

تشخیص ویروس هپاتیت G (GBV-C) در بیماران

هپاتیت مزمن C، با روش RT-Nested PCR

رضا قنبری^{۱*}، مهرداد روانشاد^۲، سیدیونس حسینی^۱، کیانا شاهزمانی^۳ و^۴

^۱ پژوهشگر، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

^۴ پژوهشگر، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف

ویروس هپاتیت G (GBV-C)، یک ویروس RNA دار تک رشته ای با پلارینه مثبت می باشد که عضوی از خانواده فلاوی ویریده است. عفونت با این ویروس شایع بوده و دارای انتشار جهانی است. تشخیص دقیق این ویروس به دلیل همراهی آن با ویروس های مهمی چون HCV، HBV و HIV، بسیار حائز اهمیت می باشد، چرا که در حالت عفونت هم زمان، ممکن است بر روی بیماریزایی، سیر بیماری و هم چنین پاسخ به درمان ضد ویروسی تاثیرگذار باشد.

روش بررسی

در پژوهش حاضر روش حساس و دقیق RT-Nested PCR، برای جداسازی و شناسایی توالی 5'-UTR ویروس هپاتیت G (GBV-C)، راه اندازی و به کار گرفته شد. ابتدا ژنوم ویروس استخراج گردید و سپس با روش ترانس کریپتاز معکوس، cDNA سنتز گردید. پس از آن با استفاده از یک PCR دو مرحله ای و دو جفت آغازگر اختصاصی، منطقه مورد نظر از ژنوم ویروس تکثیر گردید و سپس محصول نهایی با روش الکتروفورز روی ژل آگارز مشاهده گردید.

یافته ها

بر اساس ۵ نمونه مثبت از نظر ویروس هپاتیت G (GBV-C)، روش مورد نظر راه اندازی و بهینه سازی شد. پس از آن با استفاده از روش راه اندازی شده، تعداد ۷۱ مورد سرم بیمار مبتلا به هپاتیت C مزمن از نظر وجود ویروس هپاتیت G (GBV-C)، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت نشان داده شد که تعداد ۳۱ مورد (۴۳/۶ درصد) از نظر ویروس هپاتیت G، مثبت بودند.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص گردید که روش راه اندازی شده، از کارایی قابل قبولی برای تشخیص عفونت ویروس هپاتیت G (GBV-C)، برخوردار می باشد. علاوه بر آن نشان داده شد که میزان آلودگی به این ویروس در افراد مبتلا به عفونت مزمن HCV در ایران بالا می باشد. کلیدواژه: RT-PCR، Nested PCR، ویروس هپاتیت G، ناحیه 5'-UTR

گوارش / دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ۱۵۳-۱۶۰

زمینه و هدف

ویروس هپاتیت G (GBV-C)* یک ویروس کروی و دارای پوشینه می باشد که به همراه ویروس هپاتیت C، عضوی از خانواده فلاوی ویریده است. (۱)، ژنوم این ویروس RNA تک رشته ای با پلارینه مثبت بوده که طول ژنوم آن

نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی

تلفن و نمابر: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۳۶

پست الکترونیک: Ravanshad@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۴

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۸/۱۲/۳

۹/۴ کیلوباز می باشد. (۲)، همانند دیگر اعضای خانواده فلاوی ویریده، ژنوم GBV-C شامل یک قالب باز خوانا (Open Readig Frame) بزرگ است، که یک پلی پروتئین با حدود ۳۰۰۰ اسید آمینه را کددهی می کند. (۳-۵)، ژنوم این ویروس حاوی ژن های ساختمانی C، E1 و E2 در یک سوم قسمت 5' به همراه ژن های غیر ساختمانی NS2، NS3، NS4a، NS4b، NS5a و NS5b در دو سوم باقی مانده است (۳ و ۶).

با بررسی و مقایسه ژنوم و توالی نوکلئوتیدی دو ویروس GBV-C و ویروس هپاتیت C، مشخص گردید که این دو ویروس از لحاظ ژنومی ارتباط بسیار نزدیکی با هم دارند (۷)، ولی GBV-C بر خلاف HCV، یک ویروس

* Hepatitis G Virus

QIAamp Viral RNA Mini Kit، استخراج گردید، که نتایج یکدیگر را تایید نمودند (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه استخراج ژنوم ویروس با دوروش کیت دستی

۱ و ۲ نمونه های مثبت روش کیت
۳: کنترل منفی روش کیت
۴: کنترل منفی و روش دستی
۵ و ۶: نمونه های مثبت روش دستی

طراحی آغازگر و سنتز cDNA: ابتدا توالی های مربوط به ویروس GBV-C، از بانک اطلاعاتی Genebank جمع آوری و سپس با استفاده از multiple alignment و بهره گیری از نرم افزار Bioedit و Gene runner، آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه 5'-UTR ویروس هپاتیت G (GBV-C)، طراحی و انتخاب گردید (جدول ۱). آغازگر بیرونی Forward از نوکلئوتید ۱۳۹ تا نوکلئوتید ۱۵۸ و آغازگر بیرونی Reverse از نوکلئوتید ۳۸ تا نوکلئوتید ۴۰۰ از ناحیه 5'-UTR ژنوم ویروس هپاتیت G را شناسایی کرده و قطعه ای به طول ۲۶۲ جفت باز پس از پایان مرحله اول PCR تولید می کند. هم چنین آغازگر درونی Forward از نوکلئوتید ۱۶۳ تا نوکلئوتید ۱۸۲ و آغازگر درونی Reverse از نوکلئوتید ۳۳۱ تا نوکلئوتید ۳۵۰ را شناسایی می کند و قطعه ای به طول ۱۸۸ جفت باز پس از پایان مرحله نهایی PCR تولید خواهد نمود.

جدول ۱: توالی آغازگرهای بیرونی و درونی برای تشخیص ویروس هپاتیت G (GBV-C)

PCR مرحله اول	آغازگر بیرونی Forward	5'-GGTCGTAAATCCCGGTCACC-3'
	آغازگر بیرونی Reverse	5'-CCCACCTGGTCCTTGCAACT-3'
PCR مرحله دوم	آغازگر درونی Forward	5'-TAGCCACTATAGGTGGGTCT-3'
	آغازگر درونی Reverse	5'-ATTGAAGGGGACGCTGGACC-3'

RNA استخراج شده بلافاصله با روش ترانس کریپتاز معکوس، با استفاده از آنزیم M-MuLV و آغازگراندوم هگزامر، تبدیل به cDNA گردید. برنامه دمایی برای این مرحله، ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد و در آخر ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد، در نظر گرفته شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز در ۲ مرحله (Nested PCR): تهیه مخلوط واکنش در مرحله اول PCR به طریقه زیر صورت گرفت: محلول 1X بافر PCR، ۲/۵ میکروولتر، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، ۰/۷۵ میکروولتر، مخلوط نوکلئوتیدی ۰/۲ میلی مولار، ۰/۵ میکروولتر، آغازگرهای بیرونی ۱۲/۵ پیکومول، ۰/۳ میکروولتر، آنزیم Taq (5unit/ul)، ۰/۲۵ میکروولتر و در نهایت ۲ میکروولتر از cDNA سنتز شده در مرحله قبل. سپس حجم نهایی توسط آب مقطر به ۲۵ میکروولتر رسانده شد. دور اول با شرایط زیر انجام

لنفوتروپیک بوده و در لنفوسیت های طحال و مغز استخوان و حتی لنفوسیت های TCD4⁺ خون محیطی تکثیر می یابد (۸).

عفونت با این ویروس نسبتاً شایع بوده و دارای انتشار جهانی می باشد، به طوری که ژنوم این ویروس در ۱ تا ۴ درصد اهداء کنندگان سالم خون شناسایی شده است (۵). انتقال این ویروس عمدتاً از راه خون و فرآورده های خونی و یا از راه تماس جنسی می باشد (۹). آلودگی های مشترک این ویروس با دیگر ویروس ها مثل HCV، HBV و HIV، شایع بوده، که به دلیل مشترک بودن راه های انتقال آنهاست (۱۰). از نظر بالینی GBV-C و HCV، در بین ویروس های RNA دار انسانی غیر معمول هستند، چون بدون ایجاد یک DNA واسط و یا یک فاز نهفته در سیکل تکثیر خود، می توانند یک عفونت طولانی مدت را در بدن ایجاد کنند (۱۱). نقش این ویروس در ایجاد بیماری کبدی هنوز به درستی روشن نشده، و پاتوژن آن در مورد افراد با نقص ایمنی هنوز در حاله ای از ابهام و وجود دارد و اثبات ارتباط این ویروس در بیماران با نقص ایمنی تحت پیوندهای کبد، کلیه، قلب و مغز استخوان در عفونت هم زمان با HCV و HBV، نیازمند مطالعات وسیع تر و اصولی تر می باشد (۱۲). تحقیقات اخیر نشان داده که همراهی ویروس GBV-C با HIV سود مند بوده و سبب پیش آگهی بهتر و پیشرفت آهسته تر بیماری به سمت ایدز و جواب بهتر به درمان می گردد (۱۳). برخی مطالعات احتمال تشدید بیماری کبدی و یا افزایش احتمال ابتلا به کانسر اولیه کبد (H.C.C) را با حضور GBV-C، بیشتر می دانند (۱۴).

هدف از این مطالعه راه اندازی یک روش حساس، کارا، ارزان و آسان جهت تشخیص عفونت با ویروس هپاتیت G (GBV)، می باشد. برای این منظور، از روش RT-Nested PCR و با کمک دو جفت آغازگر اختصاصی برای جداسازی توالی 5'-UTR (5'-Un Translated Region) ویروس هپاتیت G (GBV)، استفاده شده است.

روش بررسی

جمع آوری نمونه: راه اندازی و بهینه سازی روش تشخیص، روی ۵ نمونه مثبت از نظر وجود RNA ویروس GBV-C صورت گرفت. در این مطالعه سرم ۷۱ بیمار مبتلا به هپاتیت C، از مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران، جمع آوری و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

استخراج RNA: RNA ژنومی، از ۱۴۰ میکروولتر سرم، توسط کیت استخراج QIAamp Viral RNA Mini Kit، ساخت شرکت کیاژن آلمان، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس RNA های استخراج شده در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

برای کنترل کیت استخراج، RNA دو عدد کنترل مثبت و یک عدد کنترل منفی، که قبلاً مثبت و منفی بودن آنها ثابت شده بود، هم با روش دستی اسید گوانیدینوم ایزوتیوسیانات - فنل - کلروفرم و هم با کیت تجاری

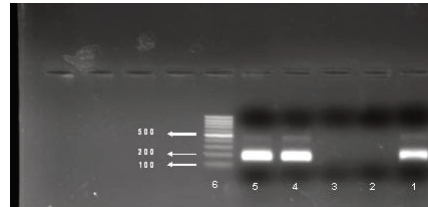
تشخیص ویروس هپاتیت G در بیماران هپاتیت مزمن C

تعیین توالی: در نهایت برای تایید نهایی محصول و اطمینان از صحت کار، تعداد ۱۲ عدد از نمونه های مثبت GBV-C، به صورت تصادفی انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شد. مراحل جداسازی محصول نهایی از ژل، توسط کیت بیونر (Bioneer) ساخت کشور کره جنوبی، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. تعیین توالی در آزمایشگاه Gottingen GmbH (SEQLAB) آلمان با دستگاه خودکار تعیین توالی ABI PRISM 3700 DNA analyzer automated sequencer (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA)، انجام شد.

یافته ها

ابتدا روش RT-Nested PCR برای تشخیص کیفی ویروس هپاتیت G، روی ۵ نمونه مثبت راه اندازی و بهینه سازی شد. از آنجایی که بهینه سازی واکنش PCR برای تشخیص میزان کم ژنوم ویروس در نمونه بالینی بسیار حائز اهمیت است، در این مطالعه رقت های مختلف محصولات مرحله اول PCR از ۱ میکرولیتر تا ۵ میکرولیتر، مقادیر متفاوت از یون کلرید منیزیم از ۰/۵ میکرومولار تا ۳ میکرومولار، تعدادهای متفاوت سیکل (۲۰، ۲۵ و ۳۰ سیکل) هم در دور اول و هم در دور دوم PCR، دماهای اتصال مختلف در مرحله دوم PCR با کمک شیب دمایی از ۵۱ درجه سانتی گراد تا ۶۹ درجه سانتی گراد و استفاده از غلظت های متفاوت (۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در دسی لیتر) آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) در ۳ دمای متفاوت اتصال (۵۳، ۶۴ و ۶۸ درجه سانتی گراد) برای رفع باند اضافه بررسی شد و بهترین و مناسب ترین شرایط و مقادیر برای ایجاد یک محصول واضح و خالص انتخاب گردید. لازم به ذکر است که طی روند مطالعه از ابتدا تا پایان کار، جهت افزایش دقت و صحت، هم در مرحله استخراج و هم مرحله PCR، از کنترل های مثبت و منفی استفاده گردید. پس از آن کارایی این روش طراحی و بهینه سازی شده، روی سرم ۷۱ بیمار مبتلا به هپاتیت C (۵۵ نفر مرد و ۱۶ نفر زن)، آزمایش گردید. نمونه ها از مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران جمع آوری شد و مثبت بودن آنها از نظر HCV، با روش RT-Nested PCR تایید شده بود (۱۶). پس از انجام دقیق روش طراحی شده جهت تشخیص ژنوم ویروس GBV-G، مشخص گردید که از ۷۱ مورد افراد مبتلا به هپاتیت C مزمن، تعداد ۳۱ مورد آنها (۴۳/۶ درصد) از نظر عفونت با GBV-C نیز مثبت بودند، که از این تعداد ۲۵ مورد مرد و ۶ مورد آنها زن بودند. اطلاعات بالینی مربوط به بیماران، شامل جنس، گروه های سنی، ژنوتیپ های مختلف HCV (که قبلاً توسط روش RFLP در آزمایشگاه کیوان تهران انجام گردید)، شدت فیبروز و تغییرات ساختمانی کبد (Staging)، میزان التهاب، نکروز و سیروز کبدی (Grading) (که قبلاً در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان شریعتی تهران توسط سیستم Knodell Scoring انجام گردید) و در نهایت میزان فعالیت آنزیم های کبدی (AST, ALT) بر حسب واحد بین المللی بر لیتر (که قبلاً در آزمایشگاه

گرفت: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، تکرار ۳۰ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه. مقدار مواد استفاده شده و شرایط دمایی در مرحله دوم همانند مرحله اول بوده، جز غلظت آغازگرهای درونی (۰/۳۵ میکرولیتر)، غلظت الگو (۱ میکرولیتر)، دمای اتصال (۶۴ درجه سانتی گراد) و تعداد تکرار سیکل که ۲۵ سیکل بوده است. ژل الکتروفورز: ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله دوم PCR با ۲ میکرولیتر از بافر نمونه گذاری (Loading Buffer) 6X، مخلوط و روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide)، منتقل گردید. پس از آن ژل در بافر TBE 1X (Tris-borate-EDTA)، به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید. (شکل ۲).



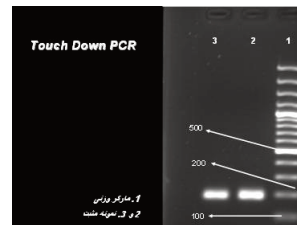
شکل ۲: محصول نهایی واکنش PCR، در دور دوم

۱، ۴ و ۵: نمونه های مثبت از نظر وجود GBV-C

۲ و ۳: نمونه های منفی از نظر وجود GBV-C

۶: نشانگر 100 bp

Touch Down PCR: همان طور که در شکل ۱ و ۲ دیده می شود پس از اتمام دو مرحله PCR، در نمونه های مثبت علاوه بر باند مورد نظر یک باند غیر اختصاصی نیز در بالای باند اصلی مشاهده شد، لذا از روش Touch Down PCR در مرحله دوم PCR، استفاده شد. Touch Down PCR روشی است که در آن PCR ابتدا از دمای بالا شروع و در ادامه به تدریج دمای اتصال کاهش می یابد، بدین ترتیب فقط محصول خالص اولیه تولید می شود (۱۵)، در این مطالعه جهت انجام Touch Down PCR دمای اتصال از ۷۲ درجه سانتی گراد شروع گردید و به تدریج تا ۶۲ درجه سانتی گراد رسید. با این روش بدون کاهش میزان محصول اصلی، باند غیر اختصاصی حذف شد (شکل ۳).



شکل ۳: محصول نهایی واکنش با روش Touch Down PCR

۱: نشانگر 100 bp

۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر وجود GBV-C

انسان را آلوده می کند (۱۹). ویروس هپاتیت G (GBV-C)، یک ویروس شایع بوده، که پراکندگی آن در جوامع مختلف، متفاوت می باشد (از ۴-۵٪ درصد در آمریکای شمالی، اروپا و ژاپن تا ۱۸/۹ درصد در برخی از کشورهای آفریقایی) (۲۰ و ۲۱). این ویروس دارای اثرات منفی در ماندگاری عضو پیوندی در گیرندگان کبد، کلیه و مغز استخوان می باشد و سبب بروز علائم بالینی خاص در گیرندگان پیوند می شود (۲۱ و ۲۲). امروزه بیشترین بحثی که در مورد این ویروس مطرح می باشد، مساله همراهی آن با دیگر عفونت های ویروسی مهم از جمله HBV، HCV و HIV است، که آیا در حالت همراهی با آنها اثری روی عواقب این ویروس ها و بیماری های مرتبط با آنها دارد یا خیر؟ و همین امر لزوم تشخیص دقیق و کاربردی این ویروس بیشتر می کند. در رابطه با عفونت مشترک GBV-C با HCV یا HBV نتایج متناقضی گزارش شده است (۱۲ و ۲۳) و مطالعات تکمیلی بیشتری در حال انجام می باشد. تعدادی از مطالعات نشان دادند که آلودگی مشترک GBV-C و HIV می تواند سبب پیشرفت آهسته تر بیماری به سمت ایدز و کاهش مرگ و میر این بیماران گردد (۱۱ و ۱۳ و ۲۸-۲۴). هم چنین نشان داده شده که در این حالت بیماران به درمان ضد رترو ویروسی (HAART) بهتر پاسخ می دهند (۲۶ و ۲۹، ۳۰) و حتی دیده شده که میزان تکثیر HIV در محیط In vivo هم به نسبت کمتر شده است (۱۱). گفتنی است برخی از مطالعات صورت گرفته نیز نتوانستند این اثرات مفید ویروس GBV-C را بر روی HIV ثابت کنند (۳۱ و ۳۳). هم چنین دیده شده در بیمارانی که GBV-C به عفونت دوگانه HCV و HIV افزوده می شود، بیماری کبدی ناشی از HCV کاهش می یابد (۲۳ و ۳۴). ممکن است ژنوتیپ های مختلف GBV-C در جات متفاوتی از محافظت علیه HIV در حالت همراهی با این ویروس، ایجاد کنند (۳۵).

از روش های سرولوژی جهت تشخیص GBV-C، جستجوی آنتی بادی علیه پروتئین پوششی E2 این ویروس می باشد (۳۶ و ۳۷). آنتی E2 به عنوان نشانه پاکسازی ویروس در نظر گرفته می شود و آلودگی قبلی با این ویروس را نشان می دهد (۳۸). هدف اصلی این پژوهش، راه اندازی یک روش مولکولی حساس، دقیق، آسان و ارزان جهت تشخیص ژنوم ویروس هپاتیت G (C-GBV)، بوده است. برای این منظور ناحیه 5'-UTR ویروس GBV-C توسط آغازگرهای اختصاصی و طی دو مرحله PCR شناسایی شد. تشخیص ویرمی توسط شناسایی و تکثیر ناحیه ای از ژنوم این ویروس که حفاظت شده (Conserve) است با روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی، میسر می باشد. در مطالعات اولیه جهت تشخیص ژنوم این ویروس، از آغازگرهایی برای نواحی غیر ساختمانی ژنوم مثل NS3 و NS5a استفاده می شد (۳۹-۴۱). ولی امروزه در بیشتر مطالعات انجام شده از آغازگرهایی استفاده شده که منطقه حفاظت شده ای از ناحیه 5'-UTR این ویروس را شناسایی و تکثیر می نماید (۱۱ و ۲۸ و ۴۵-۴۲). در این پژوهش برای افزایش دقت و کارایی، روش PCR دوگانه (Nested PCR)، به کار گرفته

بیوشیمی بیمارستان شریعتی تهران با دستگاه هیتاچی ۷۱۷ و با کیت پارس آزمون ساخت کشور ایران انجام گردید) و هم چنین نتایج به دست آمده، که چه تعداد از این گروه ها فقط مبتلا به HCV، و چه تعداد دارای عفونت هم زمان HCV-C، GBV می باشند، به طور کامل در جدول ۲ درج شده است. در این پژوهش در نهایت برای تایید نهایی محصول و اطمینان از صحت کار، تعداد ۱۲ عدد از نمونه های مثبت GBV-C، به صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی گردیدند. آنالیز جواب های حاصله از تعیین توالی نمونه های ارسالی، صحت روش به کار گرفته شده را تایید نمود. سپس به منظور شناسایی ژنوتیپ نمونه های انتخاب شده و مقایسه آن با سایر ایزوله های GBV-C، اقدام به آنالیز توافقی ترادفی، محاسبه فاصله ژنتیکی آن با ایزوله های مرجع و در نهایت رسم درخت فیلوژنیک بر اساس این داده ها نمودیم. نتایج حاصله به طور جالبی نشان دادند که تمامی نمونه های انتخابی جهت تعیین توالی، از نوع ژنوتیپ ۱ این ویروس یعنی ژنوتیپ شایع در کشورهای اروپایی و آمریکایی بودند، در صورتی که در مطالعات گذشته ژنوتیپ ۳ این ویروس به عنوان ژنوتیپ آسیایی معرفی شده بود (۱۷، ۱۸).

جدول ۲: اطلاعات بالینی و دموگرافیک مربوط به بیماران و نتایج حاصله

اطلاعات مربوط به بیماران	کل بیماران	بیماران فقط مبتلا به HCV	بیماران مبتلا به عفونت همزمان GBV-C, HCV
جنس	۵۵	۳۰	۲۵
مرد	۵۵	۳۰	۲۵
زن	۱۶	۱۰	۶
گروه های سنی بیماران (بر حسب سال)			
۱۷-۲۷	۱۳	۷	۶
۲۸-۳۷	۲۴	۱۳	۱۱
۳۸-۴۷	۲۲	۱۴	۸
۴۸-۵۷	۱۲	۶	۶
1a	۳۰	۱۹	۱۱
3a	۲۸	۱۸	۱۰
1b	۵	۱	۴
4	۱	۱	۰
1a/1b	۵	۱	۴
1a/3a	۲	۰	۲
۰	۱۴	۸	۶
۱	۲۶	۱۵	۱۱
۲	۱۹	۱۱	۸
۳	۹	۴	۵
۴	۳	۲	۱
۱-۳	۹	۴	۵
۴-۸	۵۴	۳۴	۲۰
۹-۱۲	۷	۲	۵
۱۳-۱۸	۱	۰	۱
میانگین فعالیت آنزیم AST (واحد در لیتر)	۵۰	۵۱	۴۹
میانگین فعالیت آنزیم ALT (واحد در لیتر)	۶۸	۷۹	۵۷

بحث

GB ویروس ها شامل ویروس های GBV-A، GBV-B و GBV-C می باشد که انواع A و B آن بومی میمون ها بوده ولی نوع C آن عموماً

(۵۸) گزارش شده است. مطالعات جداگانه دیگری نشان دادند که ۱۲/۹ درصد از بیماران تالاسمی، ۸/۸ درصد از معناتان تزریقی و ۱ درصد از اهداکنندگان خون در ایران از نظر وجود ژنوم GBV-C مثبت بوده اند (۵۹)، و شیوع این ویروس در افراد با احتمال خطر بالا (مبتلایان به تالاسمی، هموفیلی و بیماران همودیالیزی)، تقریباً ۳ برابر افراد معمولی در ایران می باشد (۶۰).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص گردید که روش راه اندازی شده، علاوه بر ارزان بودن و دقیق بودن از کارایی بسیار خوبی برای تشخیص مولکولی عفونت ویروس هپاتیت G (GBV-C)، برخوردار می باشد. هم چنین با به کارگیری این روش روی نمونه های افراد مبتلا به هپاتیت C مزمن، مشخص گردید که میزان آلودگی همزمان دو ویروس GBV-C، HCV، و HCV، در ایران بسیار بالا می باشد. هم چنین با تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی مشخص گردید که ژنوتیپ غالب ویروس هپاتیت G (GBV-C)، در ایران، ژنوتیپ ۲ آن یعنی ژنوتیپ شایع در کشورهای اروپایی و آمریکایی می باشد.

شد. PCR دوگانه روشی است که در آن از دو جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر یک قطعه از ژن مورد نظر استفاده می شود. جفت اول توالی مورد نظر را در مرحله اول تکثیر می کند و جفت دوم به نواحی داخلی محصولات اولیه متصل شده و محصولات نهایی را تکثیر می نماید، بنابراین حساسیت و اختصاصیت افزایش می یابد. هدف عمده این روش آن است که در صورت تکثیر نابه جا یا اشتباهی در مرحله اول، آن توالی دیگر در مرحله دوم تکثیر نشود. از مزایای روش PCR دوگانه (Nested PCR)، افزایش قابل ملاحظه حساسیت و هم چنین ویژگی تست می باشد، هم چنین نیاز به تاییدهای بعدی در این روش کمتر می باشد، به دلیل این که محصول مرحله دوم، تاییدی بر صحت محصول تکثیر یافته در مرحله اول می باشد (۴۶ و ۴۷).

با بررسی مطالعات دیگر در این زمینه، و با توجه به این که ۴۳/۶ درصد از بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت C مزمن، از نظر ژنوم GBV-C هم مثبت بودند، به نظر می رسد که همراهی این دو ویروس در ایران به مراتب بیشتر می باشد. تاناکا* و همکاران میزان عفونت هم زمان این دو ویروس را ۱۱ درصد نشان دادند (۴۸)، آلتز** و همکاران در مطالعه ای این میزان را ۲۰ درصد نشان دادند (۴۹). هم چنین مارتینول***، فوچت****، یان جی*****، سولدا***** و کوئیدوس***** و همکاران در مطالعاتی جداگانه میزان آلودگی هم زمان GBV-C و HCV را به ترتیب ۲۱ درصد، ۲۴/۴ درصد، ۳۱/۵ درصد، ۲۱ و ۱۹ درصد نشان دادند (۵۴-۵۰). البته در مطالعه دیگری در ایران، که در گذشته روی یک تعداد کمتری از بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن انجام شده بود، همراهی این دو ویروس ۴۰ درصد گزارش گردید (۵۵). بیشتر مطالعات انجام شده روی GBV-C در ایران بر روی بیماران مبتلا به HIV صورت گرفته، که میزان عفونت هم زمان این دو این ویروس در مطالعات مختلف ۱۰/۹۷ درصد (۵۶)، ۱۱/۳ درصد (۵۷) و ۱۵/۵ درصد

* Tanaka
** Alter
*** Martinol
**** Feucht
***** Yan Jie
***** Sauleda
***** Quidos

REFERENCES

- Hinrichsen H, Leimenstoll G, Stegen G, Schrader H, Folsch UR, Schmidt WE. Prevalence of and risk factors for hepatitis G (HGV) infection in haemodialysis patients: a multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 271-275.
- Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, et al. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *The J Clin Invest* 1996; 97: 845-51.
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996; 48: 60-7.
- Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Nat Acad USA* 1995; 92: 3401-5.
- Stapleton JT. GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin liver Dis* 2003; 23:137-48.
- Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995; 69: 5621-30.
- Linnen J, Wages J, Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-8.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Med virol* 1997; 71: 7804-6.
- Bjorkman P, Naucler A, Winqvist N, Mushahwar I, Widell A. A case-control study of transmission routes for GB virus C/hepatitis G virus in Swedish blood donors lacking markers for hepatitis C virus infection. *Vox Sang* 2001; 81: 148-53.
- El-Zayadi AR, Abe K, Selim O, Naito H, Hess G, Ahdy A.

- Prevalence of GBV-C/hepatitis G virus viraemia among blood donors, health care personnel, chronic non-B non-C hepatitis, chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Egypt. *J Virol methods* 1999; 80: 53-8.
11. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 707-14.
 12. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol* 2005; 33: 257-66.
 13. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med* 2004; 350: 981-90.
 14. Yang JF, Dai CY, Chuang WL, Lin WY, Lin ZY, Chen SC, et al. Prevalence and clinical significance of HGV/GBV-C infection in patients with chronic hepatitis B or C. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 25-30.
 15. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4008.
 16. Shahzamani K, Sabahi F, Merat S, Rezvan H, Mirab Samiee S, Karimi Arzanani M. The use of a sensitive RT-Nested PCR method for detection of Hepatitis C virus. *Modares J Med Sciences* 2007; 10: 35-41.
 17. Lu L, Ng MH, Zhou B, Luo H, Nakano T, Robertson BH, et al. Detection and genotyping of GBV-C/HGV variants in China. *Virus Res* 2001; 73: 131-44.
 18. Smith DB, Basaras M, Frost S, Haydon D, Cuceanu N, Prescott L, et al. Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J General Virol* 2000; 81: 769-80.
 19. Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Buijk SL, Chalmers ML, et al. Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B, and GBV-C. *J Med Virol* 1996; 48: 329-38.
 20. Kaya H, Erdem F, Polat MF, Kiki I, GÜNDOĞDU M, ÖZÇYÇEK F. Prevalence of Hepatitis G Virus in Blood Donors and Recipients. *Turk J Haematol* 2003; 20: 85-90.
 21. De Filippi F, Lampertico P, Soffredini R, Rumi MG, Lunghi G, Aroldi A, et al. High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 477-9.
 22. Kallinowski B, Seipp S, Dengler T, Klar E, Theilmann L, Stremmel W. Clinical impact of hepatitis G virus infection in heart and liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2002; 34: 2288-91.
 23. Berzsenyi MD, Bowden DS, Kelly HA, Watson KM, Mijch AM, Hammond RA, et al. Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection. *Gastroenterology* 2007; 133: 1821-30.
 24. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med* 2006; 7: 173-80.
 25. Baggio-Zappia GL, Hernandez Granato CF. HIV-GB virus C co-infection: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 12-9.
 26. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001; 345: 715-24.
 27. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis* 1999; 179: 783-9.
 28. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med* 2000; 132: 959-63.
 29. Antonucci G, Girardi E, Cozzi-Lepri A, Capobianchi MR, Morsica G, Pizzaferrari P, et al. Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naive HIV-infected individuals. *Antivir Ther* 2005; 10: 109-17.
 30. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med* 2006; 7: 25-31.
 31. Birk M, Lindback S, Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2002; 16: 2482-5.
 32. Bjorkman P, Flamholz L, Naucler A, Molnégren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 2004; 18: 877-86.
 33. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, Boeser-Nunnink B, Geskus RB, Lange JM, et al. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* 2005; 191: 678-85.
 34. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK, Revill PA. GB virus C genotype 2 predominance in a hepatitis C virus/HIV infected population associated with reduced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1407-10.
 35. Muerhoff AS, Tillmann HL, Manns MP, Dawson GJ, Desai SM. GB virus C genotype determination in GB virus-C/HIV co-infected individuals. *J Med Virol* 2003; 70: 141-9.
 36. Dille BJ, Surowy TK, Gutierrez RA, Coleman PF, Knigge MF, Carrick RJ, et al. An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *J Infect Dis* 1997; 175: 458-61.
 37. Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, Schlueter V, Ofenloch-Haehnle B, Hess G, et al. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997; 349: 318-20.
 38. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborski J, et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis* 1998; 177: 539-42.
 39. Bogard M, Buffet-Janvresse C, Cantaloube JF, Biagini P, Duverlie G, Castelain S, et al. GEMHEP multicenter quality control study of PCR detection of GB virus C/hepatitis G virus RNA in serum. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3298-300.
 40. Kunkel U, Hohne M, Berg T, Hopf U, Kekule AS, Frosner G, et al. Quality control study on the performance of GB virus C/hepatitis G virus PCR. *J Hepatol* 1998; 28: 978-84.

41. Lefrere JJ, Ferec C, Roudot-Thoraval F, Loiseau P, Cantaloube JF, Biagini P, et al. GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individuals and in immunocompetent individuals. *J Med Virol* 1999; 59: 32-7.
42. Abu Odeh RO, Al-Moslih MI, Al-Jokhdar MW, Ezzeddine SA. Detection and genotyping of GBV-C virus in the United Arab Emirates. *J Med Virol* 2005; 76: 534-40.
43. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, Mo T, Wynhoven B, Hogg RS, et al. No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16: 1929-33.
44. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis* 1998; 177: 1723-6.
45. Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003; 187: 504-7.
46. Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology* 1991; 14: 51-5.
47. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2937-45.
48. Tanaka E, Alter HJ, Nakatsuji Y, Shih JW, Kim JP, Matsumoto A, et al. Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1996; 125: 704-43.
49. Alter HJ. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *N Engl J Med* 1996; 334: 1536-7.
50. Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Knodler B, Schroter M, Nolte H, et al. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 767-8.
51. Martinot M, Marcellin P, Boyer N, Detmer J, Pouteau M, Castelnau C, et al. Influence of hepatitis G virus infection on the severity of liver disease and response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1997; 126: 874-81.
52. Quiros E, Piedrola G, Maroto MC. GBV-C RNA presence in several high-risk groups of Spain. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 617-9.
53. Sauleda S, Reesink HJ, Esteban JI, Hess G, Esteban R, Guardia J. Profiles of GBV-C/hepatitis G virus markers in patients coinfecting with hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999; 59: 45-51.
54. Yan J, Dennin RH. A high frequency of GBV-C/HGV coinfection in hepatitis C patients in Germany. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 833-41.
55. Zali MR, Mayumi M, Raoufi M, Nowroozi A. GBV-C infection among patients with hepatitis C virus in the Islamic Republic of Iran: a preliminary report. *East Mediterr Health J* 1999; 5: 1030-4.
56. Ramezani A, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Banifazl M, Eslamifar A, et al. Frequency of hepatitis G virus infection among HIV positive subjects with parenteral and sexual exposure. *J Gastrointestin Liver Dis* 2008; 17: 269-72.
57. Hekmat S, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Bahramali G, Banifazl M, et al. Frequency and genotype of GB virus C among Iranian patients infected with HIV. *J Med Virol* 2008; 80: 1941-6.
58. Haji Molla Hoseini M, Pourfathollah AA, Mohraz M, Soheili Z, Amini S, Aghaiepour M, et al. Evaluation of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV/GBV-C and HIV/HCV coinfecting patients: a preliminary study. *Arch Med Res* 2007; 38: 868-75.
59. Amini S, Andalibi Mahmoodabadi S, Lamian S, Joulaie M, Mahmoodi Farahani M. Prevalence of Hepatitis G virus (HGV) in High-Risk Groups and Blood Donors in Tehran, Iran. *Iranian J Publ Health* 2005; 34: 41-6.
60. 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: 282-6.

Detection of Hepatitis G virus(GBV-C), in chronic Hepatitis c Patient,by RT-Nested PCR

Ghanbari R^{1,4}, Ravanshad M², Hosseini SY¹, Shahzamani K^{3,4}

¹Researcher, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

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

³Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Iran.

⁵Researcher, Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background: Hepatitis G virus (GBV-C) is a single strand RNA positive virus and is a member of flaviviridae family. Infection with the virus is prevalent and has worldwide distribution. Accurate diagnosis of the virus is very important, because of co-infection with other important viruses like HCV, HBV and HIV, it may influence on pathogenesis, disease progression and response to viral therapy.

Materials and Methods: In the current investigation a sensitive and accurate RT-Nested PCR for isolation and detection of 5'-UTR sequences of Hepatitis G virus (GBV-C) was developed and applied. First genome of the virus was extracted and then, by Reverse Transcription method, cDNA was synthesized. Then, by use of a double stage PCR and two pairs of specific primers, the specified region of the virus genome was amplified and the final product was visualized on agarose gel electrophoresis.

Results: Based on five positive samples, the method was developed and optimized. Then, by use of the developed method, 71 sera samples from chronic HCV infected patients, was checked for Hepatitis G virus (GBV-C). Finally, it was shown that 31(43.6%) patients were positive for Hepatitis G virus.

Conclusion: Based in the results in the current study, it was shown that the developed assay has acceptable performance for diagnosis of Hepatitis G virus infection. Also it was concluded that the infection rate among chronic HCV infected patients is high.

Keywords: Nested PCR, RT-PCR, Hepatitis G virus, 5'-UTR

Govareh/ Vol. 14, No.3, Autumn 2009; 153-160

Corresponding author:

Department of Virology, Faculty of Medical Sciences,

Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Telefax : +98-21-82883836

E-mail: Ravanshad@modares.ac.ir

Received: 16 Dec. 2009 Edited: 22 Feb. 2010

Accepted: 23 Feb. 2010