مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۹۰، دوره سوم، شماره هشتم،صفحه ۴۲-۳۷

ارزیابی شیوع ویروس هپاتیت B ما بین بیماران همودیالیزی تهران بوسیله PCR

محمد حسن شاه حسینی[۱]، افروز دباغی زاده[۲]، الهام مسلمی[۳]، مجید رضا حق زارع[۴]، پریچهر یغمایی[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، گروه زیست شناسی
۴- بیمارستان فوق تخصصی عرفان

نویسنده مسؤول: افروز دباغی زاده. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی. Afrooz.dabaghi@gmail.com

دریافت: ۹۰/۱/۱۸ پذیرش: ۹۰/۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: میزان شیوع عفونت هپاتیت **B** (**HBV**) در بیماران همودیالیزی بیشتر از سایر اقشار جامعه می باشد. روشهای سرولوژیکی موجود و در دسترس تشخیص**HBV**، قابلیت تشخیص سریع و دقیق آلودگی را نداشته درحالیکه، روشهای نوین مولکولی مانند **PCR** ابزار کارآمدی برای ارزیابی میزان شیوع **HBV** در بیماران همودیالیز می باشد. هدف از این مطالعه تشخیص **PCR** ویروس هپاتیت **B** در نمونه های سرمی افراد همودیالیزی با نتایج الایزای مشخص است.

روش بررسی: در این مطالعه ۱۳٦ نمونه سرم، از بیماران همودیالیزی با سابقه مشخص از ۳ مرکز همودیالیز، جمع آوری گردید. **DNA** نمونه ها با استفاده از کیت **DNP** استخراج گردید، پس از بهینه نمودن تکنیک **PCR** برای ویروس هپاتیت **B**، حساسیت و ویژگی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. به دنبال تایید حساسیت و اختصاصیت، تست بهینه شده بر روی نمونه های بیماران انجام گرفت. محصول **PCR** بوسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۱.۵٪ ارزیابی شد. آمپلیکون بوسیله تعیین ترادف تایید گردید.

یافته ها: تست **PCR** بهینه شده دارای ویژگی بسیار بالایی بود بطوریکه به جز **DNA** ویروس هپاتیت **B** با سایر **DNA** های مورد مطالعه واکنشی نشان نداد، حساسیت تست تا ٤۰ پارتیکل ویروسی تعیین گردید. از بین ۱۳٦ نمونه مورد مطالعه در مجموع ۱۱ مورد (٪۸/۰۹) **PCR** مثبت تشخیص داده شدند که از این تعداد تنها ۱ مورد الایزا مثبت بود.

نتیجه گیری: مقایسه کاربرد **PCR** و الایزا بر روی نمونه های بیماران همودیالیزی نشان داد که حساسیت و اختصاصیت تکنیک **PCR** از تست های سرولوژیکی به کار رفته جهت غربالگری، مانند الایزا بسیار بیشتر است. با توجه به نتایج می توان بیان نمود لزوم جایگزینی **PCR** در تشخیص **HBV** به جای روشهای غربالگری متداول در مراکز همودیالیز اجتناب ناپذیر است.

واژه های کلیدی : **PCR** ، همودیالیز، هپاتیت **B**

www.SID.ir

مقدمه

هپاتیت B یکی از مهمترین بیماری های ویروسی است که در تمام نقاط دنیا از شیوع بالایی برخوردار است. بر اساس آخرین گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO) حدود ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان حامل ویروس هپاتیت B هستند و این بیماری پس از بیماری سل و مالاریا ، شایع ترین بیماری عفونی و مسری به حساب می آید (۴-۱). ابتلا به ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی از شیوع بالایی برخوردار است که مربوط به طول دوره درمان و تعداد واحدهای خون دریافتی می باشد و ضمنا انتقال بیمارستانی این ویروس از جمله عواملی است که منجر به انتشار آن می شود (۶و۵). گزارشات مبنی بر آن است که تا ۵۰ ٪ بیماران کلیوی که دیالیز می شوند به هپاتیت B مبتلا می شوند. در بیماران دیالیزی پاسخ های سیستم ایمنی ضعیف است و در معرض خطر بالای عفونت های هپاتیت هستند، عامل اصلی ابتلا به هپاتیت های ویروسی در بین بیماران همودیالیزی هپاتیت های B و C هستند(۷).

خطر عفونت هپاتیت B در بیماران همودیالیزی با انجام ایمونیزاسیون، تستهای دوره ای، ایزوله سازی بیماران عفونی و کاربرد ضدعفونی کننده ها کاهش یافته است، اما این مساله علی رغم تمهیدات بالا همچنان به عنوان یک مشکل جدی به حساب می آید(۳). با توجه به افزایش قابل ملاحظه تعداد بیماران همودیالیزی و با در نظر گرفتن این که، بیماران همودیالیزی در خطر بالای ابتلا به HBV بوده و همینطور پایین بودن پاسخ به واکسن در این بیماران، شناسایی ویرمیHBV در این بیماران برای کنترل انتقال این عفونت از طریق دستگاه های دیالیز حائز اهمیت است (۴).

حساس ترین روش های سرولوژیکی برای یافتن آنتی ژن های HBV و آنتی بادی های آن رادیوایمنواسی و الایزا است ، که واکنش بر مبنای برهم کنش اولیه بین آنتی ژن – آنتی بادی صورت می گیرد. وقوع موتاسیون در مولکول های آنتی ژن و یا آنتی بادی سبب کاهش حساسیت تشخیص این روش ها می شود (۱۰-۸) روش های تشخیص مولکولی بر مبنای جداسازی و تکثیر اسیدهای نوکلئیک ویروس شامل روش های PCR ، Hybridization ، Isothermal Amplification می باشند که قادر به تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی هستند (۱۲و۱۱).

در طی چندین سال اخیر ، PCR یک تکنیک تشخیصی و تحقیقاتی مهم و با ارزش برای تشخیص بسیاری از پاتوژنها در نمونه خون یا سرم گردیده است(۱۳) در مواردی که تشخیص موارد مثبت HBV با مقادیر پایین در نمونه بیمار با متدهایی مثل روش های سرولوژیکی مشکل یا غیر ممکن بوده ، PCR در زمینه تشخیص آنها موفق و موثر بوده است (۱۴). بنابراین مزیت بزرگ تکنیک PCR قابلیت شناسایی و تعیین عفونت در بیماران با ویرمی پایین است که با روش الایزا ممکن است تشخیص داده نشوند (۱۵). خطر ابتلا به هپاتیت B در بیماران همودیالیزی (بواسطه کاربرد دستگاه های همودیالیز مشترک) ، خطر ابتلا به سایر بیماری های ویروسی را هم بالا می برد. از آنجا که این ویروس یکی از شایع ترین عوامل عفونی در دو دهه اخیر بوده که تا کنون درمان قطعی برای آن بدست نیامده و تنها به واسطه شناخت افراد مبتلا و رعایت نکات بهداشتی می توان بیماری را کنترل و پیشگیری کرد، لذا کاربرد روشی جهت تشخیص سریع بیماری جهت جلوگیری از انتشار بیماری بسیار کمک کننده خواهد بود و به این ترتیب عامل بیماری زا در مراحل اولیه قابل شناسایی خواهد بود. از آنجایی که در حال حاضر تنها روش غربالگری در مراکز همودیالیز به منظور بررسی ابتلا به ویروس هپاتیت B روشهای سرولوژیک می باشد، در این مطالعه سعی شده است که کاربرد تکنیک PCR در تشخیص HBV در بیماران همودیالیزی مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

تهیه نمونه : برای این منظور ۱۳۶ نمونه سرم از بیماران مراجعه کننده به بخشهای همودیالیز بیمارستانهای مصطفی خمینی(۵۲) ، چمران(۵۴) و عرفان(۳۰) طی مدت ۳ ماه تهیه گردید. تاریخچه کلیه نمونه ها مشخص و سابقه ابتلا به هپاتیت و یا عدم ابتلا توسط مراکز همودیالیز بیان شده بود.

استخراج DNA از سرم : DNA ویروس HBV با کمک کیت DNP سیناژن (Cat:DN811530) از سرم بیماران استخراج شد.

پرایمرهای ویژه PCR: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه ویژه ناحیه آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (Pre S2) بودند. توالی پرایمرها به این ترتیب می باشد (۱۳).

Archive of SID
www.SID.ir

HBV Forward 5´CAA-GGT-ATG-TTG-CCC-GTT-TG 3´
HBV Reverse 5´AAA-GCC-CTG-CGA-ACC-ACT-GA3´

واکنش PCR: هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو (DNA استخراجی از سرم) ، ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR Buffer ، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی و عقبی 10 µM ، ۰/۷۵ میکرولیتر از MgCl2 50mM ، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP 10mM ،۰/۴ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 5u/µl در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می باشد. پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۳ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای چسبیدن ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل انجام شد.

مشاهده محصول PCR : محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ ٪ حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن ۱۰mg/ml) در بافر TBE 0/5 X الکتروفورز گردید.

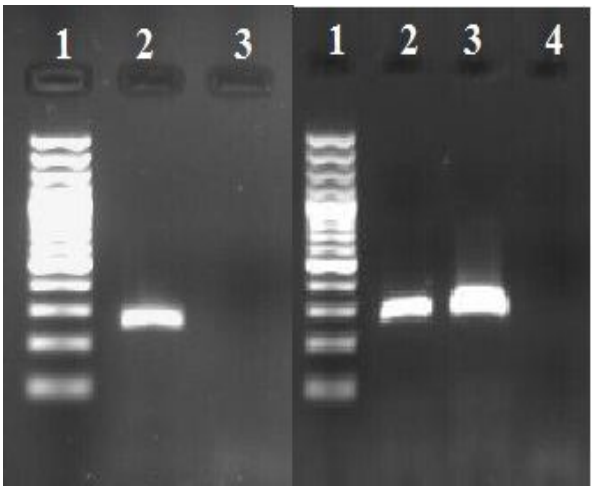
کلونینگ محصول PCR به عنوان کنترل مثبت: بعد از خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت T/Acloning فرمنتاس (cat:K1214) در وکتور pTZ57/R کلون گردید.

تعیین حساسیت و اختصاصیت تست PCR: به منظور تعیین حساسیت تست، رقت های مختلف DNA ویروس از ۴ میلیون تا ۴ پارتیکل ویروس تهیه گردید. جهت بررسی ویژگی از اسیدهای نوکلئیک موش (Mouse) ، انسان (Human) ، *توکسوپلاسماگوندی (Toxoplasma Gondii)* ، *ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus)* ، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium Tuberculosis)* ، *ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces Cervisiae)* ، *اشریشیاکلی (Escherichia Coli)* استفاده شد.

یافته ها

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ لود شد. اندازه قطعه بدست آمده با استفاده از پرایمرهای ویژه ۲۶۲ bp می باشد(شکل ۱a).

محصول PCR در پلاسمید pTZ57/R کلون شد. پس از جداسازی تک کلنی های سفید، DNA از آنها استخراج گردید و بوسیله روش PCR تایید شد(شکل ۱b).



شکل ۱a **شکل ۱b**

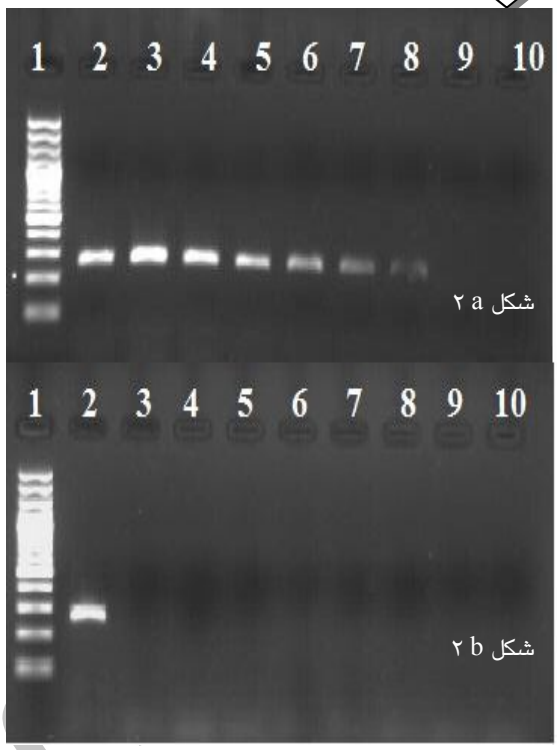
شکل ۱a :لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، ۲ : قطعه تکثیر شده ، ۳ : کنترل منفی. شکل۱b :لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs ، ۲ : کنترل مثبت ، ۳ : قطعه تکثیر یافته از پلاسمید ، ۴ : کنترل منفی

حساسیت PCR تا ۴۰ پارتیکل تعیین شد به طوری که در تیترهای کمتر از ۴۰ پارتیکل باندی مشاهده نشد (شکل ۲a). تست PCR دارای ویژگی بسیار بالایی می باشد به طوریکه فقط با DNA ویروس هپاتیت B واکنش نشان داد (شکل ۲b).

از ۵۲ نمونه سرم جمع آوری شده از بخش همودیالیز بیمارستان مصطفی خمینی ۷ مورد PCR مثبت و ۴۵ نمونه منفی گزارش شدند. تمامی این نمونه ها الایزا منفی بودند. ۲ نمونه از ۵۴ نمونه مربوط به بیمارستان چمران PCR مثبت و ۱ مورد الایزا مثبت بودند و در نهایت از ۳۰ نمونه بخش همودیالیز بیمارستان عرفان نیز ۲ مورد PCR مثبت گزارش شدند، تمامی این بیماران نیز دارای الایزا منفی بودند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲a ؛ لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100 bp DNA Ladder PLUs ، ۲: کنترل مثبت ، ۳: سرم حاوی ۴ میلیون پارتیکل ،۴: ۴۰۰۰۰۰ پارتیکل ، ۵ : ۴۰۰۰۰ پارتیکل ، ۶ : ۴۰۰۰ پارتیکل ، ۷ : ۴۰۰ پارتیکل ، ۸ : ۴۰ پارتیکل ، ۹: ۴ پارتیکل ، ۱۰: کنترل منفی. شکل ۲b ؛ لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100 bp DNA Ladder PLUs ، ۲: کنترل مثبت ، ۳: DNA موش، ۴: DNA انسان، ۵: DNA *اشرشیاکلی*، ۶: DNA *ساکارومایسس سرویزیه*، ۷: RNA *ویروس هپاتیت C* ، ۸: DNA *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ، ۹ : DNA *توکسوپلاسما گوندی* ، ۱۰: کنترل منفی

بحث

هپاتیت ناشی از HBV یکی از مشکلات بهداشتی درمانی عمده در جهان است، تقریبا ۲ میلیارد نفر از جمعیت جهان یعنی تقریبا یک سوم مردم دنیا به آن آلوده اند و سازمان بهداشت جهانی ۲-۱ میلیون مرگ در سال را بر اثر هپاتیت تخمین زده است. در ایران نیز طبق آخرین آمار رسمی در حال حاضر ۲/۵ میلیون نفر به ویروس هپاتیت B مبتلا می باشند(۱۶). بخش های همودیالیز از مراکزی است که به دلیل وجود وسایل و تجهیزات پزشکی، ماشین های همودیالیز و انجام فرایند همودیالیز که نیاز به دستیابی های مکرر به عروق خونی دارد متاسفانه محیط مناسبی برای شیوع عفونت های بیمارستانی به ویژه ابتلا به ویروس هپاتیت B می باشد (۱۷). در مطالعات مختلف شیوع عفونت نهفته HBV در بیماران همودیالیزی بین صفر تا ۵۸٪ گزارش شده است(۱۸). اگرچه روش های تشخیص سرولوژیکی HBV در حال حاضر به خوبی شناخته شده اند اما شاخص خوبی برای تشخیص عفونت ویروسی به حساب نمی آیند. بنابراین برای تشخیص دقیق عفونت، روش های مولکولی باید جایگزین روش های سرولوژیکی شوند (۱۹). در مواردی که تشخیص موارد مثبت HBV با مقادیر پایین در نمونه بیمار با متدهایی مثل روش های سرولوژیکی مشکل یا غیرممکن بوده، PCR در زمینه تشخیص آنها موفق و موثر بوده است (۲۰). بنابراین یکی از مزیتهای بزرگ تکنیک PCR قابلیت شناسایی و تعیین عفونت در مراحل اولیه است در حالیکه غالبا با روش الایزا امکان تشخیص آن وجود ندارد(۲۱). بنابراین شاید بتوان گفت مهمترین و بهترین سیستمی که در آن مولکول هدف افزایش تعداد می یابد تکنیک PCR است این تکنیک نه تنها می تواند برای تشخیص زود هنگام ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی استفاده شود بلکه می تواند جهت پی گیری و بررسی نتیجه درمان با داروی ضد ویروسی نیز مورد استفاده قرار گیرد (۲۲).

در سراسر دنیا مطالعات متعددی در ارتباط با شیوع ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی و عدم کارایی روشهای سرولوژیک در تشخیص به موقع ویروس به منظور جلوگیری از شیوع آن در بین بیماران همودیالیزی صورت گرفته است که از جمله می توان به موارد ذیل اشاره نمود(۲۵-۲۳). در سال ۲۰۰۶ Renata ، شیوع HBV را در بیماران همودیالیزی با PCR بررسی کرده و میزان آن را ۸/۲۹ ٪ گزارش نمود(۲۶). در سال ۲۰۱۰ تاجبخش با بررسی ۱۴۷۲به وسیله PCR ۷۵ مورد مثبت را گزارش نمود(۱۱). در سال ۲۰۱۰، Motta ، در یک مطالعه به منظور شناسایی HBV-DNA با استفاده ازتکنیک Semi-nested PCR، سرم ۱۰۰ بیمار HBsAg منفی تحت همودیالیز (که نصف آنها دارای آنتی بادی anti-HCV بودند) را مورد بررسی قرار دادند، HBV-DNA در ۱۵ نمونه شناسایی شد(۲۷). آقاخانی در سال ۲۰۱۰ مطالعه ای بر روی فراوانی عفونت نهفته ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی انجام دادند. HBV -DNA درپلاسمای بیماران دارای anti-HBc ایزوله ، به روش real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۸۹ بیمار همودیالیزی مورد مطالعه، ۱۸ نفر دارای anti-HBc بودند و در ۹ نفر از این ۱۸ بیمار HBV– DNA شناسایی شد. HBV– DNA در

www.SID.ir
Archive of SID

پلاسمای کلیه این بیماران کمتر از ۵۰IU/ml بود. آنها بیان کردند، غربالگری این دسته از بیماران در پیشگیری از انتقال عفونت HBV به سایرین مفید می باشد(۲۸).

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه، به ۳ گروه تقسیم بندی شدند. در گروه اول که شامل ۵۲ نمونه بود ۷۰ مورد PCR مثبت بودند، درحالیکه تمامی این نمونه ها الایزا منفی بودند. همان طور که در تعیین حساسیت تست مشاهده نمودیم، این روش توانایی انجام واکنش تا ۴۰ پارتیکل ویروس را داشت، بنابراین نتایج به دست آمده دور از انتظار نبودند. در گروه دوم از ۵۴ سرم بیمار بود، ۲ نمونه PCR مثبت شدند. در این گروه فقط ۱ مورد توسط تست الایزا مثبت گزارش شده بود. نتایج به دست آمده در این جمعیت نیز نشان دهنده حساسیت بالای روش های مولکولی نسبت به روش های سرولوژیکی می باشد. در گروه سوم هم که شامل ۳۰ سرم بیمار، ۲ مورد PCR مثبت گزارش شدند، تمامی این بیماران نیز دارای الایزا منفی بودند.

با توجه به نتایج به نظر می رسد که تکنیک PCR در مقایسه با تکنیک الایزا، از حساسیت و دقت بسیار بالایی برخوردار بوده به طوری که از ۱۳۶ نمونه بیمار تحت همودیالیز در ۳ مرکز همودیالیز در تهران تنها ۱ مورد با تست الایزا مثبت ارزیابی شده، در حالیکه ۱۱ مورد PCR مثبت شدند. به این ترتیب می توان شیوع HBV در این گروه بیماران را ۸/۰۹ ٪ با تست PCR و ۱/۳۶ ٪ با تست الایزا گزارش نمود.

بدین ترتیب می توان بیان کرد که تست PCR یکی از حساسترین روشهای تشخیص ویروس در سرم می باشد این تکنیک روشی دقیق ، اختصاصی و سریع و در عین حال قابل انجام در کلیه مراکز تشخیصی در سطح کشور به منظور تشخیص زود هنگام HBV می باشدکه پرداختن به آن بسیار مهم است و لذا این تکنیک به عنوان یک مکمل برای روش های سرولوژی جهت تشخیص و کنترل بیماری حائز اهمیت است(۳۱-۲۹).

نتیجه گیری

نظر به لزوم تشخیص سریع و زود هنگام ویروس هپاتیت B به ویژه در بیماران همودیالیزی و با توجه به نتایج تستهای الایزا و PCR می توان بیان کرد که تست PCR از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به تست الایزا برخوردار است به طوری که می تواند جایگزین مناسبی برای آن محسوب شود.

References

1- Reddy GA, Dakshinamurthy KV, Neelaparasad P, Gangadhar T, Lakshmi V. *Prevalence of HBV and HCV dual infection in patients on haemodialysis* . Indian J Med Microbiol. 2005; 23:41-43.
2- Fabrizi F, Martin P.*Hepatitis B virus infection in dialysis patients*. Am.J.Nephrol. 2000; 20:1-11.
3- Saha D , Agarwal SK. *Hepatitis and HIV infection during hemodialysis* . J Indian .Med. Assoc. 2001; 99:194-9.
4- Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. *Serological pattern ''anti-HBc alone'' Report on a workshop*. J Med Virol. 2000; 62:450–455.
5- Krastev ZA. *The return of Hepatitis B virus* .World J Gastroenterol.2006; 12(44):7081-7086.
6- Kohmoto M,Enomoto M,Tamori A,Habu D,Takeda T,Kawada N, Sakaguchi H, Seki S, Shiomi S. *Quantitive detection of Hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during Lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers* .J Med Virol. 2005; 75; 234-9.
7- Shahhosseiny MH. *Basic Molecular diagnosis*. Publisher: Islamic Azad University. 2005; pp:12-35
8- Dienstag JL. *Hepatitis B virus infection* .The New England journal of medicine .2008; 359.1486-1500.
9- Wang L, Shi L, Alam MJ, Geng Y, Li L. *specific and Rapid Detectin of Foodborne salmonella by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method*. Food Res Inte.2007; 41 (1):69-74.
10- Weiss JH, Wu B, Farrenkopf T, Schultz G, Song S. *Real time TagMan PCR detection and quantitation of HBV genotype A-G with the use of an internal quantitation standard*.J.Clin.Virol.2004; 30:86-93.
11- Tajbakhsh E, Momtaz H, Hamedi S. *Molecular detection of Hepatitis B virus (HBV)among Voluntary blood donors HBsAg positive*. Depar Microbiology. 2010; 4(13):1419-1423.
12- Landegren U. *A ligase mediated gene detection techniques*. Scince .1998; 241:pp.1077-1080.
13- Fattovich G. *Natural history of Hepatitis*. B.J Hepatol.2003; 39: 50-8.
14- Hohler T,Gerken G, Notghi A, Lubjohn R,Taheri H,Protzer U,Lohr HF,Schneider PM,Meyer zum Buschenfelde KH,Rittner C.(1997)LHADRB I.Hepatitis B .J Hepatol .26.pp.503-7.
15- Glynn SA,Kleinman SH,Schreiber GB,Busch MP,Wright DJ,Smith JW,Nass CC, Williams AE. *Trends in incidence and prevalence major transfusion-transmissible viral infections in US blood donors*. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). 2000; 284(2):238-40.
16- Alavian SM, Hajarzadeh B, Ahmadzadeh-Asl M, Kabir A, Bagheri-Landkarani K. *Hepatitis B virus Infection in Iran:A systematic Review*.Hepatitis Monthly.2008;8(4):281-294.
17- Recommendation for preventing Transmission of infections Among Chronic Hemodialysis units at a Glanceainection Vontrol Precaution for All Patients. CDC.2005.
Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. *Prevalence of occult HBV infection in haemodialysis patients with chronic HCV*. World J Gastroenterol. 2006 ;12(21):3420-4

Archive of SID

www.SID.ir

18- Shahhosseiny MH. *Basic Molecular diagnosis*. Publisher:Islamic Azad Univesity.2005;12-35.
19- Andveas ER, Stephan S, Nikoleta A. *Quantitative Assay of PCR – Amplified Hepatitis B virus DNA Using aperoxdase – Labelled DNA probe and enhandced chemiluminescence.*Clin Microbiolology. 1996;34(8):85-91.
20- Mori Y, Hirano T, Notomi T. *Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers.*BMC Biotechnology.2006; 3-6.
21- Vernet G. *Molecular diagnostics in virology*. Journal of Clinical Virology .2004; 31:239-247.
22- Shahhosseiny MH. *Basic Molecular diagnois*. Publisher:Islamic Azad University.2005:12-35.
23- Shahhosseiny MH. *Molecular diagnostics and laboratory: In vitro nucleic acid amplification techniques*. Azmayeshgahe pezeshki. 1386;10: pp:32-39
24- Reddy GA, Dakshinamurty KV, Neelaprasad P, Gangadhar T, Lakshmi V. Prevalence of HBV and HCV dual infection in patients on haemodialysis. Indian J Med Microbial.2005; 23(4): pp: 41-43.
25- Renata C Ferreira, Sheila A Teles, Marcia A Dias, Viviane R Tavares, Simonne A Silva, Selama A Glara FT. *Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006; 101(6): 689-692
26- Motta JS, Mello FC, Lago BV, Perez RM, Gomes SA, Figueiredo FF. *Occult hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant mutations in isolates from renal patients undergoing hemodialysis.* J Gastroenterol Hepatol; 2010: 25(1):101-6.
27- Aghakhani A, Banifazl M, Kalantar E, Eslamifar A, Ahmadi F, Razeghi E, Atabak S, Amini M, Khadem-Sadegh A, Ramezani A. *Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study.* Ther Apher Dial.2010; 14(3):349-53.
28- Busek S, Baba E, Tavares H, Pimenta L, Salomao A, Correa-Olivera R. *Hepatitis C and B Virus Infection in Different Hemodialysis Unit in Belo Horizonte Minas Gerais Brazil*.2002;97(6): 775-778.
29- Cabrerizo M, Batolome J, Desequera P, Caramelo C,Carreno V. *Hepatitis B Virus DNA in serum and Blood cells of Hepatitis B Surface Antigen-Negative Hemodialysis patients and staff*. Hepatol unit and Nephrology. 1997; 8: 1443-1447.
30- El-ottol A, Elmanama A, Ayesh BM. Prevalance and risk factors of Hepatitis B and C virus among haemodialysis patient in Gaza strip. Palestine.Virology journal.2010;7: 210.

Archive of SID

www.SID.ir