آگارز ۳ درصد، از آب مقطر DEPC زده شده به‌عنوان کنترل منفی، از نمونه مثبت بدون هضم آنزیمی به‌عنوان کنترل مثبت و از نشانگر وزنی ۱۰۰ و ۵۰ جفت‌بازی داخل چاهک‌های ژل ریخته شد و پس از گذشت زمان لازم و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید نتایج بررسی شد. با مقایسه باندهای به‌دست آمده تعیین ژنوتیپ‌های GBV-C انجام شد (شکل ۲). در انتها برای تأیید نتایج کار، به‌طور تصادفی تعدادی از نمونه‌ها برای تعیین توالی استفاده شد که نتایج حاصل درستی و دقت روش به‌کاررفته را مشخص کرد. لازم به ذکر است آنزیم *DraII* از شرکت Fermentas (کانادا) و *BanII* از شرکت Vivantis (مالزی) خریداری شد.



شکل ۲ ستون ۱) نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸) حضور باند ۲۲۵ جفت‌بازی و نشانگر ژنوتیپ ۲، ستون ۵) حضور باندهای ۱۰۵ و ۱۰۶ جفت‌بازی و نشانگر ژنوتیپ ۳، ستون ۹) کنترل منفی، ستون ۱۰) نمونه بدون هضم آنزیمی به‌عنوان کنترل مثبت

بحث

شیوع GBV-C در تمام جهان فراگیر بوده و به دلیل راه‌های انتقال مشترک و آلودگی همزمان آن با HBV، HCV و HIV جداسازی و بررسی عملکرد این ویروس و ژنوتیپ‌های آن در عفونت همزمان با سایر ویروس‌ها اهمیت دارد. مطالعات متعددی در رابطه با نقش این ویروس در ممانعت از پیشرفت بیماری در افراد آلوده به عفونت همزمان HIV و GBV-C و

جمعیت ناهمگون متشکل از سوش وحشی و جهش یافته و عدم تشخیص عفونت همزمان [۲۹، ۲۴]. مزایای روش RFLP نسبت به سایر روش‌ها عبارتند از سرعت عمل و دقت لازم و قابل قبول در مقایسه با سایر روش‌ها از جمله روش تعیین توالی، عدم نیاز به پردازش رایانه‌ای، مناسب بودن برای مطالعه در زمان‌های اپیدمی و کارآمدی در مقیاس بالای نمونه‌های بالینی، قابلیت تعیین تمام ژنوتیپ‌ها از جمله ژنوتیپ‌های جدید و توانایی ردیابی چندین سوش در یک جمعیت ناهمگون [۲۹، ۳۰].

در مطالعات انجام شده در ارتباط با GBV-C در ایران که اکثراً روی آلودگی همزمان این ویروس با HIV بوده، از روش‌های تعیین توالی مستقیم و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک برای تعیین ژنوتیپ‌های ویروس استفاده شده است که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، نمونه‌های مثبت از نظر ویروس GBV-C را انتخاب کرده و سپس با استفاده از روش‌های تعیین توالی مستقیم موفق به شناسایی ژنوتیپ‌های ویروس شدند. از جمله در مطالعه انجام شده توسط قنبری و همکاران که در مقایسه با مطالعه حاضر از طول کوتاه‌تری از ناحیه 5'UTR برای تعیین ژنوتیپ‌ها استفاده شد و ژنوتیپ در گردش GBV-C بین جمعیت مبتلا به عفونت HCV تعیین شده است [۲۵، ۳۱]. همچنین در مطالعات انجام گرفته توسط موئرهورف (Muerhoff) و همکاران روش تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک برای تعیین ژنوتیپ‌های ویروس به کار رفته و در مطالعه اوبینا (Oubina) و همکاران، از روش RFLP برای تعیین ژنوتیپ GBV-C استفاده شده که در زمان انجام این مطالعه، تنها ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ و ۳ شناسایی شده بودند [۵، ۸]. طی پژوهش صورت گرفته توسط میزوکامی (Mizokami) و همکاران نیز از هر دو روش تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و RFLP برای تعیین سه ژنوتیپ GBV-C استفاده شده است [۲۴، ۳۲].

در مطالعات اولیه برای تشخیص ژنوم این ویروس از آغازگرهایی برای نواحی غیر ساختمانی ژنوم مانند NS3 و NS5a استفاده می‌شد [۳۳، ۳۴]. طی بررسی حاضر برای تشخیص GBV-C، با استفاده از روش Semi Nested-PCR،

توالی ۲۳۷ جفت‌بازی ناحیه 5'UTR ویروس توسط آغازگرهای حساس شناسایی و تکثیر یافت. طبق مطالعات صورت گرفته، روش Semi Nested-PCR باعث افزایش حساسیت تشخیص محصول به میزان ۱۰^۴ برابر شده که قابل توجه است؛ بنابراین این روش همواره به‌عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد موجب افزایش حساسیت و اختصاصیت آزمایش شده و برای تأیید محصول PCR به کار می‌رود [۳۵]. در ادامه با استفاده از روش RFLP و آنزیم‌های برش دهنده ژنوم GBV-C، موفق به شناسایی ژنوتیپ غالب موجود در گردش این ویروس در جمعیت افراد HBsAg مثبت شدیم و با تأیید حاصل از روش تعیین توالی، مشخص شد که روش استفاده شده برای تعیین ژنوتیپ (PCR-RFLP) از کارایی قابل قبولی برخوردار است.

در پایان با توجه به نتایج پژوهش به دست آمده در مقایسه با نتایج سایر مطالعات داخلی و خارجی که در اکثر آن‌ها از تعیین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک استفاده شده و با توجه به این نکته که تاکنون در ایران از روش RFLP برای تعیین ژنوتیپ GBV-C استفاده نشده است، سادگی این روش و عدم نیاز به صرف هزینه و زمان کاری زیاد، استفاده از این روش را منطقی ساخت. در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه سرم آلوده به HBV، ۱۲ عدد از نمونه‌ها دارای آلودگی همزمان با GBV-C بوده و از این تعداد ۱۱ مورد ژنوتیپ ۲ و ۱ مورد ژنوتیپ ۳ تشخیص داده شد. بنابراین نتایج حاصل، شیوع بالای GBV-C را در جمعیت افراد مبتلا به HBV در ایران نشان می‌دهد. از طرفی، نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ‌های این ویروس نشانگر این مطلب است که الگوی ژنوتیپ در این مطالعه مشابه با الگوی ژنوتیپی غالب در اروپا و آمریکا است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل پژوهش پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه به انجام رسیده است.

- [1] Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 2): 233-46.
- [2] Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J Virol Methods* 2001; 91(1): 3-9.
- [3] Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Vol 2, Chapter 32, Raven Press, 2007; p: 1022-4.
- [4] Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS, Erker JC, Buijk SL, Chalmers ML, Van Sant CL, Mushahwar IK. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Medical Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(8): 3401-5.
- [5] Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J Med Virol* 2006; 78(1): 105-11.
- [6] Reshetnyak VI, Karlovich TI, Ilchenko LU. Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol* 2008; 14(30): 4725-34.
- [7] Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB virus type C: a beneficial infection? *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 3915-9.
- [8] Ruiz V, Giordano M, Rivero CW, Minassian ML, Cuestas ML, Trinks J, Mathet VL, Oubiña JR. GB virus C quasispecies detected in plasma and lymphocyte subsets in a natural human infection. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 7): 1687-92.
- [9] Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat* 2009; 16(11): 757-68.
- [10] Wiwanitkit V. Hepatitis G virus RNA positivity among the voluntary blood donors: a summary. *Ann Hepatol* 2005; 4(1): 43-6.
- [11] Ziaee M, Zarban A, Malekinejad P, Akhbary H. Evaluation of HGV Viremia Prevalence and Its Co-Infection with HBV, HCV, HIV and HTLV-1 in Hemophilic Patients of Southern Khorassan, Iran. *Hep Mon* 2007; 7(1): 11-4.
- [12] Ramezani A, Gachkar L, Eslamifar A, Hamkar R, Banifazl M, Yadegari D, Alilvand S, Adibi L, Salimi N, Naghili B, Khoushbaten M, Velayati A. A Prevalence of Hepatitis G virus Exposure in Blood Donors. *Iranian J Infect Dis Trop Med* 2007; 12(37): 41-6.
- [13] Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol* 2005; 33(4): 257-66.
- [14] Radkowski M, Stańczak W, Walewska-Zielecka B, Loch T, Cianciara J, Wang LF, Laskus T. Hepatitis G virus coinfection in chronic hepatitis B and C patients in Poland. *Infection* 1998; 26(2): 113-5.
- [15] Polgreen PM, Xiang J, Chang Q, Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes Infect* 2003; 5(13): 1255-61.

- [16] Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, Liu C, Phair J, Margolick JB, Zdunek D, Hess G, Stapleton JT. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med* 2004; 350(10): 981-90.
- [17] Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, Kratochvil J, Hunt J, Qiu X, Lou SC, Pichlmayr R, Manns MP. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 1998; 28(2): 379-84.
- [18] Lisco A, Vanpouille C, Margolis L. War and peace between microbes: HIV-1 interactions with coinfecting viruses. *Cell Host Microbe* 2009; 6(5): 403-8.
- [19] Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Jordan EL, Stapleton JT. Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PLoS One* 2008; 3(7): e2580.
- [20] Antonucci G, Girardi E, Cozzi-Lepri A, Capobianchi MR, Morsica G, Pizzaferrri P, Ladisa N, Sighinolfi L, Chiodera A, Solmone M, Lalle E, Ippolito G, Monforte A; HepalCoNA Study Group; ICoNA Study Group. Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naive HIV-infected individuals. *Antivir Ther* 2005; 10(1): 109-17.
- [21] Yang JF, Dai CY, Chuang WL, Lin WY, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY, Yu ML. Prevalence and clinical significance of HGV/GBV-C infection in patients with chronic hepatitis B or C. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59(1): 25-30.
- [22] Bréchet C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde K, Papakonstantinou A, Hadziyannis S, Romeo R, Colombo M, Rodes J, Bruix J, Williams R, Naoumov N. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action. *J Hepatol* 1998; 29(2): 173-83.
- [23] Pramoolsinsap C, Sirikulchayanonta V, Busakorn W, Poovorawan Y, Hirsch P, Theamboonlers A, Lerdverasirikul P. Coinfections with hepatitis g and/or c virus in hepatitis B-related chronic liver disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(4): 741-9.
- [24] Quarleri JF, Mathet VL, Feld M, Ferrario D, della Latta MP, Verdun R, Sánchez DO, Oubiña JR. GB virus C/hepatitis G virus groups and subgroups: classification by a restriction fragment length polymorphism method based on phylogenetic analysis of the 5' untranslated region. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1340-7.
- [25] Hekmat S, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Bahramali G, Banifazl M, Aghakhani A, Eslamifar A, Mahboudi F, Edalat R, Ramezani A. Frequency and genotype of GB virus C among Iranian patients infected with HIV. *J Med Virol* 2008; 80(11): 1941-6.
- [26] Stapleton JT. GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis* 2003; 23(2): 137-48.
- [27] Rezvan H, Sharafi M, Shams H, Mahmoodian Shooshtari M. A Preliminary Report on Prevalence of Antibody Response to GBV-C, E2 Protein in Iranian Blood Donors and

C Semi Nested-PCR-RFLP برای تشخیص و تعیین ژنوتیپ GB ویروس

- Multitransfused Patients. Iranian J Publ Health 2007; 36(4): 6-11.
- [28] Amini Kafi-Abad S, Samiei S, Talebian A, Maghsudloo M, Gharehbaghian A. Hepatitis G virus infection in Iranian Blood donors and High-Risk Groups. Hep Mon 2009; 9(4): 282-6.
- [29] Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, Ross LL, Lutz MW, Condrey LD. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3338-47.
- [30] Schleicher SB, Flehmig BF. Genotyping of GB virus C by restriction pattern analysis of the 5' untranslated region. J Med Virol 2003; 71(2): 226-32.
- [31] Ghanbari R, Ravanshad M, Hosseini SY, Yaghobi R, Shahzamani K. Genotyping and Infection Rate of GBV-C Among Iranian HCV-Infected Patients. Hep Mon 2010; 10(2): 80-7.
- [32] Mukaide M, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Nakano T, Ueda R, Hikiji K, Iino S, Shapiro S, Lahat N, Park YM, Kim BS, Oyunsuren T, Rezieg M, Al-Ahdal MN, Lau JY. Three different GB virus C/hepatitis G virus genotypes. Phylogenetic analysis and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. FEBS Lett 1997; 407(1): 51-8.
- [33] Künkel U, Höhne M, Berg T, Hopf U, Kekulé AS, Frösner G, Pauli G, Schreier E. Quality control study on the performance of GB virus C/hepatitis G virus PCR. J Hepatol 1998; 28(6): 978-84.
- [34] Lefrère JJ, Férec C, Roudot-Thoraval F, Loiseau P, Cantaloube JF, Biagini P, Mariotti M, LeGac G, Mercier B. GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individuals and in immunocompetent individuals. J Med Virol 1999; 59(1): 32-7.
- [35] McPherson MJ, Moller SG. The Basic PCR. 2th Edition. USA: BIOS, 2006; p: 18-32.