

آنالیز مولکولی ویروس هپاتیت دلتا

الهه تاج بخش^{۱*}، فاطمه خداوردی پور^۱، نغمه میرابوالقاسمی^۱

۱. گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده ی مسئول: ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

ویروس هپاتیت دلتا، ویروس RNA دار ناقصی است که برای عملکرد آن حضور ویروس هپاتیت B ضروری است. این ویروس می‌تواند منجر به بیماری کبدی حاد و مزمن شود. سویه‌های HDV به ۷ ژنوتیپ و ۸ شاخه طبقه بندی شده‌اند. میزان شیوع عفونت HDV در اهداکنندگان خون ایران از ۲/۴ تا ۱۰ درصد متفاوت است. هدف از این مطالعه مقایسه فیلوژنتیک ویروس هپاتیت دلتای جدا شده از بیماران HBsAg مثبت شهرستان شهرکرد با سایر نقاط دنیا می‌باشد. در این مطالعه ۳۵۰ نمونه سرمی از افراد مبتلا به هپاتیت B، از سازمان انتقال خون شهرستان شهرکرد تهیه شد. در این تحقیق RNA ویروس هپاتیت دلتا با استفاده از کیت RNX Plus ساخت شرکت سیناژن، ایران استخراج گردید. پس از ساخت cDNA با استفاده از کیت RT PreMix ساخت شرکت بایونر^۱ آلمان نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت تخلیص PCR ساخت شرکت راج^۲ آلمان تخلیص شدند و جهت تعیین توالی قطعه ۴۲۱ جفت بازی به شرکت ماکروژن^۳ کره ارسال گردیدند. سپس ۲ نمونه مثبت مورد نظر با استفاده از نرم افزار کلستال ایکس^۴ با توالی‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی NCBI مقایسه و بعد از تعیین میزان مشابهت، درخت فیلوژنی حاصله به کمک نرم افزار ان جی پلات^۵ ترسیم گردید. توالی HDVAg ایزوله‌های ایرانی در این مطالعه با ۱۵ توالی از ایزوله‌های HDV از کشورهای مختلف مقایسه شد. نمونه‌های مورد مطالعه دارای ۹۹/۷-۹۹/۱ درصد قرابت با توالی‌های این ویروس از کشورهای جنوب شرقی آسیا (چین و تایوان) بودند. بر پایه مطالعات قبلی می‌توان این ویروس‌ها را در شاخه‌ی ژنوتیپ II ویروس HDV قرار داد. **کلمات کلیدی:** ژنوتیپ II ویروس، قرابت فیلوژنتیک، ویروس هپاتیت دلتا.

^۱- Bioneer

^۲- Roche

^۳ Macrogen

^۴- Clustal X

^۵- Njplot

مقدمه

عفونت با *HDV* در سراسر دنیا وجود دارد اما آمار دقیقی از شیوع و بروز آن در دسترس نیست که این امر ناشی از آمار نادرست و یا با تاخیر در ارائه آماده می‌باشد (۱-۳). در سراسر دنیا ۱۵ میلیون نفر به *HDV* آلوده می‌باشند. ویروس دلتا هپاتیت به قطر ۳۶ نانومتر شامل یک ژنوم RNA و ۷۰ کپی از پروتئین نوکلئوکپسید ویروسی (آنتی ژن هپاتیت دلتا) می‌باشد. که توسط آنتی ژن‌های سطحی کمکی *HBV*^۵ پوشیده می‌شوند و به عنوان کوچک‌ترین پاتوژن انسانی معروف می‌باشد (۴). پوشش پروتئینی ویروس هپاتیت B برای ایجاد عفونت زایی ویروس هپاتیت D ضروری است. برای ایجاد عفونت توسط ویروس *HDV* بیان ژن‌های Pre-S1 و Pre-S2 ویروس هپاتیت B ضروری می‌باشد زیرا این ویروس، هپادنا ویروس‌های مختلف را تحت شرایط آزمایشگاهی به عنوان کمکی استفاده کرده و در هر مورد، روکش *HDV* دارای مشخصه‌های فیزیکی و آنتی ژنی از ویروس کمکی می‌باشد (۴). ویروس هپاتیت D در سرتاسر جهان یافت می‌شود ولی بیشترین میزان شیوع آن در میان ایتالیایی‌ها، افرادی که ترانسفیوزهای متعدد داشتند و افرادی که در تماس نزدیک با آن‌ها بوده‌اند گزارش گردیده است. دوره نهفتگی از ۲ تا ۱۲ هفته متغیر می‌باشد. این دوره در حاملین *HBV* که با عامل دلتا آلوده می‌شوند نسبت به افراد حساسی که هم‌زمان با هر دو عامل *HBV* و دلتا آلوده می‌گردند کوتاه تر است. عفونت با عامل دلتا را می‌توان از طریق شناسایی IgM ضد دلتا طی مرحله حاد و یا مزمن بیماری تشخیص داد. افرادی که در عفونت با عامل دلتا بهبود می‌یابند در برخورد با این عامل یا *HBV* مصون می‌باشند (۵). آلودگی به *HDV* توزیع جهانی دارد. اما دو الگوی اپیدمیولوژیک برای آن وجود دارد. در کشور های مدیترانه ای عفونت *HDV* در افراد مبتلا به هپاتیت B اندمیک می باشد

و عمدتاً از طریق غیر پوستی منتقل می شود. در مناطق غیر اندمیک، ایالات متحده و اروپای شمالی، عفونت *HDV* منحصر به افراد در معرض خون و فرآورده های خونی، معتادین به مواد مخدر و مبتلایان به هموفیلی است. در مقیاس جهانی عفونت *HDV* رو به کاهش است (۶). ویروس دلتا دارای یک سروتایپ و هفت ژنوتایپ می‌باشد. بر اساس توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌های I, II و III فراوان ترین هستند، بدین ترتیب که ژنوتایپ III در آمریکای جنوبی و بیشتر در بومیان یوپکا کشور ونزوئلا شیوع دارد و موجب بیماری‌های شدید کبدی می‌گردد. همین ژنوتایپ در منطقه سفلی رودخانه آمازون بیماری تب سیاه آمازون را ایجاد می‌کند که یک نوع هپاتیت وخیم از این ویروس می‌باشد. ژنوتایپ II ویروس دلتا بیشتر در آسیای شرقی با سیری کندتر و بیماری تا حدودی سبک تر را تولید می‌کند و ژنوتایپ I در اروپا و آمریکای شمالی شایع است که بیماری تولید شده غالباً برق آسا و یا سیروز پیشرونده با سیر سریع را موجب می‌شود (۷). از آن‌جا که *HDV* در ایران اندمیک می‌باشد و بیماران با عفونت مزمن *HDV* در خطر پیشرفت به سمت نارسایی کبدی قرار دارند (۸،۳). هم‌چنین از آنجا که آماری از شیوع *HDV* در شهرستان شهرکرد موجود نیست بر آن شدیم تا این تحقیق را در این شهرستان انجام دهیم.

مواد و روش ها

تعداد ۳۵۰ نمونه سرمی (در حجم حدود ۳ میلی لیتر) از افراد مبتلا به هپاتیت B (HBs Ag) که قبلاً آلودگی آن به دو روش سرمی الایزا و وسترن بلات تأیید شده بود از سازمان انتقال خون شهرستان شهرکرد تهیه و تا زمان انجام آزمایش در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. با توجه به این که ویروس هپاتیت D یک ویروس RNA دار است جهت استخراج RNA از نمونه‌های سرم مورد مطالعه از کیت استخراج RNA (RNX-PLUS) ساخت شرکت سیناژن ایران طبق روش پروتکل استفاده شد. بعد از کیفیت سنجی RNA استخراج شده (با انجام

^۵ Hepatitis B Virus

^۶ Hepatitis Delta Virus

الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد)، RNA های آماده شده جهت ساختیگرولیتز از زوج پرایمرها (نشان داده شده در جدول (۱))، ۳ میکرولیتر cDNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه cDNA و ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز (سیناژن، ایران) تنظیم جهت ساخت cDNA از کیت RT PreMix (ساخت شرکت بایونر، آلمانی) جهت ارزیابی محصول PCR از ژل ۱/۵ درصد آگارز استفاده شد در طبق دستورالعمل کیت مربوطه استفاده شد. سپس جهت انجام آزماپلین ژل حاصله با دستگاه تصویر بردار از ژل (با تابش نور UV) مورد بررسی PCR، واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واحد ۵ میکرولیتر بافر PCR گرفت و نتیجه حاصله روی کاغذ حرارتی ثبت گردید (۹). ۱۰X ، ۰/۲ میلی مول منیزیم کلرید، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

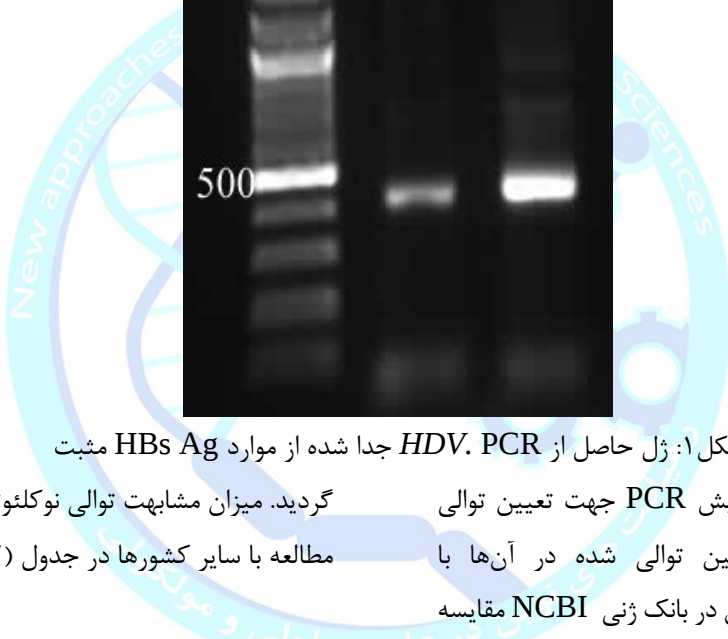
اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن
۴۲۱	۵'-TGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA-۳'	HDV F
	۵'-GGAGAGACGGGATCACCGAAGAAGGAAGGC-۳'	HDV R

L22065-South America, AF247965-Sweden, HF679406-France, M55042-Netherland, AF008420-USA (مقایسه و بعد از تعیین میزان مشابهت (با نرم افزار بیو ادیت)، درخت فیلوژنی حاصله به کمک نرم افزار ان جی پلات ترسیم گردید.

نتایج

از مجموع ۳۵۰ نمونه سرم مورد مطالعه در ۲ نمونه (۰/۵۷ درصد) آلودگی با ویروس HDV در روش RT-PCR مشاهده شد که ژل حاصل از آلودگی PCR مربوط به نمونه‌های مثبت شده در تصویر (۱) نشان داده شده است:

محصول PCR مربوط به ۲ نمونه مثبت در آزمایش PCR تخلیص و جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه ۴۲۱ جفت بازی تکثیر یافته در PCR (مربوط به ژن کد کننده آنتی ژن دلتا ویروس HDV به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. توالی تعیین شده از ۲ نمونه مورد نظر با استفاده از نرم افزار کلسنال ایکس با توالی‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی NCBI (JF694493-Iran, AF425644-Taiwan, U25667-China, AF309420-Japan, AJ309880-Russia, U81989-Ethiopia, U81988-Somalia, JX888135-Luxembourg, AB037949-Venezuela, KC590319-Brazil,



۲ نمونه مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی انتخاب و تعیین توالی شده در آن‌ها با سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی NCBI مقایسه گردید. میزان مشابهت توالی نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سایر کشورها در جدول (۲) آورده شده است:

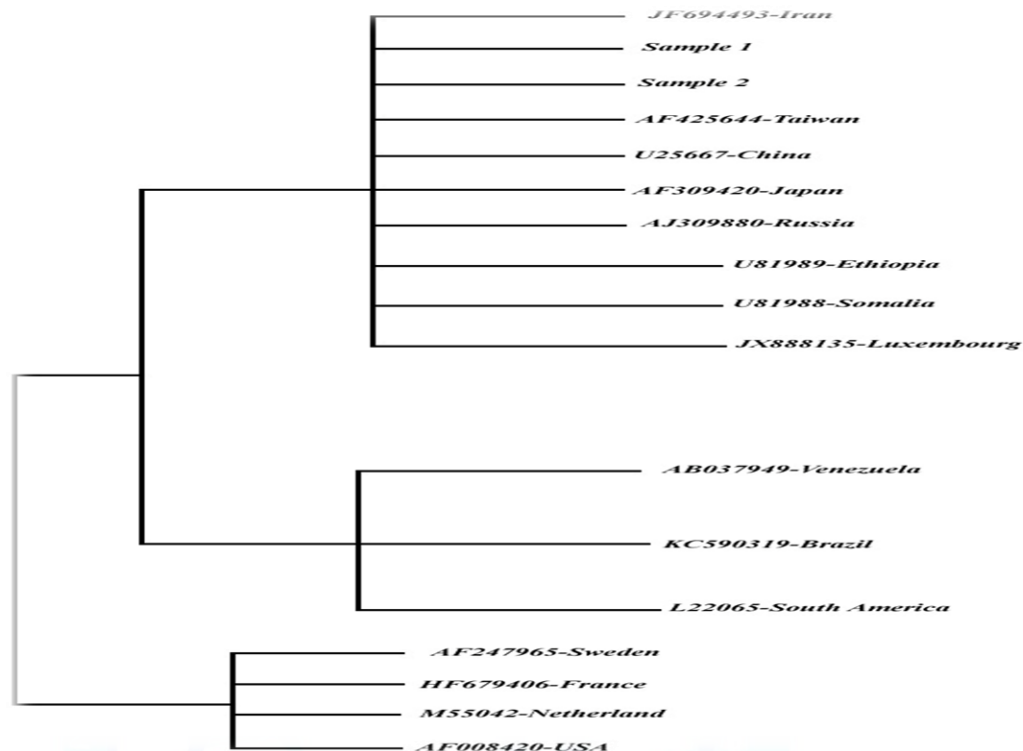
08420-US42-Netherl9406-Fran7965-Swed-South Am90319-Bra7949-Venezu135-Luxemb988-Somal989-Ethiop19880-Rus09420-Jap5667-Chin25644-Taiw94493-IraSample 2 Sample 1 Seq

0.929	0.93	0.931	0.931	0.939	0.94	0.942	0.948	0.95	0.952	0.964	0.969	0.975	0.971	0.991	0.99	ID	Sample 1
0.93	0.931	0.936	0.936	0.94	0.941	0.945	0.949	0.951	0.956	0.965	0.97	0.991	0.9	0.997	ID	0.99	Sample 2
0.927	0.93	0.93	0.93	0.938	0.94	0.94	0.95	0.951	0.953	0.963	0.968	0.982	0.981	ID	0.997	0.991	JF694493-Iran
0.924	0.926	0.929	0.938	0.96	0.945	0.958	0.962	0.97	0.972	0.972	0.998	1	ID	0.981	0.9	0.971	AF425644-Taiwan
0.922	0.925	0.927	0.939	0.962	0.946	0.956	0.965	0.972	0.971	0.97	0.996	ID	1	0.982	0.991	0.975	U25667-China
0.924	0.928	0.928	0.94	0.961	0.948	0.95	0.96	0.968	0.964	0.961	ID	0.996	0.998	0.968	0.97	0.969	AF309420-Japan
0.936	0.927	0.926	0.938	0.958	0.945	0.948	0.952	0.948	0.958	ID	0.961	0.97	0.972	0.963	0.965	0.964	AJ309880-Russia

0/932	0/921	0/921	0/936	0/954	0/944	0/944	0/951	0/94	ID	0/958	0/964	0/971	0/972	0/953	0/956	0/952	U81989-Ethiopia
0/936	0/92	0/92	0/932	0/95	0/938	0/942	0/948	ID	0/94	0/948	0/968	0/972	0/97	0/951	0/951	0/95	U81988-Somalia
0/928	0/919	0/912	0/94	0/948	0/932	0/938	ID	0/948	0/951	0/952	0/96	0/965	0/962	0/95	0/949	0/948	388135-Luxembourg
0/921	0/901	0/908	0/928	0/94	0/929	ID	0/938	0/942	0/944	0/948	0/95	0/956	0/958	0/94	0/945	0/942	3037949-Venezuela
0/92	0/897	0/899	0/92	0/935	ID	0/929	0/932	0/938	0/944	0/945	0/948	0/946	0/945	0/94	0/941	0/94	KC590319-Brazil
0/904	0/908	0/91	0/924	ID	0/935	0/94	0/948	0/95	0/954	0/958	0/961	0/962	0/96	0/938	0/94	0/939	2065-South America
0/921	0/913	0/921	ID	0/924	0/92	0/928	0/94	0/932	0/93	0/938	0/94	0/939	0/938	0/93	0/936	0/931	AF247965-Sweden
0/928	0/921	ID	0/921	0/91	0/899	0/908	0/912	0/92	0/921	0/926	0/928	0/927	0/929	0/93	0/936	0/931	HF679406-France
0/914	ID	0/921	0/913	0/908	0/897	0/901	0/919	0/92	0/921	0/927	0/928	0/925	0/926	0/93	0/931	0/93	155042-Netherland
ID	0/914	0/928	0/921	0/904	0/92	0/921	0/928	0/936	0/932	0/936	0/924	0/922	0/924	0/927	0/93	0/929	AF008420-USA

آمریکا (AF008420-USA) با ۹۲/۹ درصد قرابت تعیین شد. ترسیم درخت فیلوژنی (تصویر ۴-۲) این موضوع را تایید نمود و همان گونه که مشهود است نمونه‌های مورد مطالعه در شاخه نمونه‌های ایران و کشورهای آسیای جنوب شرقی قرار گرفته ولی نمونه‌های آمریکا و کشورهای اروپایی در شاخه ای جداگانه قرار گرفته اند.

همان گونه که مشهود است، میزان تفاوت ژنتیکی بین ۲ نمونه مورد مطالعه با سکانس‌های ثبت شده ویروس HDV از سایر کشورها و ایران بین ۷/۱-۰/۳ درصد بود که در این میان بیشترین قرابت ژنتیکی بین سکانس تعیین شده در این مطالعه با نمونه ایران (JF694493-Iran) با ۹۹/۷ درصد قرابت و نمونه چین (U25667-China) با ۹۹/۱ درصد قرابت و کمترین مشابهت بین توالی تعیین شده با کشور



نمودار ۱: درخت فیلوژنیک رسم شده براساس میزان قرابت نوکلئوتیدی ترسیم شده با نرم افزار ان جی پلات

بحث

عفونت با ویروس دلتا عفونتی است که در سراسر جهان دیده می‌شود ولی شیوع آن در نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت است. از ۳۵۰ میلیون نفر مبتلا به *HBV* در سراسر جهان ۵ درصد آن‌ها از عفونت توأم *HBV* و *HDV* رنج می‌برند. از نظر گسترش جغرافیایی مناطق جغرافیایی جهان را به ۳ گروه تقسیم کرده‌اند: نواحی با همه گیری بالا مانند نواحی آمازون در ونزوئلا، برخی از کشورهای آفریقایی، نواحی آندمیک مانند جنوب ایتالیا، یونان، کشورهای حوزه مدیترانه، بنگلادش و نواحی با شیوع کم مانند کشورهای پیشرفته که بین افراد با ریسک خطر بالا مانند معتادان به مواد مخدر تزریقی دیده می‌شود (۱۰). *RNA* ویروس تقریباً دارای ۱۷۰۰ نوکلئوتید می‌باشد و یک رشته منفرد حلقوی است که از نظر ساختمانی هیچ‌گونه شباهتی با ژنوم *HBV* ندارد. هتروژنیسته ویروس بالا بوده و *RNA* ویروس در هر فرد می‌تواند با فرد دیگر در توالی اسیدهای نوکلئیک متفاوت باشد. *HDAG* تنها

ویروس هپاتیت *D* برای اولین بار به عنوان یک آنتی ژن هسته‌ای جدید در هسته هپاتوسایت‌های کبدی بیماران مبتلا به *HBV* شناخته شد و با هپاتیت حاد شدید یا مزمن همراه بود. سپس این آنتی ژن را آنتی ژن دلتا نامیدند و از محصولات ژنی *HBV* محسوب کردند. بعداً فهمیدند که آنتی ژن دلتا با یک عامل قابل انتقال بیماری همراه بوده و از محصولات ژنوم *HBV* نیست. *HDAG* در کبد یا سرم بیماران به دو گونه یافت می‌شود که بر مبنای تعداد اسید آمینه یا وزن آن است. دلتا آنتی ژن کوچک با وزن ۲۴ هزار کیلو دالتون و دلتا آنتی ژن بزرگ با وزن ۲۷ هزار کیلو دالتون که در ۱۹ اسید آمینه تفاوت دارند و حاصل جمع دو نوع *mRNA* می‌باشند. *HDAG* در تشکیل ساختمان ویروس اهمیت داشته و در هسته سلول‌های کبدی جای می‌گیرد (۱۰).

پروتئینی است که توسط *HDV* ساخته می‌شود و جز داخلی ساختمان ویروس محسوب می‌شود (۱۰). ویروس دلتا دارای یک سروتایپ و هفت ژنوتایپ می‌باشد. بر اساس توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌های I، II و III فراوان‌ترین هستند، بدین ترتیب که ژنوتایپ III در آمریکای جنوبی و بیشتر در بومیان یوپکا کشور ونزوئلا شیوع دارد و موجب بیماری‌های شدید کبدی می‌گردد. همین ژنوتایپ در منطقه سفلائی رودخانه آمازون بیماری تب سیاه آمازون را ایجاد می‌کند که یک نوع هپاتیت سنگین این ویروس می‌باشد. ژنوتایپ II ویروس دلتا بیشتر در آسیای شرقی با سیری کندتر و بیماری تا حدودی سبک‌تر را تولید می‌کند و ژنوتایپ I در اروپا و آمریکای شمالی شایع است که بیماری تولید شده غالباً برق‌آسا و یا سیروز پیشرونده با سیر سریع را موجب می‌شود (۷).

در تحقیق انجام شده توسط بهزادیان^۱ و همکاران، برای اولین بار به طور کامل ژنوم ویروس هپاتیت دلتا ایران تعیین توالی گردید. ایزوله‌های ویروس *HDV* در ایران تقریباً طولی معادل ۱۶۷۶ نوکلئوتید دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ویروس هپاتیت دلتا در ایران، متعلق به ژنوتایپ I می‌باشد. در این تحقیق توالی کامل از این ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین شباهت با ایزوله‌های ایتالیایی نوع I (۹۲/۶ درصد)، وجود دارد که نشان دهنده روابط تکاملی میان این دو ایزوله می‌باشد، در حالی که کمترین شباهت با ایزوله‌های پرو نوع III وجود داشت (۱۱). در تحقیق انجام شده توسط اسماعیلی^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۹ که بر روی ۲۶ بیمار مبتلا به هپاتیت دلتا در تهران صورت گرفت، همه نمونه‌ها متعلق به ژنوتایپ I تشخیص داده شدند (۱۲). محبی^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به

هپاتیت دلتا انجام دادند که پس از بررسی فیلوژنتیکی مشخص کردند که همه نمونه‌ها متعلق به ژنوتایپ I ویروس می‌باشند (۵). تحقیقی که توسط عطاران^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص گردید که نمونه‌های مورد بررسی متعلق به گروه HDV I می‌باشند (۱۳). در تحقیق انجام شده توسط منصور^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۷۰۰ اهداکننده خون HBsAg مثبت در نواکشوت، موریتانی مشخص گردید که ژنوتایپ ۵ با ۱۰/۷ درصد و ژنوتایپ ۱ با ۸۹/۳ درصد شیوع بالایی در این منطقه داشتند (۱۴). لگال^۶ و همکاران در سال ۲۰۱۲ تحقیقی را در مرکز و شرق ترکیه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بر روی ۳۴ نمونه از بیماران *HBV/HDV* مثبت انجام دادند. بررسی فیلوژنتیکی قطعه ۱۲۸۰-۹۰۰ ژنوم *HDV* نشان داد که تمام سویه‌ها، متعلق به ژنوتایپ *HDV* I بودند (۱۵).

کیم^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۱ تحقیقی را در بین بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن به منظور بررسی شیوع عفونت همزمان با هپاتیت دلتا در کره جنوبی انجام دادند. این تحقیق بر روی ۹۴۰ بیمار انجام گرفت که فقط ۳ نفر از نظر Anti-*HDV* مثبت گزارش شد. تمامی موارد مثبت پس از بررسی فیلوژنتیکی متعلق به گروه HDV I بودند. (۱۶). در تحقیق انجام شده توسط فوپوپوگنی^۸ و همکاران در ۲۰۱۱ که بر روی ۲۳۳ کامرونی HBsAg صورت گرفت، RNA ویروس *HDV* از سرم افراد *HDV*-Ab استخراج گردید، در این بررسی از ۲۳۳ بیمار HBsAg مثبت ۴۱ مورد *HDV*-Ab مثبت تشخیص داده شدند که در ۲۵ مورد از آن‌ها RNA ویروس دلتا شناسایی گردید. آنالیز فیلوژنتیک انجام شده بر روی ۲۵ نمونه مورد نظر نشان داد که ۲۲ نمونه (۸۸)

^{۱۲} Mansour

^{۱۴} Le Gal

^{۱۵} Kim

^{۱۶} Foupouapouognigni

دوره ۲ شماره ۱ بهار ۱۴۰۳

^۱ Behzadian

^۲ Esmaeili

^{۱۱} Mohebbi

^{۱۲} Attaran

HDV-Ag مثبت تشخیص داده شدند که پس از بررسی آنالیز فیلوژنتیک مشخص گردید که ۱۴ ایزوله HDV متعلق به ژنوتیپ I و II می‌باشند (۲۳). تحقیق انجام شده توسط ساکواگاوا^{۲۳} و همکاران که در سال ۱۹۹۹ بر روی ۶ ژاپنی مبتلا به هپاتیت مزمن کبدی صورت گرفت، RNA HDV از هر ۶ نفر جدا گردید که پس از بررسی فیلوژنتیکی مشخص شد که ژنوتیپ II b این ویروس در منطقه اوکیناوا، ژاپن غالب است (۲۴).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنتی ژن دلتا از ۲ نمونه سرمی مثبت شده در شهرستان شهرکرد تعیین و قرابت فیلوژنی توالی تعیین شده با توالی‌های مثبت شده این ویروس در بانک ژنی مقایسه گردید که همان گونه که در قسمت نتایج آورده شده نمونه‌های مورد مطالعه دارای ۹۹/۷-۹۹/۱ درصد قرابت با توالی‌های این ویروس از کشورهای جنوب شرقی آسیا (چین و تایوان) بودند که بر پایه مطالعات قبلی می‌توان این ویروس‌ها را در شاخه ی ژنوتیپ II ویروس HDV قرار داد. اما شاید بتوان این تنوع ژنتیکی را بر اساس گسترش جغرافیایی ویروس توجیه کرد. از آنجایی که در ایران خصوصاً پس از پیروزی انقلاب اسلامی میزان مسافرت‌های خارجی به کشورهای آمریکایی و اروپایی در مقایسه با کشورهای آسیایی محدودتر شده است لذا به نظر می‌رسد که آلودگی با این ویروس در منطقه مورد مطالعه (شهرکرد) از کشورهای جنوب شرقی آسیا (که بیشتر مردها جهت کار به این کشورها خصوصاً ژاپن و کره وارد می‌شوند) آورده شده باشد در مجموع پیشنهاد می‌گردد که با نمونه‌گیری وسیع‌تر از قسمت‌های مختلف استان چهارمحال و بختیاری و

درصد) از استرین‌ها متعلق به ژنوتیپ I بودند (۱۷). در تحقیق انجام شده توسط کلیک^{۲۷} و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۹ بیمار ترکیه‌ای آلوده به HDV انجام شد. مشخص گردید که تمام نمونه‌ها متعلق به ژنوتیپ I هستند (۱۸). در تحقیق انجام شده توسط باروس^{۱۵} و همکاران که در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۱۳۳ برزیلی ناقل HBsAg مزمن انجام گرفت، پس از تعیین توالی مشخص گردید که ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ شایع می‌باشند (۱۹). در تحقیق انجام شده توسط گومز-گوا^{۱۶} و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۱۴ برزیلی مبتلا به هپاتیت برق آسا مشخص گردید تمام این بیماران از لحاظ داشتن HBV DNA و HDV RNA مثبت بودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی HDV نشان داد که همه موارد مثبت متعلق به ژنوتیپ III می‌باشند (۲۰). تحقیقی توسط موریاما^{۲۱} و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۳ ژاپنی مبتلا به هپاتیت B مزمن صورت گرفت. RNA HDV از سرم این افراد جدا گردید. پس از مقایسه توالی ژنومی HDV جدا شده از این منطقه با مناطق جغرافیایی هم جوار مشخص شد که ۸۰ درصد نمونه‌های Miyako، ژاپن متعلق به ژنوتیپ II b می‌باشند (۲۱). سنودی^{۲۲} و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۳ تحقیقی بر روی ۱۰۵ بیمار HBsAg مثبت انجام دادند که ۹ بیمار از نظر HDV-Ag مثبت گزارش شد که پس از استخراج RNA نوکلئوتیدهای ۸۵۳ تا ۱۲۶۵ سکانس شدند. در بررسی آنالیز فیلوژنتیک مشخص گردید که ۹ ایزوله HDV متعلق به ژنوتیپ I می‌باشند (۲۲). در تحقیق انجام شده توسط اوانیوشینا^{۲۳} و همکاران در سال ۲۰۰۱ که بر روی ۲۹ بیمار روسیه‌ای HBsAg مثبت صورت گرفت، ۱۴ بیمار از نظر

^{۲۱}Saady

^{۲۲}Ivaniushina

^{۲۳}Sakugawa

^{۲۷}Celik

^{۱۵}Barros

^{۱۶}Gomes-Gouvêa

^{۲۱}Moriyama

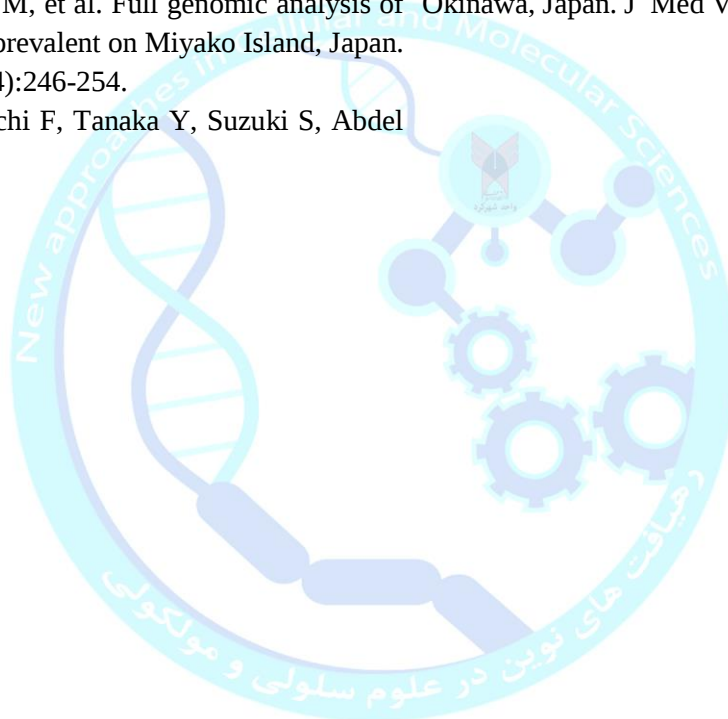
دقیق ویروس *HDV* در حال گردش در این منطقه تعیین گردد.

استان‌های همجوار (اصفهان و خوزستان) و تعیین توالی تعداد بیشتری از نمونه‌های مثبت و انجام روش‌های مولکولار بیولوژی نظیر RFLF و دیگر روش‌های ژنوتایپینگ، ژنوتیپ

منابع

- 1- Tassopoulos NC, Papaevangelous GJ, Sjogern MH. Roumeliotou- Karayannis A. natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterol.* 1987; 92(6): 1844-1850.
- 2- Pastore G, Santantonio T, Milella M. Anti-HBe-positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum; response to a 6. Month course of lymphoblastoid interferon. *J Hepatol.* 1992; 14(2): 221-225.
- 3- Taghvaei T, Khanlor Pour M, Mahdavi M, Tirgar Fakheri H, Maleki E, Khalilian A. Prevalence of Hepatitis Delta Virus in HBsAg-positive patients and to investigate the factors associated with it in the years 2007-8. *J Mazandaran Uni of Med Sci.* 2008; 67(10):102-106.
- 4- Gerin JL, Casey JL, Purcell RH. Fields – virology Hepatitis. Delta Virus; 2001; 4(2): 2458-2469.
- 5- Mohebbi SR, Zali N, Derakhshan F, Tahami A, Mashayekhi R, Amini-Bavil-Olyaei S, et al. Molecular Epidemiology of *Hepatitis Delta Virus (HDV)* in Iran: A Preliminary Report. *J Med Virol.* 2008; 80(12):2092–2099.
- 6- Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald EB. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. 2005: 1050-1100.
- 7- Panahi, M. *Hepatitis delta Virus*. *Med J Mashhad Univ Med Sci.* 2010; 53(2):117-122.
- 8- Rezvan H, Forouzandeh B, Taroyan S. A study on delta virus infection and its clinical Impact in Iran. *Infect.* 1990; 18(1): 26-28.
- 9- Alavian SM and Alavian SH. *Hepatitis D Virus Infection*; Iran, Middle East and Central Asia. *Hepatitis Montly.* 2005; 5(4):137-143.
- 10- Amini Kafi-abad S. Viral hepatitis diagnosis by laboratory methods. *Iranian Blood Transfus Organs*; 2007; 4(5): 23-112.
- 11- Behzadian F, Sabahi F, Karimi M, Sadeghizadeh M, Maghsoudi N, Forooshani RS, et al.. Molecular phylogenetic analysis of Iranian *HDV* completes genome. *Virus Genes.* 2005; 30(3):383-393.
- 12- Esmaeili R., Alavian SM, Hajibeigi B, Sabouri E, Edalat R., Adeli A. Phylogenetic Analysis of Twenty-Six Cases of *Hepatitis Delta Virus* Isolates in Tehran, Iran. *Hepat Mon.* 2009; 9(3):196-200.
- 13- Attaran MS, Sharifi Z, Hosseini SM, Samei S, Ataee Z. Prevalence of *hepatitis B* and *hepatitis D* coinfection in asymptomatic blood donors in Iran. *APMIS*; 2014. 122 (3):243-247.
- 14- Mansour W, Bollahi MA, Hamed CT, Brichler S, Le Gal F, Ducancelle A, et al.. Virological and epidemiological features of *hepatitis delta* infection among blood donors in Nouakchott, Mauritania. *J Clin Virol.* 2012; 55(1):12-16.
- 15- Le Gal F, Badur S, Hawajri NA, Akyüz F, Kaymakoglu S, Brichler S, et al. Current hepatitis delta virus type 1 (*HDV1*) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different *HDV1* origins. *Arch Virol.* 2012; 157(4):647-659.
- 16- Kim HS, Kim SJ, Park HW, Shin WG, Kim KH, Lee JH, et al. Prevalence and clinical significance of *hepatitis D virus* co-infection in patients with chronic hepatitis B in Korea. *J Med Virol.* 2011; 83(7):1172-1177.
- 17- Foupouapouognigni Y, Noah Noah D, Sartre MT, Njouom R. High Prevalence and Predominance of *Hepatitis Delta Virus* Genotype 1 Infection in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3):1162-1164.
- 18- Celik I, Karatayli E, Cevik E, Kabakçi SG, Karatayli SC, Dinç B, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of *hepatitis delta viruses* isolated from nine Turkish patients. *Arch Virol.* 2011; 156 (12):2215-2220.
- 19- Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Corrêa

- MC, et al. *Hepatitis Delta virus* genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Research*; 2011; 160(1-2):333-339.
- 20- Gomes-Gouvêa MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, et al. *Hepatitis B virus* and *hepatitis delta virus* genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Virol*. 2009; 90(11):2638-2643.
- 21- Moriyama M, Taira M, Matsumura H, Aoki H, Arakawa Y, Kaneko M, et al. Full genomic analysis of *hepatitis delta virus* prevalent on Miyako Island, Japan. *Intervirology*. 2005; 48(4):246-254.
- 22- Saady N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Abdel Aal A, Zaid M, et al. Genotypes and Phylogenetic Characterization of *Hepatitis B* and *Delta Viruses* in Egypt. *J Med Virol*. 2003; 70(4):529-536.
- 23- 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 Gen Virol*. 2001;82(11):2709-18.
- 24- Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, et al. *Hepatitis delta virus* genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol*. 1999; 58(4):366-372.



Molecular analysis of Hepatitis delta virus

Elahe Tajbakhsh^{1*}, Fatemeh Khodaverdipour¹, Naghmeh Mirabolghasemi¹
1. Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Hepatitis Delta Virus (HDV) is a defective RNA virus that requires the presence of Hepatitis B Virus (HBV) for its replication and function. HDV infection can result in both acute and chronic liver disease. HDV strains have been classified into seven genotypes and eight clades. The prevalence of HDV infection among blood donors in Iran ranges from 2.4% to 10%. The objective of this study was to perform a phylogenetic analysis of HDV isolates obtained from HBsAg-positive patients in Shahrekord, Iran, in comparison with isolates from other regions of the world. In this study, 350 serum samples were collected from HBV-infected individuals referred to the Blood Transfusion Organization in Shahrekord. HDV RNA was extracted using the RNX Plus kit (SinaClon, Iran). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the RT PreMix kit (Bioneer, Germany). PCR-positive samples were subsequently purified using the PCR Purification Kit (Roche, Germany), and a 421 base pair fragment was submitted for sequencing to Macrogen (South Korea). The sequences of two positive samples were aligned using ClustalX software and compared with reference sequences available in the NCBI GenBank database. Based on sequence similarity, a phylogenetic tree was constructed using the NJPlot software. The HDV antigen (HDVAg) sequences obtained from the Iranian isolates were compared with 15 representative HDV sequences from various countries. The studied isolates showed a high sequence similarity (99.1%–99.7%) with HDV strains reported from Southeast Asian countries, including China and Taiwan. Based on previous studies, these isolates can be classified within genotype II of HDV.

Keywords: genotype II HDV, *Hepatitis Delta Virus*, Similarity genetic.