مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره چهارم (پیاپی ۳۷) زمستان ۱۳۹۷
صفحات ۳۳۹-۳۳۲

Original Article

شناسایی جهش های ژن *NS5B* ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C در استان گیلان

لیلا اسدپور*[۱]، حمدالله رحیمی دوگاهه[۲]، مهناز هوشمند راد[۲]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۲] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: ویروس هپاتیت C عامل اصلی هپاتیت مزمن کبدی است که سالیانه باعث مرگ هزاران نفر در دنیا می گردد. پروتئین NS5B، RNA پلی مراز وابسته به RNA است که توسط ژن *NS5B* کد می شود و در همانندسازی ویروس نقش دارد. از جمله داروهای موثر در درمان این عفونت های ناشی از این ویروس مهارکننده های پروتئین NS5B می باشند. ظهور سویه های مقاوم به این داروها یک مانع بزرگ در موفقیت درمان می باشد. هدف از این مطالعه بررسی جهش های احتمالی در ناحیه NS5B ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C در استان گیلان است.

مواد و روش ها: RNA ژنومی ویروس از پلاسمای ۲۲۵ بیمار آنتی HCV مثبت استخراج و شناسایی مولکولی و تعیین سروتیپ آن به روش RT-PCR و تعیین توالی محصول انجام شد. پس از آن ژن *NS5B* در ۱۰ سویه دارای ژنوتیپ 1a تکثیر و به منظور شناسایی جهش ها توالی یابی گردید.

یافته ها: به ترتیب ژنوتیپ های 3a (۵۳/۳ درصد) و 1a (۳۶/۹ درصد) فراوان ترین ژنوتیپ های شناسایی شده در گیلان بودند. بر اساس نتایج توالی یابی، از میان ۱۰ سویه دارای ژنوتیپ 1a مورد بررسی در ۵ سویه ، ۷ نوع جهش بدمعنی در کدون های Q309، A327، S254، K304، N307، R250 و A334 شناسایی شد.

نتیجه گیری: ژنوتیپ 1a از ژنوتیپ های شایع ویروس هپاتیت C در گیلان می باشد. شناسایی جهش ها یا پلی مورفیسم مرتبط با مقاومت در ویروس هپاتیت C می تواند در بهینه سازی درمان و تعیین کارایی داروها در درمان هپاتیت C مفید باشد.

واژگان کلیدی: هپاتیت C، مقاومت دارویی، جهش *NS5B*.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹۷

مقدمه

ویروس هپاتیت C یک مشکل عمده بهداشتی در سراسر جهان می باشد و حدود ۱۷۰ میلیون نفر در دنیا به عفونت این ویروس مبتلا هستند و ۷۰۰ هزار نفر از بیماری های کبدی ناشی از این عفونت جان خود را از دست می دهند. این ویروس منجر به ایجاد هپاتیت حاد و مزمن، سیروز و کارسینوم سلول های کبدی می گردد (۱ و ۲).

ویروس هپاتیت C یک ویروس پوشش دار و دارای ژنومی از جنس RNA تک رشته ای با طول تقریبی ۹/۶ کیلو باز می باشد. این ویروس عضوی از خانواده فلاوی ویریده و جنس *هپاسی ویروس* است. ویروس هپاتیت C دارای توالی نوکلئوتیدی متغیر در طول ژنوم خود است و بر اساس مطالعات فیلوژنتیک به ۷ ژنوتیپ و حدود ۹۰ زیر تیپ تقسیم می شود. تفاوت ژنوتیپ ها حاصل اختلاف در بیش یا برابر ۳۰٪ توالی نوکلئوتیدها است. ژنوتیپ ۱ شایع ترین ژنوتیپ با گسترش جهانی می باشد که پاسخ به درمان آن ضعیف است. همچنین بیش از ٤٥ درصد موارد عفونت با این

*) آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۱۳۳۸۳۸٦۰ پست الکترونیک: asadpour@iaurasht.ac.ir

ویروس ایجاد می شود. پس از آن ژنوتیپ های ۳ و ۲ بیشترین شیوع را دارند (۴-۲).

تا قبل از سال ۱۹۹۰ که ویروس هپاتیت C کشف نشده بود و هیچگونه کیت آزمایشگاهی نیز برای شناسایی ویروس وجود نداشت، اصلی ترین راه انتقال آلودگی، خون و فرآورده خونی آلوده به ویروس بود. اما با کشف ویروس و تولید کیت های آزمایشگاهی تا حد زیادی از انتقال ویروس جلوگیری به عمل آمد. به طور کلی این ویروس در مایعات بیولوژیک مانند خون، سرم، پلاسما، بزاق دهان، اشک، مایع منی، مایع آسیت و مایع مغزی نخاعی یافت می شود و تماس با این مایعات بیولوژیک می تواند موجب انتقال عفونت گردد (۵ و ۶).

درمان هپاتیت C به دلیل تعدد ژنوتیپ ها و زیر تیپ های ویروس پیچیده و دشوار است (۲). از داروهایی که در حال حاضر در دست مطالعه می باشند، می توان به مهارکننده های پروتئاز و مهارکننده های پلی مراز ویروس اشاره نمود که امیدهای زیادی را برای درمان هپاتیت C به ارمغان آورده اند. نکته شایان توجه در مورد این داروها، این است که مقاوت ویروس هپاتیت C به این داروها در اثر مصرف آنها مشاهده شده است. این امر به دلیل جهش و تغییرات آمینواسیدی در پروتئین های هدف مانند NS5B رخ می دهد.

NS5B یک RNA پلی مراز وابسته به RNA است که در پردازش ژنوم ویروس به منظور ایجاد رشته الگوی منفی و سپس رونویسی نسخه های دختری ژنوم دخالت دارد (۶). این آنزیم دارای دو جایگاه می باشد: یک جایگاه کاتالیتیک برای اتصال ترکیبات نوکلئوتیدی و چهار جایگاه دیگر برای تغییرات آلوستریک که ترکیبات غیرنوکلئوتیدی می توانند به آنها متصل شوند. ساختار RNA پلی مراز وابسته به RNA در میان تمام ژنوتیپ های این ویروس بسیار حفاظت شده است (۸). تاکنون تعدادی از این جهش های مقاومتی در نواحی یاد شده شناسایی شده اند.

هدف این مطالعه بررسی جهش های احتمالی در ناحیه NS5B ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C، به منظور بررسی دلایل مقاومت به داروهای مهار کننده پروتئین NS5B، در استان گیلان می باشد.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این مطالعه، ۲۲۵ نمونه پلاسمای بیماران آنتی HCV مثبت (بیماران مثبت از نظر آنتی بادی ضد HCV) مراجعه کننده در سال های ۹۴ و ۹۵ به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر رشت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های پلاسما تا زمان انجام آزمون در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ب) استخراج RNA و ساخت cDNA: به منظور استخراج RNA از کیت QIAamp (شرکت Qiagen، آلمان) استفاده گردید. به دلیل ناپایدار بودن مولکول RNA، پس از استخراج، cDNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما، ایران) ساخته شد. بدین منظور RNA، رندوم هگزامر و آب مقطر RNase free با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس آنزیم و دیگر اجزای واکنش به مخلوط اضافه و برای انجام واکنش سنتز cDNA به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. در نهایت مخلوط واکنش در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد تا آنزیم RT غیرفعال گردد.

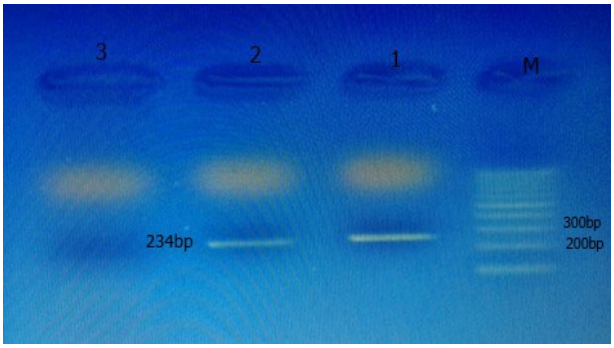
ج) شناسایی مولکولی و تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C. به منظور شناسایی مولکولی ویروس هپاتیت C، از cDNA حاصل در واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ناحیه 5'-UTR

جدول ۱. پرایمر های مورد استفاده به منظور تکثیر ناحیه 5'-UTR ژنوم HCV و ژن *NS5B*

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر یافته (bp)	منبع
5'-**UTR**	F(5'- CAAGCACCCTATCAGGCAGT-3') R(5'- AGCGTCTAGCCATGGCGT-3')	۲۳۴	۹
NS5B	F(5'- GATACCCGCTGTTTTGACTC-3') R(5'- CTGGTCATAGCCTCCGTGAA-3')	۳۷۷	۱۰

ژنوم HCV استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش نهایی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۳ میکرولیتر cDNA الگو، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) ۱۸ میکرولیتر از مستر میکس PCR (Golden Double Helix، ایتالیا) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر (PCR Analaytik Jena، آلمان) در شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ °C به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ٥٦ °C به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ٦۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه. در نهایت محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردیدند و با دستگاه UV trans illuminator مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه ها، محصول PCR برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نتایج حاصل به کمک نرم افزار آنلاین بلاست (BLAST)، مورد بررسی قرار گرفت (۹).

د) تکثیر ژن NS5B و بررسی جهش های آن: تکثیر ژن *NS5B* در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر همانند مرحله قبل انجام شد با این تفاوت که دمای اتصال پرایمر در این مرحله، ٦۵ °C به مدت ٦۰ ثانیه بود. در نهایت محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV trans illuminator مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه ها با حفظ زنجیره سرمایی برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. نتایج حاصل به کمک نرم افزار آنلاین بلاست (BLAST)، نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار کروماس (Chromas) از نظر وجود جهش در نمونه های مورد مطالعه نسبت به نمونه استاندارد موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت



شکل ۱. نتایج مربوط به محصول RT-PCR ژن HCV . M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) نمونه مثبت ویروس هپاتیت C، ستون ۲) کنترل مثبت، ستون ۳) کنترل منفی.

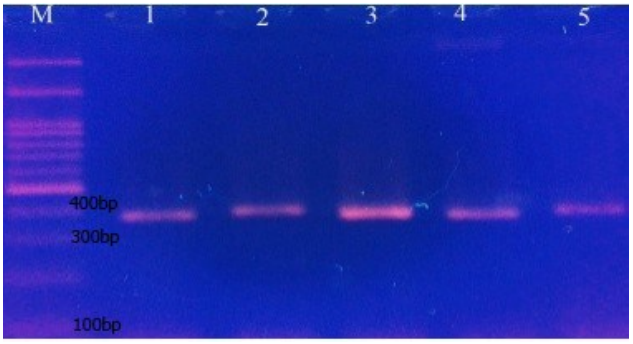
(۱۰).

یافته ها

الف) نتایج ردیابی ژنوم ویروس HCV و ژنوتایپینگ: در این مطالعه شناسایی مولکولی ویروس هپاتیت C با تولید قطعاتی به طول ۲۳٤ جفت باز در واکنش PCR انجام گرفت. از مقایسه توالی نوکلئوتیدی محصولات واکنش با توالی های ثبت شده در بانک ژنی، ٤ نوع ژنوتیپ 1a، 1b، 1c و 3a در نمونه ها شناسایی گردید. نتایج حاصل از تکثیر این ژن در شکل ۱ و فراوانی ژنوتیپ های مختلف این ویروس در نمودار ۱ نشان داده شده است.

ب) تکثیر ژن NS5B و تعیین توالی آن: در ۱۰ نمونه از ویروس هپاتیت C با ژنوتیپ 1a از تکثیر ژن *NS5B*، محصولی با طول ۳۷۷ جفت باز ایجاد شد. نتایج حاصل از تکثیر این ژن در

نمودار ۱: فراوانی ژنوتیپ های مختلف ویروس HCV



شکل ۲. نتایج مربوط به محصول PCR ژن *NS5B*، M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱ تا ۵) محصول PCR با طول ۳۷۷ جفت باز.

شکل ۲ نشان داده شده است. از آنالیز توالی نوکلئوتیدی این نمونه ها در ۵ مورد دو تا چهار جهش بد معنی شناسایی گردید (شکل های ۵-۳).

این جهش ها موجب تغییرات آمینواسیدی Q309، A327، S254، K304، N307، R250 و A334 گردیدند. همچنین تمام نمونه های مورد بررسی دارای یک یا چند جهش خاموش نیز بودند. به طوری که در مجموع جدایه ها ۳۳ نوع جهش خاموش شناسایی شد. فهرست جهش های بدمعنی و تغییرات آمینواسیدی مشاهده شده در نمونه های توالی یابی شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

ویروس هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجاد بیماری های کبدی می باشد. بیش از دو دهه از زمان کشف ویروس هپاتیت C می گذرد، اما گزینه های درمانی آن هنوز محدود هستند (۱۱). بخشی از این محدودیت به دلیل جهش های متعدد در ساختار ژنوم ویروس به ویژه در ژن *NS5B* که یک RNA پلی مراز وابسته به RNA موثر در پردازش ژنوم ویروس به منظور ایجاد رشته الگوی منفی و رونویسی نسخه های دختری ژنوم می باشد (۷).

جدول ۲. جهش های بدمعنی مشاهده شده در نمونه های توالی یابی شده.

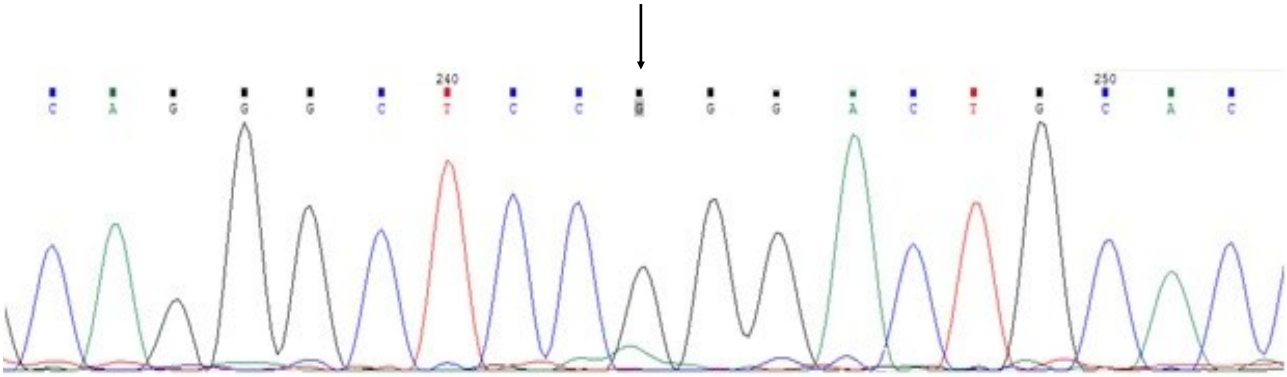
تغییر آمینواسیدی	تغییر بازی	کدون	تعداد نمونه
Gln>Arg Q309R	CAG>CGG	۳۰۹	۲
Ala>Gln A327Q	GCG>CAG	۳۲۷	
Lys>Arg K304R	AAG>AGG	۳۰۴	۱
Asn>Gly N307G	AAC>GGC	۳۰۷	
Ser>Thr S254T	TCC>ACC	۲۵۴	
Lys>Arg K304R	AAG>AGG	۳۰۴	۱
Asn>Gly N307G	AAC>GGC	۳۰۷	
Arg>Lys R250K	AGG>AAG	۲۵۰	
Lys>Arg K304R	AAG>AGG	۳۰۴	۱
Asn>Gly N307G	AAC>GGC	۳۰۷	
Ala>Thr A334T	GCA>ACA	۳۳۴	

در مطالعه حاضر بیش ترین ژنوتیپ های مشاهده شده به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های 3a، 1a، 1b و 1c بودند که با مطالعه حسینی مقدم (Hosseini Moghaddam) و همکاران در تهران، ورما (Verma) و همکاران در شمال هند و حق شناس (Haghshenas) و همکاران در قائمشهر کاملاً هم خوانی دارد (۱۴-۱۲).

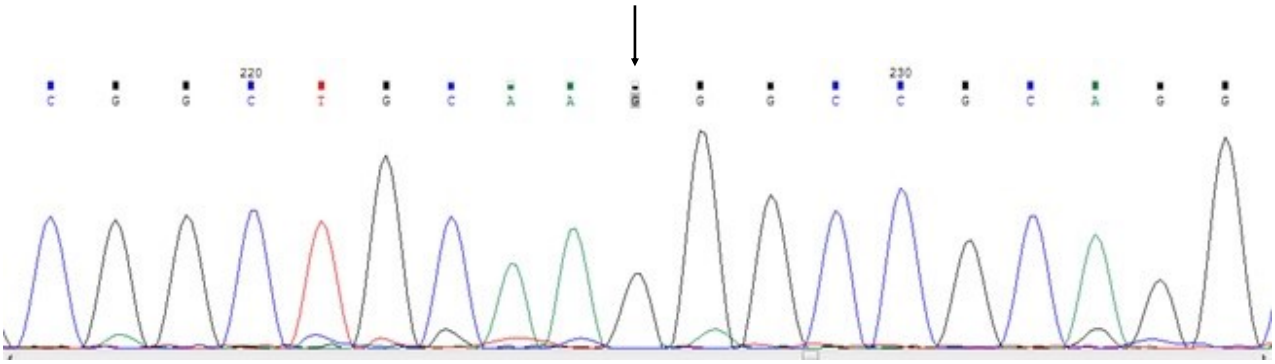
اما در مطالعات دیگری که توسط صمیمی راد (Samimi Rad) و همکاران، مخلوق (Makhloogh) و همکاران و حجازی (Hejazi) و همکاران انجام گرفت، ژنوتیپ 1a دارای بیشترین فراوانی بود که با مطالعه حاضر متفاوت است (۱۷-۱۵). بر این اساس میزان شیوع ژنوتیپ های مختلف ویروس هپاتیت C در مناطق مختلف، بسته به شرایط اقلیمی و ژنتیکی آن منطقه متفاوت است. بروز مقاومت نسبت به داروهای مختلف در ویروس هپاتیت C به دلیل جهش در ژن های مختلف این ویروس مانند *NS3*، *NS5A* و *NS5B* رخ می دهد. از جمله شایع ترین این جهش ها می توان به D310N، S282T، S326G، T329I و Q309R اشاره نمود.

جاسپ (Jaspe) و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی شیوع جهش های آمینواسیدی در نواحی مرکزی و NS5B ویروس هپاتیت C در جدایه های ونزوئلایی پرداختند. نتایج آنها نشان داد که جهش Q309R در تمام ژنوتیپ ها به جز ژنوتیپ ۲ مشاهده می شود (۱۸).

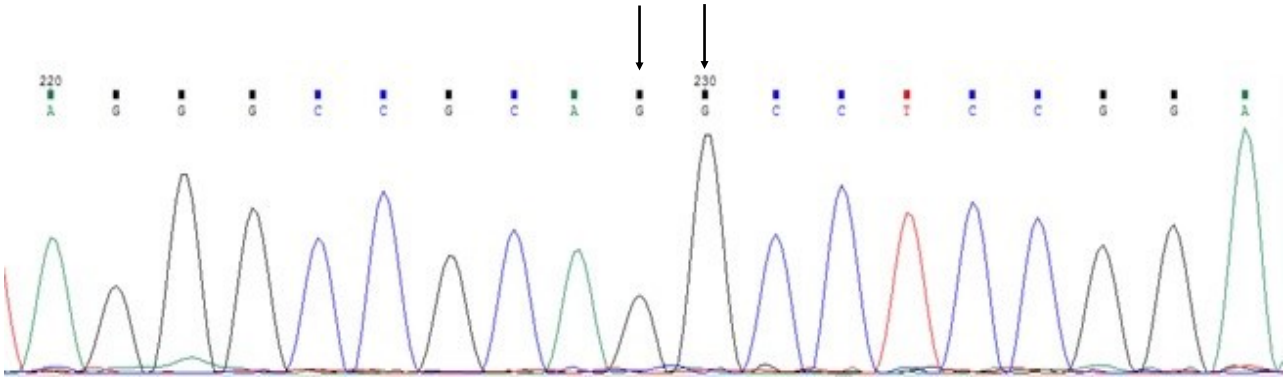
کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۱۴، جهش هایی که به طور طبیعی در ناحیه غیرساختاری ویروس هپاتیت C در بیماران کره ای آلوده به HCV مزمن که تحت درمان بودند، مورد بررسی قرار دادند (۱۹). در سال ۲۰۱۱، کاستیلو (Castilho) و



شکل۳: الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۳۰۹ به G: با تغییر کدونی CAG>CGG و تغییر آمینواسیدی Q309R.



شکل٤: الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۳۰٤ به G: با تغییر کدونی AAG>AGG و تغییر آمینواسیدی K304R.



شکل٥: الکتروفروگرام مربوط به تغییر بازهای Aa در موقعیت ۳۰۷ به GG: با تغییر کدونی AAC>GGCو تغییر آمینواسیدی N307G.

همکاران به بررسی ارتباط واریانت هـای *NS5B* در ویـروس هپاتیت C با مقاومت به داروهای ضدویروسی جدید در بیماران غیرخویشاوند پرداختند. بر اساس نتایج تحقیق آنها، شایع تریـن جهش، Q309R بود. بر اساس این مطالعـه، جـهـش Q309R شایع ترین جهش در *NS5B* به ویژه در بیماران آسیایی اسـت. در این مطالعه، جهش های S282، S326Gیا T329I در هـیـچ یک از نمونه های مورد بررسی مشاهده نگردید (۱۰).

در مطالعه ما نیز جهش شایع Q309R مشاهده شد. همچنین در نتیجه مشابهی در مطالعه حاضر نیـز جـهـش هـای S282T، S326G و T329I در هیچ کدام از نمونه ها یافت نشد.

پائولوچی (Paolucci) و همکاران در سال ۲۰۱۳ به مـطـالـعـه جهش های مقاومت به مهـارکـنـنـده هـای نـاحـیـه NS5B پرداختند. نتایج این مطالعه نشـان داد کـه در سـویـه هـای دارای ژنوتیپ 1a، جهـش هـای مـقـاومـت در NS5B از

جمله V321I، M426L، Y448H و Y452H نیز در ۱۲/۵٪ بیماران وجود دارد. این جهش ها L159F، V321I، C316N، M426L، Y452H، R465G و V499A بودند (۲۰).

اگرچه هیچ یک از جهش های این مطالعه در تحقیق حاضر مشاهده نشد، اما علاوه بر مشاهده جهش شایع Q309R، چندین جهش بد معنی دیگر نیز دیده شد. مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که جانشینی های آمینواسیدی در *NS5B* نقش مهمی در عملکرد ویروس دارند.

در این مطالعه، جهش مقاومت شایع Q309R در دو نمونه مشاهده شد. همچنین جهش های بدمعنی دیگری مانند S254T، K304R، R250K مشاهده شد که در مطالعات دیگر گزارش نشده بودند. بنابراین به منظور بررسی اهمیت جهش های جدید، باید مطالعات گسترده تری به عمل آید.

نتیجه گیری

با توجه به متفاوت بودن پاسخ به درمان ژنوتیپ های مختلف ویروس هپاتیت C، ژنوتایپینگ نقش مهمی در مدیریت درمان هپاتیت ناشی از این ویروس دارد. ژنوتیپ 1a از شایع ژنوتیپ های ویروس هپاتیت C در گیلان می باشد. شناسایی جهش ها یا پلی مورفیسم مرتبط با مقاومت در این ژنوتیپ ویروس هپاتیت C می تواند در بهینه سازی درمان مفید باشد. همچنین این داده ها در تعیین کارایی داروها در درمان هپاتیت C بسیار حائز اهمیت هستند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری در اجرای این پروژه کمال امتنان را دارند.

References

1. Von Delft A, Donnison TA, Lourenço J, Hutchings C, Mullarkey CE, Brown A, Pybus OG, Klenerman P, Chinnakannan S, Barnes E. The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes. Vaccine. 2018; 36(2): 313-321.
2. Chantratita W, Song KS, Gun Ho C, Pongthanapisith V, Thongbaiphet N, Wongtabtim G, Pasomsub E, Angkanavin K, Nimse SB, Sonawane MD, Warkad SD. 6 HCV genotyping 9G test and its comparison with VERSANT HCV genotype 2.0 assay (LiPA) for the hepatitis C virus genotyping. J Virol Methods. 2017; 239: 1-8.
3. Ali N, Allam H, May R, Sureban SM, Bronze MS, Bader T, Umar S, Anant S, Houchen CW. Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts. J Virol. 2011; 85(23): 12292-12303.
4. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatol. 2015; 61(1): 77-87.
5. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. New Engl J Med. 2001; 345(1): 41-52.
6. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and practice of infectious diseases. Elsevier Health Sci; 2014; 1: 1336-1356.
7. Ranjith-Kumar CT, Kao CC. Biochemical activities of the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. Hepatitis C viruses: Genomes and molecular biology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience. 2006: 293-310.
8. Pockros PJ. New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection.

Therap Adv Gastroenterol. 2010; 3(3): 191-202.

9. Motawi TM, Rizk SM, Shaker OG, Mokhtar OZ. MicroRNAs as predictor markers for response to interferon treatment of chronic hepatitis C genotype-4 in Egyptian patients. PloS one. 2015; 10 (3): 1-12.

10. Castilho MC, Martins AN, Horbach IS, Perez RD, Figueiredo FA, Pinto PD, Nabuco LC, Lima DB, Tanuri A, Porto LC, Júnior F. Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(8): 968-975.

11. Huang T, Wang J, Cai YD, Yu H, Chou KC. Hepatitis C virus network based classification of hepatocellular cirrhosis and carcinoma. PLoS One. 2012; 7(4): e34460.

12. Hosseini Moghaddam SM, Keyvani H, Kasiri H, Kazemeyni SM, Basiri A, Aghel N, Alavian SM. Distribution of hepatitis C virus genotypes among hemodialysis patients in Tehran: a multicenter study. J Med Virol. 2006; 78(5): 569-573.

13. Verma V, Chakravarti A, Kar P. Genotypic characterization of hepatitis C virus and its significance in patients with chronic liver disease from Northern India. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61(4): 408-414.

14. Haghshenas MR, Babamahmoodi F, Rafiei AR, Vahedi V. The correlation between HCV genotypes and liver damage in HCV patients. J Mazandaran Uni Med Sci. 2011; 21(85): 76-83.

15. Samimi Rad K, Nategh R, Malekzadeh R, Norder H, Magnius L. Molecular epidemiology of hepatitis C virus in Iran as reflected by phylogenetic analysis of the NS5B region. J Med Virol. 2004; 74(2): 246-252.

16. Makhloogh A, Aezinia N, Haghshenas MR, Tirgar-fakheri H, Maleki I, Taghvaei T. Comparison of Hepatitis C Virus Genotypes in Hemodialysis and Nonuremic Patients. Armaghane Danesh. 2010; 15(3): 283-292. [In Persian]

17. Hejazi MS, Ghotaslou R, Farshdoosty Hagh M, Mohammadzadeh Sadigh Y. Genotyping of hepatitis C virus in northwest of Iran. Biotechnol. 2007; 6(3): 302-308.

18. Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH. Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. Virol J. 2012; 9(1): 214.

19. Kim DW, Lee SA, Kim H, Won YS, Kim BJ. Naturally occurring mutations in the nonstructural region 5B of hepatitis C virus (HCV) from treatment-naïve Korean patients chronically infected with HCV genotype 1b. PLOS One. 2014; 9(1): e87773.

20. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Bruno R, Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients. Virol J. 2013; 10(1): 355.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 4, January 2019

Original Article

Study of *NS5B* gene mutations in hepatitis C virus genotype 1a in Guilan Province

Leila Asadpour[1], Hamdollah Rahimi Dogaheh[2], Mahnaz Houshmand Rad[2]

[1]Assistant Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[2]M.Sc., Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Hepatitis C virus is the main cause of chronic hepatitis, resulting in a thousand deaths every year. NS5B protein is an RNA-dependent RNA polymerase that is encoded by the *NS5B* gene and involved in virus replication. One of the most effective drugs in the treatment of infections caused by this virus are NS5B protein inhibitors. The emergence of the strains resistant to these drugs is a major obstacle to the success of treatment. The aim of this study was to investigate possible mutations in the NS5B region of hepatitis C virus genotype 1a in Guilan province.

Materials & Methods: HCV genomic RNA was extracted from the plasma samples of 225 anti-HCV positive patients and its molecular identification and genotyping was carried out by RT-PCR and product Sequencing. Then, the *NS5B* gene was amplified in 10 strains with genotype 1a and subsequently sequenced to determine mutations in this region.

Results: Genotypes 3a (53.3%) and 1a (36.9%) were the most abundant genotypes identified in Guilan. According to sequencing results, out of 10 investigated genotype 1a strains, 5 strains showed 7 types of missense mutations in codons Q309, A327, S254, K304, N307, R250, and A334.

Conclusions: Genotype 1a is one of the common genotypes of hepatitis C virus in Guilan. Identifying mutations or polymorphisms associated with resistance in hepatitis C virus can be useful in optimizing the treatment and determining the efficacy of drugs in treating hepatitis C virus.

Keywords: Hepatitis C, Drug resistance, NS5B mutation.

Correspondence to: Leila Asadpour

Tel: +98 9113383860

E-mail: asadpour@iaurasht.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 11(4): 332-339.