

## بررسی حضور ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت C در سرم، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و نمونه بیوپسی کبد بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲۰

### چکیده

فرح بخارائی سلیم،<sup>۱\*</sup>

حسین کیوانی،<sup>۱</sup> فرهاد زمانی،<sup>۲</sup>

فاطمه جهانبخش سفیدی،<sup>۱</sup>

افسانه امیری<sup>۲</sup>

۱- گروه ویروس‌شناسی

۲- گروه گوارش مرکز تحقیقاتی بیماری‌های گوارش و کبد

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

**زمینه و هدف:** گرچه ویروس هپاتیت C، ویروسی هپاتوتروپیک است، گزارشاتی مبنی بر حضور این ویروس در مناطق خارج کبدی از جمله سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی وجود دارد. در این مطالعه روی عفونت‌های مخلوط و هم‌چنین ژنوتیپ‌های متفاوت این ویروس در پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و نمونه بیوپسی کبد بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C بررسی شد. **روش بررسی:** این پژوهش روی ۱۵۲ بیمار مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C مراجعه‌کننده به بیمارستان فیروزگر از شهریور سال ۱۳۸۷ تا فروردین ۱۳۸۹، انجام شد. پس از جمع‌آوری نمونه پلاسما و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد بیماران، RNA آن‌ها استخراج شد و ژنوتیپ ویروس هپاتیت C، با استفاده از کیت INNO-LiPAT<sup>TM</sup> HCV II، تعیین گردید. برای تأیید نوع ژنوتیپ ویروس، محصول PCR ناحیه ۵'-UTR نمونه‌ها، تعیین توالی شد. **یافته‌ها:** میانگین سنی بیماران مورد بررسی ۳۱/۲±۱۶/۹ بود. عفونت مخلوط با ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت C در پلاسما، چهار بیمار (۲/۶٪)، در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۱۰ بیمار (۶/۶٪) از ۱۵۲ بیمار مورد بررسی و نمونه بیوپسی کبد ۹ بیمار (۱۸/۸٪) از ۴۸ بیمار مورد بررسی تشخیص داده شد. قابل ذکر است که در (۱۳/۸٪) ۲۱ مورد ژنوتیپ ویروس در نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد بیماران با هم متفاوت بود. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که نسبت قابل توجهی از بیمارانی که دچار عفونت با ویروس هپاتیت C هستند با ژنوتیپ‌های متفاوتی از این ویروس آلوده شده‌اند که ممکن است در پلاسما، بیماران قابل ردیابی نباشند.

**کلمات کلیدی:** ویروس هپاتیت C، عفونت مخلوط، ژنوتیپ.

\* نویسنده مسئول: تهران، گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران پردیس همت، بزرگراه همت، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۲۲۰۵

E-mail: Bokharaeifarah@gmail.com

### مقدمه

ژنومی ویروس هپاتیت C، مشخص شده است که این ویروس دارای ژنوتیپ‌ها و ساب ژنوتیپ‌های مجزایی می‌باشد.<sup>۴</sup> این ویروس دارای شش ژنوتیپ اصلی (با نام‌های ۱-۶)<sup>۵</sup> و بیش از ۷۰ ساب ژنوتیپ (با نام‌های ... a, b, c) می‌باشد که در سراسر دنیا منتشر شده است.<sup>۴،۶</sup> قبل از شروع درمان ضدویروسی بر علیه عفونت هپاتیت C باید نوع ژنوتیپ ویروس را تعیین کرد تا این‌که طول دوره درمان، دوز ریبویرین مصرفی و روش نظارت بر درمان مشخص گردد.<sup>۷</sup> ویروس هپاتیت C یک ویروس هپاتوتروپیک می‌باشد و در سلول‌های کبدی تکثیر یافته و به آن‌ها آسیب می‌رساند، ولی توالی ژنومی ویروس را می‌توان در مناطق خارج کبدی نیز یافت. از جمله این مناطق می‌توان

ویروس هپاتیت C، Hepatitis C Virus (HCV) ویروسی RNA دار با پلاریته مثبت و دارای پوشش می‌باشد که در خانواده قلاوی ویریده (Flaviviridae) و جنس هپاسی (Hepacivirus) ویروس‌ها قرار دارد.<sup>۱</sup> نزدیک به ۱۷۰ میلیون نفر در سراسر جهان به عفونت هپاتیت C مبتلا می‌باشند و در حدود ۵-۳ میلیون نفر سالانه به این عفونت مبتلا می‌گردند.<sup>۲</sup> تخمین می‌زنند سالیانه عفونت مزمن با ویروس هپاتیت C، منجر به مرگ ۲۵۰-۳۵۰ هزار نفر در اثر سیروز جبران نشده، بیماری کبدی مرحله نهایی و هپاتوسلولار کارسینوما باشد.<sup>۳</sup> با توجه به توالی

به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، سیستم اعصاب مرکزی و مغز استخوان بیماران مبتلا به عفونت هپاتیت C اشاره کرد.<sup>۱۰-۸</sup> لازم به ذکر است که ویروس هپاتیت C از طریق یک واسطه تکثیر با پلازیمه منفی تکثیر می‌شود. گرچه سلول‌های کبدی محل اولیه تکثیر این ویروس هستند ولی شواهدی از حضور ویروس با پلازیمه منفی در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نیز یافت می‌شود. هم‌چنین گزارش شده است که توالی ژنومی ویروس هپاتیت C یافت شده در این سلول‌ها ممکن است با توالی‌های موجود در نمونه سرمی و بیوپسی کبد بیماران متفاوت باشد.<sup>۱۱،۱۲</sup> بنابراین احتمال دارد که این ویروس در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به صورت مستقل تکثیر کند. ردیابی ژنوم ویروس هپاتیت C در مخازن خارج کبدی از نظر انتقال، پیشرفت بیماری و درمان مؤثر بر علیه عفونت هپاتیت C از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.<sup>۱۳</sup> علاوه بر این، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ممکن است مکانی خاص و مصون برای ویروس هپاتیت C باشد و ویروس بتواند پس از خاتمه درمان ضدویروسی هنگامی که شرایط مناسب بود، مجدداً تکثیر یابد. به طور مثال، پس از پیوند کبد احتمال دارد بیمار به علت حضور ویروس در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی دچار عود عفونت با هپاتیت C شود.<sup>۱۴</sup> بنابراین، حتی اگر ویروس هپاتیت C از سرم فرد پاک شود، احتمال دارد در اثر تکثیر ویروس در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مجدداً منجر به عود عفونت شود.<sup>۱۵</sup> هدف از مطالعه حاضر تعیین حضور و فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت C در نمونه پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C است.

## روش بررسی

این مطالعه مقطعی (Cross sectional) روی ۱۵۲ بیمار مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C که برای شروع درمان، از تاریخ از شهریور سال ۱۳۸۷ تا فروردین سال ۱۳۸۹، به بیمارستان فیروزگر (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران) مراجعه کرده بودند، انجام شد. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی جهت شرکت در طرح حاضر و پر کردن پرسش‌نامه‌ای که حاوی سؤالات مربوط به ویژگی‌های دموگرافیک و سابقه بیماری و غیره بود، نمونه‌ها با هماهنگی‌های لازم با بخش

جراحی و آزمایشگاه بیمارستان فیروزگر جمع‌آوری شد. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: در حدود پنج میلی‌لیتر از نمونه خون محیطی بیماران در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال گردید. سپس با سانتریفوژ کردن نمونه، پلاسما آن جداسازی شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نمونه‌ها بر اساس گرادیانته غلظتی با استفاده از فایکول (Lymphoprep, Oslo, Norway) جدا شد و سه بار با بافر سالین فسفات (با  $\text{pH}=7.2 \pm 0.1$ ) شستشو شد و برای نگه‌داری بهینه این سلول‌ها، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول نگه‌دارنده RNALater (Ambion Inc, Austin, TX)، به آن‌ها اضافه گردید. نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ ، نگه‌داری شد. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی به منظور انجام آزمایشات پاتولوژی و ویروس‌شناسی، از ۴۸ تن از بیماران مورد مطالعه بیوپسی کبد گرفته شد. نمونه حاصل در پلیت استریل به دو قسمت تقسیم شد و یک قسمت آن داخل فرمالین قرار داده شده و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید و قسمت دیگر در محلول نگه‌دارنده RNALater قرار داده شده و برای انجام آزمایشات ویروس‌شناسی به آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ ، نگه‌داری گردید. استخراج RNA از نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد: جهت تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C و انجام آزمایش RT-nested PCR، ابتدا RNA ویروسی از نمونه‌ها استخراج شد. برای استخراج RNA ویروسی از پلاسما، از کیت استخراج RNA شرکت کیازن (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) استفاده شد و جهت استخراج RNA ویروسی از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، کیت استخراج RNA شرکت (Invitek GmbH, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین از دو میلی‌متر مکعب از بیوپسی کبد بیماران با استفاده از کیت استخراج RNA/DNA، شرکت اینویتک (Invitek GmbH, Germany)، مطابق بر دستورالعمل هر کدام از کیت‌ها بود.

تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C: جهت تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C از کیت تجاری (INNO-LiPA™ HCV II Ghent, Belgium) استفاده شد. این روش به اختصار به این صورت می‌باشد: ابتدا با استفاده از RNA استخراج شده از نمونه‌های پلاسما،

## یافته‌ها

۱۵۲ بیمار مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C وارد مطالعه حاضر شدند. ۱۴۱ (۹۲/۸٪) تن از بیماران چندین مرحله انتقال خون داشتند. ۹۸ (۶۵/۵٪) بیمار مبتلا به تالاسمی، ۴۴ (۲۸/۹٪) بیمار مبتلا به هموفیلی بودند و منبع عفونت در ۱۰ (۶/۶٪) بیمار نامشخص بود. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه  $31.2 \pm 16.9$  سال بوده و تعداد میانگین سنی بیماران مذکر بودند. میانگین بار ویروسی (Viral load) ویروس هپاتیت C، در پلاسمای بیماران مورد بررسی  $6.8 \times 10^5 \pm 7.7 \times 10^4$  (با دامنه‌ای ۴۳۰ تا  $5.7 \times 10^6$ ) بود. ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C فراوان‌ترین ژنوتیپ جدا شده بود که فراوانی آن در نمونه پلازما ۶۰/۶٪، در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۵۸/۵٪ و در بیوپسی کبد ۵۲/۱٪ بود (جدول ۱). ژنوتیپ ویروس هپاتیت C جدا شده در نمونه پلازما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد بیماران مورد مطالعه مشابه بود به استثنای ۲۱ (۱۳/۸٪) بیمار که ژنوتیپ جدا شده در این نمونه‌ها با هم اختلافاتی داشت. نتایج و اطلاعات دموگرافیک ۲۱ بیمار در جدول ۲ دیده می‌شود. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، عفونت مخلوط ویروس هپاتیت C در پلاسمای ۴ (۲/۶٪) بیمار، در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۱۰ (۶/۶٪) بیمار و در کبد ۹ (۱۸/۸٪) بیمار ردیابی شد. با نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه 5'-UTR ویروس که یک ناحیه حفاظت شده می‌باشد، مشخص شد که نتایج حاصل از ژنوتایپینگ ویروس هپاتیت C با روش INNO-LiPA™ با روش تعیین توالی که یک روش مرجع و استاندارد طلایی برای تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C می‌باشد، ۱۰۰٪ هماهنگی دارد.

سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد (با روش‌های ذکر شده)، ناحیه حفاظت شده (5'-UTR) ویروس با استفاده از پرایمرهای بیوتینیل شده تکثیر می‌شود. محصول نشان‌دار شده با بیوتین به طور معکوس به پروب‌های اختصاصی متصل شده به استریپ‌های نیتروسولوزی هیبرید می‌شود و سپس نوارها با کروموزن انکوبه می‌گردد. نتایج حاصل به صورت باندهای بنفش رنگ روی نوارهای نیتروسولوزی حاصل می‌شود. با توجه به باندهای حاصل از این آزمایش و مقایسه آن با الگوی موجود در کیت می‌توان ژنوتیپ ویروس را با استفاده چارت تفسیر آزمایش این کیت تعیین نمود.<sup>۱۶</sup> روش تعیین توالی یک روش مرجع برای تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C می‌باشد. جهت تأیید ژنوتیپ‌های مشخص شده با روش فوق، ۱۰ نمونه به صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی گردید. در تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از RNA استخراج شده از نمونه‌های پلازما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد، ناحیه حفاظت شده 5'-UTR ویروس هپاتیت C با روش RT-nested PCR تکثیر شد.<sup>۱۷</sup> محصول حاصل (با طول ۲۱۱ جفت باز). این شرکت نمونه‌ها را برای تعیین توالی به (Macrogen Co, Korea) ارسال شد. توالی‌های حاصل با نرم‌افزار Chromas ویراست ۲/۳۳ در کامپیوتر باز شد و با استفاده از سایت NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))، توالی‌ها Blast شدند و سپس ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C، در مقایسه با سکانس‌های مرجع این ویروس در بانک ژن جهانی تعیین گردید. تحلیل آماری نتایج با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶، با شاخص‌های آماری توصیفی مانند میانگین و انحراف معیار (SD)، با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) و آزمون Student's t-test انجام شده است.  $P < 0.05$  از نظر آنالیز آماری، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول- ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در نمونه‌های پلازما، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد

ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C	فراوانی در پلازما	فراوانی در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی	فراوانی در بیوپسی کبد
1a	۹۲ (۶۰/۶)	۸۹ (۵۸/۵)	۲۵ (۵۲/۱)
1b	۱۲ (۷/۹)	۱۳ (۸/۵)	۴ (۸/۳)
2	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
3	۴۲ (۲۷/۶)	۳۹ (۲۵/۷)	۱۰ (۲۰/۸)
4	۲ (۱/۳)	۱ (۰/۷)	۰ (۰/۰)
عفونت مخلوط	۴ (۲/۶)	۱۰ (۶/۶)	۹ (۱۸/۸)
مجموع	۱۵۲	۱۵۲	۴۸

جدول-۲: توزیع ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد

ردیف	جنس / سن (به سال)	بار ویروسی	بیماری	ژنوتیپ‌های ویروس	ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی	ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C در بیوپسی کبد
۱	مؤنث / ۱۵	۷۶۵۰۰	تالاسمی	3a	3a/1a	3a
۲	مؤنث / ۳۶	۱۳۸۰۰۰	تالاسمی	1a	3a	1a
۳	مذکر / ۱۷	۵۹۷۰۰۰	هموفیلی	1a/3a	1a	1a
۴	مذکر / ۲۳	۹۸۹۰۰۰	تالاسمی	1a/1b	1b	1a/1b/3a
۵	مذکر / ۲۳	۲۲۶۰۰۰	تالاسمی	1a/1b	1b	1a/1b
۶	مذکر / ۳۳	۴۵۰	تالاسمی	1a	3a	1a/3a
۷	مذکر / ۲۶	۲۵۰۰۰۰	تالاسمی	3a	1a	1a/3a
۸	مذکر / ۱۷	۱۰۶۰۰۰	تالاسمی	1a	3a/1a	1a/3a
۹	مذکر / ۲۵	۷۸۰۰۰۰	تالاسمی	1a	1a	1a/3a
۱۰	مؤنث / ۳۰	۱۰۸۰۰	تالاسمی	1b	1a/1b	1b/3a
۱۱	مؤنث / ۲۷	۷۵۰۰۰۰	تالاسمی	3a	3a	3a/1b
۱۲	مذکر / ۱۴	۵۵۹۰۰۰۰	تالاسمی	3a	3a	1a/3a
۱۳	مذکر / ۲۸	۱۱۹۰۰۰۰	تالاسمی	1a	1a/3a	1a
۱۴	مذکر / ۱۹	۱۱۵۰۰۰۰	هموفیلی	1a	1a/3a	1a
۱۵	مذکر / ۲۰	۸۹۰۰۰۰	تالاسمی	1a	1a/1b	1a
۱۶	مؤنث / ۲۲	۶۱۸۰۰۰	تالاسمی	3a	3a	3a/2a
۱۷	مذکر / ۲۷	۱۶۷۰۰۰	تالاسمی	3a	3a/2a	3a/2a
۱۸	مذکر / ۴۶	۲۳۰۰۰۰	هموفیلی	3a	3a/2a	3a/2a
۱۹	مذکر / ۲۷	۲۷۳۰۰۰	هموفیلی	3a	3a/2a	3a/2a
۲۰	مذکر / ۵۷	۴۸۰۰۰۰	نامشخص	4	3a	3a
۲۱	مذکر / ۲۲	۱۹۳۰۰۰	هموفیلی	3a	3a/1a	3a

## بحث

ژنوتیپ مختلف ویروس هپاتیت C آلوده شود. عفونت مخلوط ویروسی از اهمیت بالایی برخوردار است و ممکن است منجر به بیماری حادتر، عدم پاسخ به درمان ضدویروسی و یا عود عفونت پس از اتمام دوره درمان ضدویروسی شود.<sup>۱۸</sup> در مطالعه حاضر ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت C مختلف در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی حضور داشت که از ژنوتیپ‌های ویروس در پلاسما و بیوپسی کبد متفاوت بود (جدول ۲). بنابراین سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، ممکن است تایپ ویروسی متفاوتی را در خود داشته باشند که در نمونه پلاسما و بیوپسی کبد قابل ردیابی نباشد. این یافته فرضیه‌های قبلی مبنی بر حضور ویروس در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به عنوان محل تکثیر خارج کبدی ویروس را تقویت می‌کند.<sup>۱۹</sup> گزارشات متعددی وجود دارد مبنی بر این که

مطالعه حاضر به جهت تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت C، روی نمونه ۱۵۲ بیمار مبتلا به عفونت مزمن با ویروس هپاتیت C انجام شد و شیوع عفونت مخلوط این ویروس در نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. عفونت مخلوط در پلاسما (۴/۲/۶) بیمار، در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (۱۰/۶/۶) بیمار و بیوپسی کبد (۹/۱۸/۸) بیمار مورد ردیابی قرار گرفت. هم‌چنین مشخص شد که (۲۱/۱۳/۸) نفر از بیماران مورد بررسی، دارای ژنوتیپ‌های مختلف در نمونه‌های پلاسما، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد خود می‌باشند. عفونت مخلوط، عفونتی است که فرد با دو و یا چند

می‌باشد،<sup>۲۶، ۲۷</sup> بنابراین میزان دقیق شیوع عفونت مخلوط در کشور ما ممکن است از تعداد برآورد شده در مطالعه حاضر بالاتر باشد. دومین کاستی که در مطالعه حاضر وجود داشت این بود که تنها ۴۸ بیمار اندیکاسیون انجام بیوپسی کبد را داشتند و مشخص شد که ۱۸/۸٪ از این بیماران دارای عفونت مخلوط با ویروس هپاتیت C هستند که نسبت قابل توجهی می‌باشد. این درصد بالای عفونت مخلوط احتمالاً به این دلیل است که هپاتوسیت‌ها مخزن اصلی ویروس هپاتیت C هستند. از آنجایی که انجام بیوپسی کبد برای تمام بیماران امکان‌پذیر نمی‌باشد، به نظر می‌رسد آزمایش ژنوتایپینگ روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به عنوان یک مخزن خارج کبدی ویروس هپاتیت C، بتواند بسیار کمک‌کننده و ارزشمند باشد.<sup>۲۷، ۲۸</sup>

مطالعه حاضر نشان می‌دهد بیمارانی که چندین بار انتقال خون داشته‌اند (هم‌چون بیماران مبتلا به تالاسمی و هموفیلی و غیره) گروه‌هایی در معرض خطر برای ابتلا به عفونت‌های مخلوط با ویروس هپاتیت C هستند. این گروه‌ها به درمان ضدویروسی پاسخ مناسبی نمی‌دهند و هم‌چنین فراوانی عود مجدد هپاتیت C در این گروه‌ها بالاست. به نظر می‌رسد برنامه‌ریزی درمانی برای عفونت هپاتیت C با توجه به ژنوتیپ ویروس موجود در پلاسما به عنوان هدف، ممکن است یکی از عوامل شکست درمان ضدویروسی باشد. بنابراین احتمال دارد ژنوتایپینگ ویروس هپاتیت C در نمونه سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و بیوپسی کبد روشی سودمند و قابل تأمل باشد.

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی عوامل ویروسی (هپاتیت و ...) دخیل در بیماری مزمن کبدی با علت ناشناخته" در مقطع دکترای تخصصی ویروس‌شناسی در سال ۱۳۸۹ و کد ۴۵۴/پ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است

عفونت با یک ژنوتیپ ویروس هپاتیت C، مانعی برای عفونت با ژنوتیپ‌های دیگر ویروس نمی‌باشد. بنابراین با مواجهه متعدد با ویروس هپاتیت C به خصوص در گروه‌های در معرض خطر (هم‌چون کسانی که دچار بیماری تالاسمی یا غیره هستند و انتقال خون مکرر داشته‌اند)، احتمال دارد که فرد دچار عفونت مجدد با ژنوتیپ دیگری از ویروس شود و در نتیجه دچار عفونت مخلوط با ویروس شود. هم‌چنین مشخص شده است که عفونت با یک استرین جدید ویروس هپاتیت C منجر به سرکوب ویروس قبلی در حد زیر محدوده تشخیص با آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) می‌شود مادامی که ویروس دیگر تحت درمان ضدویروسی قرار می‌گیرد و تحت کنترل در می‌آید، نتیجه درمان ضدویروسی را تغییر دهد.<sup>۲۹، ۳۰، ۳۱</sup>

در مطالعه حاضر شیوع عفونت مخلوط با ویروس هپاتیت C در نمونه پلاسمای بیماران ۲/۶٪، در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران ۶/۶٪ و در بیوپسی کبد بیماران ۱۸/۸٪ بود. گزارش شده است که عفونت مخلوط با ویروس هپاتیت C در بیماران مبتلا به عفونت هپاتیت C با روش آزمایش Type specific primers در حدود ۱٪ می‌باشد.<sup>۳۲، ۳۳</sup> هم‌چنین گزارشات متعددی وجود دارد مبنی بر این‌که در بیمارانی که دچار هموفیلی هستند و مکرر انتقال خون داشته‌اند، میزان عفونت مخلوط با ویروس هپاتیت C در حدود ۳۱-۱/۶٪ می‌باشد.<sup>۳۴، ۳۵</sup> در بررسی حاضر مشخص شد که درصد قابل توجهی از بیماران با ژنوتیپی از ویروس هپاتیت C در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی آلوده بودند که در نمونه بیوپسی کبد و پلاسمای آن‌ها قابل شناسایی نبود. همان‌طور که ذکر شد، در این مطالعه از کیت INNO-LiPA TM HCV II Kit برای انجام ژنوتایپینگ ویروس هپاتیت C استفاده شد که روشی بسیار حساس‌تر از روش ژنوتایپینگ توسط متد RFLP می‌باشد. یکی از مشکلات روش INNO-LiPA TM HCV II، تشخیص پایین عفونت‌های مخلوط

## References

1. Inamullah, Idrees M, Ahmed H, Sajid-ul-ghafoor, Ali M, Ali L, Ahmed A. Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan. *Viol J* 2011;8:16.
2. Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, López-Alcorocho JM, Pardo M, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis C virus replicates in the liver of patients who have a sustained response to antiviral treatment. *Clin Infect Dis* 2006;43(10):1277-83.
3. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13(17):2461-6.
4. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 2):321-8.
5. Yun Z, Lara C, Johansson B, Lorenzana de Rivera I, Sönnnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by

- phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 1996;49(3):155-60.
6. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42(4):962-73.
  7. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140(5):346-55.
  8. Xu DZ, Xie Y, Li ZQ. Clearance of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cell as a predictor of response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4(4):550-3.
  9. Vera-Otarola J, Barría MI, León U, Marsac D, Carvallo P, Soza A, et al. Hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cells of treatment naïve chronically infected patients. *J Viral Hepat* 2009;16(9):633-43.
  10. Kusaka S, Okusa T, Araki A, Fujiki K, Takashimizu I, Okayasu I, et al. Prediction of relapses after interferon-alpha therapy by hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1995;46(3):265-8.
  11. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Jang SJ, Vargas H, Rakela J. Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 1998;248(1):164-71.
  12. Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, de Lucas S, Ortiz-Movilla N, López-Alcorocho JM, et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54(5):682-5.
  13. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis* 2005;192(2):258-65.
  14. Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9(2):291-4.
  15. Mason WS, Xu C, Low HC, Saputelli J, Aldrich CE, Scougall C, et al. The amount of hepatocyte turnover that occurred during resolution of transient hepadnavirus infections was lower when virus replication was inhibited with entecavir. *J Virol* 2009;83(4):1778-89.
  16. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2259-66.
  17. Schröter M, Zöllner B, Schäfer P, Laufs R, Feucht HH. Comparison of three HCV genotyping assays: a serological method as a reliable and inexpensive alternative to PCR based assays. *J Clin Virol* 2001;23(1-2):57-63.
  18. White PA, Li Z, Zhai X, Marinos G, Rawlinson WD. Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* 2000;271(2):382-9.
  19. Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, Wilkinson J, Mack WJ, deGiacomo M, et al. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *J Infect Dis* 2007;195(1):124-33.
  20. Wietzke-Braun P, Maouzi AB, Mänhardt LB, Bickeböller H, Ramadori G, Mihm S. Interferon regulatory factor-1 promoter polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18(9):991-7.
  21. Jarvis LM, Watson HG, McOmish F, Peutherer JF, Ludlam CA, Simmonds P. Frequent reinfection and reactivation of hepatitis C virus genotypes in multitransfused hemophiliacs. *J Infect Dis* 1994;170(4):1018-22.
  22. Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, Yoshida CF, Wang Y, de Olim GA, et al. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2372-8.
  23. Antonishyn NA, Ast VM, McDonald RR, Chaudhary RK, Lin L, Andonov AP, et al. Rapid genotyping of hepatitis C virus by primer-specific extension analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5158-63.
  24. Boçsan IS, Neamtu A, Rădulescu A, Rafiroiu C, Suteu O, Pascu O, et al. The markers of hepatitis B, C and D viral infection in multiply transfused patients. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 1995;40(2):109-13.
  25. Isobe K, Imoto M, Fukuda Y, Koyama Y, Nakano I, Hayakawa T, et al. Hepatitis C virus infection and genotypes in Japanese hemophiliacs. *Liver* 1995;15(3):131-4.
  26. Qian KP, Natov SN, Pereira BJ, Lau JY. Hepatitis C virus mixed genotype infection in patients on haemodialysis. *J Viral Hepat* 2000;7(2):153-60.
  27. Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;79(10):6349-57.

## Investigating the presence of different hepatitis C virus genotypes in serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver biopsy specimens of patients with hepatitis C virus infection

Received: August 27, 2011 Accepted: October 12, 2011

### Abstract

Farah Bokharai-Salim Ph.D.<sup>1\*</sup>  
Hossein Keyvani Ph.D.<sup>1</sup>  
Farhad Zamani M.D.<sup>2</sup>  
Fatemeh Jahanbakhsh Sefidi  
Ph.D. student<sup>1</sup>  
Afsaneh Amiri M.D.<sup>2</sup>

1- Department of Virology, Tehran  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.

2- Gastroenterology and Liver  
Disease Research Centre, Tehran  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran

**Background:** Hepatitis C virus (HCV) is essentially considered as hepatotropic, but virus sequences have also been found in other important extrahepatic sites, including peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). This study was done to investigate the presence of mixed infection and the differences between hepatitis C virus genotypes in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and liver biopsy specimens in patients with hepatitis C virus infection.

**Methods:** One hundred and fifty two patients with established chronic hepatitis C infection attending Firouzgar Hospital, affiliated to Tehran University of Medical Sciences, from September 2008 to April 2010 were enrolled in the present study. After collecting plasma, peripheral blood mononuclear cell, and liver biopsy specimens, RNA was extracted from the samples and hepatitis C virus genotyping was performed using INNO-LiPATM HCV II kit. The hepatitis C virus genotyping was confirmed by sequencing the RT-nested PCR product of 5'-UTR fragments.

**Results:** The mean age of the participants was 31.2±16.9 years. Multiple hepatitis C virus genotypes were detected in 4 (2.6%) out of 152 plasma samples, 10 (6.6%) out of 152 peripheral blood mononuclear cell samples, and 9 (18.8%) out of 48 liver biopsy specimens. Hepatitis C virus genotypes were different in the plasma, PBMC, and liver biopsy specimens of 21 (13.8%) patients.

**Conclusion:** The present study shows that a significant proportion of patients with chronic hepatitis C infection are infected by multiple hepatitis C virus genotypes which may not be detectable in their plasma specimens.

**Keywords:** Genotype, Hepatitis C Virus (HCV), mixed infection.

\* Corresponding author: Department of Virology, Tehran University of Medical Sciences, Highway Hemmat, Tehran, Iran.  
Tel: +98- 21- 88602205  
E-mail: BokharaiFarah@gmail.com