مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۷، زمستان۱۳۹۰، صفحات ۵۱-۴۲

# تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران مزمن هپاتیت *B* به روش *RealTtime PCR* و ارتباط آن با برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک

**اسکندر غلامی پریزاد ، الهه غلامی پریزاد، علی دلپیشه ، مصطفی نیک فر**

*نویسندگان:*

**اسکندر غلامی پریزاد(کارشناس ارشد بهداشت عمومی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)**
Eskandar Gholami Parizad (MSc)/ eskandar_parizad@yahoo.com
**الهه غلامی پریزاد(کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)**
Elaheh Gholami Parizad(MSc)/elahehparizad@gmail.com
**علی دلپیشه(دکتری اپیدمیولوژی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)**
Ali Delpisheh(phD)/alidelpisheh@yahoo.com
IlamUniversity of Medical Sciences,Department of Health
**مصطفی نیک فر(کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان)**
Mostafa Nikfar(MSc) / mostafa_nikfar
Islamic azad university of Lahijan

*نویسنده مسئول:الهه غلامی پریزاد(کارشناس ارشد میکروبیولوژی)
دانشگاه علوم پزشکی ایلام-دانشکده بهداشت-گروه بهداشت عمومی
تلفکس:۰۸٤۱۲۲۲۷۱۰۳
پست الکترونیکی:*elahehparizad@gmail.com*

Archive of SID

## چکیده :

**مقدمه** : هپاتیت مزمن*B* شایع ترین عفونت ویروسی مزمن شناخته شده ی بشری می باشد . قریب یک سوم مردم دنیا تاکنون به عفونت هپاتیت *B* مبتلا شدند ، بیش از چهارصد میلیون نفر حامل *HBV* در جهان هستند ، و از این تعداد حدود چهل میلیون نفر به سیروز کبدی و شصت میلیون نفر نیز به علت کارسینوما هپاتوسلولار فوت نموده اند . شیوع بیماری در جنوب شرقی آسیا از سایر مناطق جهان بیشتر است . برآورد می شود که تاکنون بیست و پنج میلیون نفر در ایران به عفونت *HBV* مبتلا شده باشند و حدود ۳ درصد حامل *HBV* در جامعه ایران وجود داشته باشد.
مقادیر *HBV-DNA* در ترشحات مختلف بدن از جمله سرم ، سرومن ، بزاق و غیره به عوامل ایمنولوژیک فردی و برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک بستگی دارد. این مطالعه برای اولین بار به منظور تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* در سرم وسرومن و ارتباط آن با برخی عوامل اپیدمیولوژیک در ایران انجام شده است .
**مواد و روش ها** : در این مطالعه ۷۰ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت *B* مزمن در گروه سنی ٤۰-۲۰ ساله که همگی از نظر *HBsAg* مثبت بودند به عنوان نمونه انتخاب شدند . در این بررسی برای تعیین مقدار *HBV-DNA* سرومن و سرم

www.SID.ir

بیماران از روش ملکولی کمی *Real time PCR* ، دستگاه $CFX_{96}^{TM}$ *(detection system Biorad PCR/USA)* و کیت تشخیصی *(aj Roboscreen – Germany)* استفاده گردید.

**یافته ها** : در این بررسی ٥٤/٣ درصد گروه مورد مطالعه مرد و ٤٥/٧ درصد زن بودند . ١٠٠ درصد بیماران مورد مطالعه حداقل یکسال از تشخیص ابتلاءشان به بیماری هپاتیت *B* گذشته بود . ٦١ نفر(٨٧/٢درصد) از بیماران در سرومن خود*HBV-DNA* داشتند. ١٩ نفر (٢٧درصد) تحت درمان و٥١ نفر (٧٣ درصد) هیچگونه دارویی دریافت نکرده بودند . ٥٨ نفر (٨٣ درصد) از بیماران متأهل بودند . میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن مردان $^{٦}$١٠ × ٨/٧٣ و زنان $^{٦}$١٠ × ٧/٤٤ بوده است . آزمون هموژنتی واریانس میانگین ها در گروه های سنی نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرومن در گروه های سنی مورد بررسی وجود دارد (*P*=٠/٠٠٣).

**بحث و نتیجه گیری** : استفاده از روش های ملکولی کمی می تواند وضعیت بیماران مبتلا به *CHB* را در مراحل مختلف بیماری به دقت مشخص نماید . نوع ترشحات بیمار از جمله سرم ، سرومن ، بزاق و غیره و همچنین برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک مانند جنسیت ، مصرف دارو ، سیستم ایمنی فرد و ... بر مقدار کپی *HBV-DNA* تأثیر گذار هستند ، هر چند بعضاً ممکن است از نظر تست های آماری این اختلاف ها معنی دار نباشند . بنابراین شناخت این عوامل و به کارگیری روش های نوین تشخیصی ، در کنترل و همه گیر شناختی بیماری هپاتیت *B* اهمیت بسیار زیادی دارند .

**کلید واژه ها** : *HBV-DNA* ، سرم ، سرومن ، *CHB* ، اپیدمیولوژیک ، *Real Time PCR* ، ایلام

Archive of SID

www.SID.ir

## مقدمه :

هپاتیت مزمن $B$ شایع ترین عفونت ویروسی مزمن شناخته شده ی بشری می باشد (۱). قریب یک سوم مردم دنیا تاکنون به عفونت هپاتیت $B$ مبتلا شده اند ، بیش از چهارصد میلیون نفر حامل $HBV$ در جهان وجود دارد که ، حدود چهل میلیون نفر به دلیل سیروز کبدی و شصت میلیون نفر نیز به علت کارسینوما هپاتوسلولار فوت نموده اند (۵ ،٤ ،۳و۲). شیوع بیماری در جنوب شرقی آسیا از سایر مناطق جهان بیشتر است . برآورد می شود که تاکنون بیست و پنج میلیون نفر در ایران به عفونت $HBV$ مبتلا شده باشند و میانگین حاملین این ویروس ۳-۲/۱٤ درصد در جامعه ایران باشد (۳۳،۳٤،۷،۱۵،٦ و۲). عفونت مزمن $HBV$ با دامنه وسیعی از تظاهرات کلینیکی همراه است که از یک حالت ناقل بدون علامت یا یک سابقه کبدی نرمال تا بیماری کبدی مزمن مانند سیروز و کارسینوما هپاتوسلولار را شامل می شود(۱۷،۱۸، ۱٤،۱۲ ،۱۱و۱۰). اکثر عفونت های هپاتیت $B$ تک گیر هستند و سیستم ایمنی بالغین آن را دفع می کند ولی در صورتی که مزمن شوند فرد در یکی از چهار فاز عفونی قرار می گیرد : تحمل پذیری ایمنی ، دفع ایمنی که در آن $HBeAg$ مثبت می گردد ، مرحله حاملین غیر فعال و سرانجام ، مرحله فعالیت دوباره $HBV$ می باشد که ویروس در بخش هایی از ژنوم خود دچار جهش شده که پیامدهای این موتاسیون می تواند منجر به منفی شدن $HBeAg$ و $HBsAg$ گردد(۲٤، ۲۳ ،۲۲ ،۲۱ ،۱٦ و٤). ویروس هپاتیت $B$ در ترشحات مختلف بدن از جمله خون ، ترشحات جنسی ، مایع آمینوتیک ، اشک ، ادرار ، مدفوع ، بزاق ، عرق و اخیراً نیز در سرومن گوش یافت شده است (۲۰، ۱۹، ۹ و۸) . عوامل متعدد ایمنولوژیک و اپیدمیولوژیک ممکن است در مقدار کپی $HBV\text{-}DNA$ در طول دوره بیماری $CHB$ موثر باشند که از جمله می توان به سیستم ایمنی ، سن ، شیوه زندگی ، مصرف دارو ، موتاسیون و ... اشاره نمود . این مطالعه اولین بار با هدف بررسی برخی از متغیرهای اپیدمیولوژیک که احتمالاً در مقدار کپی $HBV\text{-}DNA$ سرومن وسرم موثرند،در ایران طراحی و اجرا شده است .

## مواد و روش ها :

در این مطالعه ۷۰ بیمار مزمن هپاتیت $B$ که بیش از یکسال از ابتلا آنها به بیماری می گذشت و همگی $HBsAg$ مثبت بودند و در دامنه سنی ٤۰-۲۰ سال قرار داشتند انتخاب شدند .

۳۸ نفر از آنها مرد و۳۲ نفر زن بودند . از گروه مورد مطالعه نمونه های خون و سرومن گوش تهیه شد . از خون سرم جدا شد و نمونه های سرومن که با سواپ و قاشقک پلاستیکی جمع آوری شده بود ، در لوله های اپندورف استریل $1/5ml$ که حاوی $0/5ml$ نرمال سالین بود، ذخیره گردید . به این ترتیب، سرومن و سرم در $^oc$ ۲۰- قابل نگهداری تا سالها خواهد بود .

جهت انجام $PCR$کمی $(Real\ Time\ PCR)$ نیاز بود تا به استخراج $DNA$ ویروس از نمونه ها اقدام شود . بدین منظور از کیت استخراج $HBV$ با نام تجاری $QIAMP\text{-}DSP$ استفاده شد . نمونه های سرم مستقیماً و بدون هیچ تیماری ، بنا بر دستورالعمل کیت مذکور ، تحت عمل قرار گرفتند و $DNA$ استخراج شده در نهایت در لوله های اپندورف استریل جمع آوری شدند . اساس کیت استخراج بر مبنای فیلترتیوپ سلیکاژلی و یکسری محلولهای بافری – الکل بود . در مورد نمونه های سرومن ، از آنجا که معمولاً نمونه تکه ای و مومی شکل بود ، لازم شد تا تیمار پیش از استخراج انجام شود .بنابراین ابتدا ترکیب زیر که خاصیت لیز و هموژن کننده دارد ، تهیه شد :

$Tris\quad Cl\quad 500\ mM+EDTA20mM+NaCl10mM$

محلول فوق با $NaOH$ به $pH$=۹ رسانده شد . ۳۰$\mu l$ از نمونه سرومن همراه با تکهٔ تجزیه نشدهٔ آن و ۲۰ $\mu l$ پروتئیناز $K$ به ۱۵۰ $\mu l$ از ترکیب فوق اضافه و سپس به مدت ۱ ساعت در ٦۵ $^oc$ انکوبه شد و برای استخراج این ویروس از این ترکیب نیز از همان کیت استخراج $(QIAMP\text{-}DSP)$ استفاده گردید و ویروس استخراج شده در لوله های اپندورف جمع آوری گردید . برای انجام $Real\ Time\ PCR$ دستگاه مورد استفاده $(Bio\ Rad - CFX_{96}\ detection\ systemReal\ Time\ PCR)$ و

Archive of SID

www.SID.ir

کیـــــــت مخصـــــــوص – *(ajRoboscreen Germany)Real- Time* بود که بر طبق دسـتور کیـت اقدام شد . پروتکل حراتی استفاده شده به شرح جدول (۱) می باشد :

**جدول(۱) پروتکل حرارتی *Real Time PCR* با توجه به کیت مورد استفاده**

| *Step* | *Temp* | *Time* | *Repet* |
|---|---|---|---|
| *Taq activation* | *95* | *4 mint* | *1* |
| *Synthesis* | *57* | *1 mint* | *45* |
| *Melting* | *95* | *30 sec* | |
| *Fluorescence aqtivation* | *45* | *30 sec* | |

## یافته ها :

در این مطالعه ۱۰۰ درصد بیماران از نظر *HBsAg* مثبـت بودند. ۳۸ نفر(۵۴/۳) درصد از بیماران مرد و ۳۲نفر (۴۵/۷ درصد ) زن بودنـد . همـه بیمـاران *CHB* مـورد بررسـی حداقل یکسال از تشخیص ابتلاء شان به هپاتیت *B* گذشته بود . گروه سنی بیماران بین ۴۰-۲۰ سال بود که به چهـار گروه سنی مطابق جدول (۲) طبقه بندی شدند .

**جدول (۲)گروه بندی بیماران *CHB* در مطالعه *HBV-DNA* سرومن و سرم**

| گروه سنی | تعداد | درصد |
|---|---|---|
| ۲۴-۲۰ | ۱۴ | ۲۰ |
| ۲۹-۲۵ | ۱۰ | ۱۴/۳ |
| ۳۴-۳۰ | ۱۸ | ۲۵/۷ |
| ۴۰≤-۳۵ | ۲۸ | ۴۰ |
| جمع | ۷۰ | ۱۰۰ |

در این بررسی مقدار کپی *HBV-DNA* سـرومن و سـرم بیماران با استفاده از *Real Time PCR* مشخص گردید . از ۷۰ نفر بیمار *HBsAg* مثبـت ، ۶۹ نفـر (۹۸/۶درصـد) *HBV-DNA* مثبت بودند و فقط یک نفر (۱/۴ درصد) از نظـر *HBV-DNA* منفـی بـود . ولـی سـرومن ۶۱نفر(۸۷درصد) از همین بیمـاران حـاوی *HBV-DNA* بـود و از باقیمانـده بیمـاران ، ۹نفـر (۱۳ درصـد) *HBV-DNA* جدا نشد . نتـایج پـژوهش نشـان داد ، میـانگین و انحراف معیار کپی *HBV-DNA* سرومن و سـرم بیمـاران بدون توجه به گروه های سـنی چهارگانـه (جـدول۲) بـه ترتیب : سرم ($M$=۳/۴×۱۰$^{۸}$ ، б=۱/۲۴×۱۰$^{۹}$ کپی در میلی لیتر ) و سـرومن ($M$=۸/۱۴×۱۰$^{۶}$ ، б=۳/۸۲×۱۰$^{۷}$ کپـی در میلی لیتر ) بوده است . به علاوه بیشـترین میـانگین کپـی *HBV-DNA* سرم مربـوط بـه گـروه سـنی (۲۴-۲۰) و سرومن مربوط به گـروه سـنی (۳۴-۳۰) بـوده اسـت کـه مقادیر آنها در جدول (۳و۴) آمده است .

Archive of SID

www.SID.ir

جدول (۳). مقایسه میانگین و انحراف معیار کپی در میلی لیتر ***HBV-DNA*** سرم بیماران با توجه به گروه سنی آن ها در مطالعه ایلام

| متغیر های آماره / گروه سنی | تعداد | میانگین کپی در میلی لیتر-*HBV DNA* سرم | انحراف معیار کپی در میلی لیتر-*HBV DNA* سرم | حدود اعتماد ۹۵درصد | | مینیمم کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم | ماکزیمم کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | حدپایین | حدبالا | | |
| ۲۰-۲٤ | ۱٤ | ۵/۵۵×۱۰^۸ | ۲/۰۳×۱۰^۹ | -٦/۲×۱۰^۸ | ۱/۷۳×۱۰^۹ | ۲/۸۵×۱۰^۳ | ۷/٦×۱۰^۹ |
| ۲۵-۲۹ | ۱۰ | ۲/۵×۱۰^۸ | ۵/۳۵×۱۰^۸ | -۱/۳٦×۱۰^۸ | ٦/۲۸×۱۰^۸ | ۲/۰۵×۱۰^۳ | ۱/۵۱×۱۰^۹ |
| ۳۰-۳٤ | ۱۸ | ٤/٦×۱۰^۸ | ۱/٦۳×۱۰^۹ | -۳/٤۸×۱۰^۸ | ۱/۲۷×۱۰^۹ | ۱/۵٤×۱۰^۲ | ٦/۹×۱۰^۹ |
| ۳۵-≤٤۰ | ۲۸ | ۹/۷۵×۱۰^۷ | ۳/۳۱×۱۰^۸ | -۳/۰۷×۱۰^۷ | ۲/۲٦×۱۰^۸ | ۵/۵۱×۱۰^۲ | ۱/۵۰×۱۰^۹ |
| جمع | ۷۰ | ۳/٤×۱۰^۸ | ۱/۲٤×۱۰^۹ | ۷/۵٤×۱۰^٦ | ٦×۱۰^۸ | ۱/۵٤×۱۰^۲ | ۷/٦×۱۰^۹ |

جدول (٤) . مقایسه میانگین و انحراف معیار کپی ***HBV-DNA*** در میلی لیتر سرومن بیماران آن با توجه به گروه سنی آنها در مطالعه ایلام

| متغیر های آماره / گروه سنی | تعداد | میانگین کپی در میلی لیتر-*HBV DNA* سرومن | انحراف معیار کپی در میلی لیتر-*HBV DNA* سرومن | حدود اعتماد ۹۵درصد | | مینیمم کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن | ماکزیمم کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | حدپایین | حدبالا | | |
| ۲۰-۲٤ | ۱٤ | ۱/٦٦×۱۰^۷ | ۵/۵×۱۰^۷ | -۱/۵×۱۰^۷ | ٤/۸۳×۱۰^۷ | ۱/۵٤×۱۰^۲ | ۲/۰۷×۱۰^۸ |
| ۲۵-۲۹ | ۱۰ | ۳/۸×۱۰^۵ | ۱/۱×۱۰^٦ | -٤×۱۰^۵ | ۱/۱٦×۱۰^٦ | ۱×۱۰^۰* | ۳/۵×۱۰^٦ |
| ۳۰-۳٤ | ۱۸ | ۱/۸۱×۱۰^۷ | ۵/۷۵×۱۰^۷ | -۱×۱۰^۷ | ٤/٦۷×۱۰^۷ | ۱×۱۰^۰ | ۲/۳×۱۰^۸ |
| ۳۵-≤٤۰ | ۲۸ | ۲/۷۷×۱۰^۵ | ۱/۱۲×۱۰^٦ | -۱/۵۷×۱۰^۵ | ۷/۱×۱۰^۵ | ۱×۱۰^۰ | ۵/۷٤×۱۰^٦ |
| جمع | ۷۰ | ۸/۱٤×۱۰^٦ | ۳/۸۲×۱۰^۷ | ۹۷×۱۰^۵ | ۱/۷۲×۱۰^۷ | ۱×۱۰^۰ | ۲/۳×۱۰^۸ |

* *non detected=<10 copy /ml*

مینیمم کپی *HBV-DNA* سرم مربوط به گروه سنی (٤۰≤ -۳۵سال) و ماکزیمم کپی مربوط به گروه سنی (۲٤-۲۰) بوده است .

آزمون هوموژنتی واریانس میانگین ها *(Test of Homogenetiy Variances)* نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرم در گروه های سنی مورد بررسی وجود ندارد ($P$=۰/۰۷٦ )، ($df_2$=٦٦ و $df_1$=۳).

مینیمم کپی *HBV-DNA* سرومن در گروه سنی (۲٤-۲۰) ساله ۱/۵٤×۱۰^۲ و در سایر گروه های مورد بررسی کپی قابل قبولی جدا نشد . ماکزیمم کپی *HBV-DNA* سرومن مربوط به گروه سنی (۳٤-۳۰) ساله و مقدار آن ۲/۳×۱۰^۸ بوده است .آزمون هوموژنتی واریانس میانگین ها *(Test of Homogenetiy variances)* نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرومن در گروه

Archive of SID

www.SID.ir

هـای سـنی مـورد بررسـی وجـود دارد .($P$=۰/۰۰۳) ، ($df_1$=۳ ، $df_2$=٦٦)

آزمون *(t)* میـانگین کپـی *HBV-DNA* سـرومن و سـرم بیماران بر حسب جنس نشان داد کـه بـین میـانگین کپـی *HBV-DNA*سرم گروه زنان بیمار با مردان بیمار اختلاف معنی داری وجود ندارد ($P$=۰/۹٦۷) به علاوه بین میانگین کپی *HBV-DNA* سرومن ، در گروه زنان و مردان بیمـار نیز اختلاف معنی دار نبود .($P$=۰/۸۸۹)

نتایج پژوهش نشان داد که ۵۸ نفـر(۸۳درصـد) از بیمـاران مورد بررسی متأهل و ۱۲ نفر(۱۷ درصـد) مجـرد بودنـد . شاخص تأهل به عنوان یکی از متغیرهای انتشار بیماری به همسـر و دیگـر افـراد خـانواده از اهمیـت بـالایی در اپیدمیولوژی بیمـاری هپاتیـت $B$ برخـوردار اسـت . ایـن موضوع زمانی اهمیتش مضاعف مـی شـود کـه جامعـه از فرهنگ بهداشتی و سلامت مناسبی برخوردار نباشد .

در این مطالعه مشخص گردید ۵۱نفر(۷۳ درصد) از بیماران *CHB* داروی ضـد هپاتیـت $B$ مصـرف نکـرده انـد و در مقابل ۱۹نفر(۲۷درصد) در مقاطعی از بیماری تحت درمان ضد ویروس *(HB)* قرار گرفته بوده اند .

نتایج آزمون *(t)* میانگین و واریـانس کپـی *HBV-DNA* سرومن و سرم مربوط به دو گروه، شامل گروهی که تحت درمان ضد ویروس هپاتیت قرار گرفته بودند با گروهی که در دوره بیماری هـیچ درمـانی مصـرف نکـرده بودنـد در جدول (۵و٦) آمده است .

جدول(۵) نشان می دهد که بین میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم بیمارانی که دارو مصرف می کردند بـا آنانی که دارو مصـرف نمـی کردنـد اخـتلاف معنـی داری وجود ندارد ($P$=۰/۱۸۸).

آزمون واریـانس کپـی در میلـی لیتـر *HBV-DNA* سـرم بیمارانی که دارو مصرف می کردنـد بـا بیمـارانی کـه دارو مصرف نمـی کردنـد ، اخـتلاف معنـی دار وجـود داشـت ($P$=۰/۰۰۰) . بنابراین واریانس دو گروه با هم برابر نیستند.

جدول ٦ نشان می دهد که ، بین میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن دو گروه بیماران ، با مصرف دارو و بـدون مصـرف دارو اخـتلاف معنـی دار وجـود نـدارد ($P$=۱۰٦).

ولی بین واریانس میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن بیمارانی که دارو مصرف می کردند بـا گروهـی از بیماران که دارو مصـرف نمـی کردنـد اخـتلاف معنـی دار وجود داشت به عبارت دیگر واریانس میانگین دو گروه بـا هم برابر نیستند ($P$=۰/۰۰۰).

**جدول(۵) . میانگین ، انحراف معیار و واریانس کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم بیماران مبتلا به هپاتیت *B* مزمن بر حسب مصرف دارو**

| آماره / وضعیت مصرف دارو | تعداد | میانگین کپی در میلی لیتر *HBV_DNA* سرم بیماران | انحراف معیار کپی *HBV-DNA* سرم بیماران | آزمون برابری میانگین | | | آزمون برابری واریانس | | حدود اعتماد ۹۵ درصد | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | *T* | *df* | *Pu* | *F* | *Pu* | حد پایین کپی *HBV-DNA* | حد بالای کپی *HBV-DNA* |
| مصرف دارو | ۱۹ | ۱×۱۰^۸ | ۲/۳×۱۰^۸ | ۱/۳٦۸ | ۱۸ | ۰/۱۸۸ | ۲۰/۹٤۱ | ۰/۰۰۰ | −۳/۸۳×۱۰^۸ | ۱/۸۲×۱۰^۹ |
| عدم مصرف دارو | ۵۱ | ۸/۳×۱۰^۸ | ۳/۵×۱۰^۹ | | | | | | | |

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦. میانگین ، انحراف معیار و واریانس کپی در میلی لیتر ***HBV-DNA*** سرومن بیماران مبتلا به هپاتیت ***B*** مزمن بر حسب مصرف دارو

| آماره / وضعیت مصرف دارو | تعداد | میانگین کپی در میلی لیتر ***HBV_DNA*** سرومن بیماران | انحراف معیار کپی ***HBV-DNA*** سرومن بیماران | آزمون برابری میانگین | | | آزمون برابری واریانس | | حدود اعتماد ۹۵ درصد | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ***T*** | ***df*** | ***Pu*** | ***F*** | ***Pu*** | حد پایین کپی ***HBV-DNA*** | حد بالای کپی ***HBV-DNA*** |
| مصرف دارو | ۱۹ | ٦/٥×۱۰^٥ | ۲/٦×۱۰^٦ | ۱/۷۰۲ | ۱۸ | ۰/۱۰٦ | ٤۱/٦۹٥ | ۰/۰۰۰ | -٦/٥×۱۰^٦ | ٦/۲×۱۰^۷ |
| عدم مصرف دارو | ٥۱ | ۲/۸×۱۰^۷ | ۷×۱۰^۷ | | | | | | | |

## بحث :

کمیت سنجی *HBV-DNA* به روش مولکولی *Real Time PCR* در پایش مراحل بیماری و بازدهی درمان در بیماران *CHB* بسیار مفید و رهگشا می باشد.

این روش با وجود پایین بودن سطح *HBV-DNA* در ترشحات مختلف بدن امکان تشخیص *HBV* را در بیماران مزمن افزایش می دهد و به عنوان یک ابزار مهم در تحقیق کاربرد دارد (۲۷، ۲٦ و ۲٥).*HBV-DNA* از ترشحات مختلف بدن مانند خون ، مدفوع ، ادرار ، صفرا ، عرق ، اشک ، بزاق ، منی ، شیر پستان ، مایع مغزی نخاعی ، ترشحات واژن ، مایع آمینوتیک و سرومن جدا شده است (۹، ۸ و ۷) . ایران یکی از مناطق با شیوع متوسط هپاتیت *B* بوده و برآورد می شود که حدود ۳٥ درصد از ایرانیان با این ویروس مواجه شده باشند . تقریباً ۳ درصد مبتلا به حامل مزمن بوده و میزان *HBsAg* مثبت در برخی مناطق مانند جی پیسی شهر کرد حدود ۱٥/٥ درصد می باشد (۳٤، ۳۳و ۳۲).

در این بررسی ۷۰ بیمار *CHB* که حداقل یکسال از تشخیص ابتلاءشان به هپاتیت *B* گذشته بود ، از گروه سنی ٤۰-۲۰ ساله برای ورود به مطالعه انتخاب شدند . کلیه بیماران *HBsAg* مثبت بودند نمونه های سرومن و سرم از آنها تهیه شد و با استفاده از روش مولکولی کمی *Real Time PCR* که از حساسیت بالایی برخوردار است ، مقدار کپی *HBV-DNA* آن ها مشخص و جدا گردید (۳۰، ۲۹ و ۲۸).

در این مطالعه مشخص گردید که ٦۹ نفر( ۹۸/٥درصد) از بیماران *HBsAg* مثبت نمونه های سرم خون شان از نظر *HBV-DNA* مثبت بودند . نمونه های سرومن ٦۱نفر (۸۷ درصد) از این بیماران حاوی *HBV-DNA* بودند .

میانگین کپی *HBV-DNA* سرم بیماران مورد بررسی در تمام گروه های سنی چهارگانه (جدول ۳) با وجود مقادیر کپی *HBV-DNA* متفاوت ، اختلاف معنی داری وجود نداشت. مقایسه میانگین مقدار کپی *HBV-DNA* سرومن در گروه سنی چهارگانه (جدول٤) نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین میانگین *HBV-DNA* گروه های سنی وجود ندارد ولی در آزمون هموژنتی واریانس میانگین ها این اختلاف معنی دار بوده است (*P*=۰/۰۰۳) میانگین *HBV-DNA* سرومن و سرم (۷۰) بیمار مورد بررسی به ترتیب : (*Ms*= ۳/۰٤×۱۰^۸ و *M<sub>C</sub>* =۸/۱٤ ×۱۰^٦) کپی در میلی لیتر بوده است .

نتایج بررسی *(Eui- kung gohi et al)* در کره در سال ۲۰۰۸ نشان داد که صددرصد بیماران *HBsAg* مثبت مورد مطالعه از نظر *HBV-DNA* سرم مثبت بودند ، در صورتی که فقط از ٦٦ درصد نمونه های سرومن آن ها *HBV-DNA* جدا گردید . میانگین کپی *HBV-DNA*

Archive of SID

www.SID.ir

سرومن و سرم آن ها به ترتیب ($Ms= ۳/۷\times۱۰^{۶}$ و $Mc=۴\times۱۰^{۴}$) بوده است (۲۰).

یافته های بررسی *(Kalcioglu MT et al)* در سال ۲۰۰۴ مشخص نمود که از ۴۰ بیمار *HBsAg* مثبت ، سرم تمام آن ها از نظر *HBV-DNA* مثبت بوده است . در صورتی که از نمونه های سرومن همین بیماران فقط از ۱۱ نمونه (۲۷/۵ درصد) با استفاده از روش *HBV-DNA , Real Time PCR* جدا شده بود . میانگین کپی در میلی لیتر سرومن و سرم در بررسی *(Kalcioglu MT et al)* به ترتیب ($Ms= ۲/۴\times۱۰^{۷}$ و $Mc= ۱/۲\times۱۰^{۴}$) نشان داده شد (۸).

مطالعه *(AKI , Abes et al)* که بر روی سرم ۴۰ بیمار *CHB* انجام گرفت ، نشان داد که میانگین کپی *HBV-DNA* ۸ نمونه در چهار بار آزمایش $۴/۳\times۱۰^{۸}$ بوده است (۳۱).

مقایسه نتایج مطالعه ایلام با بررسی های *(Eui – kungohi et al)* و *(Kalcioglu MT et al )* در خصوص جداسازی *HBV-DNA* از سرم افراد *HBsAg* مثبت نشان می دهد که در بررسی اخیر از ۹۸/۵ درصد افراد ، ولی در مطالعات فوق الاشاره از صددرصد افراد ، *HBV-DNA* جدا شده است . این تفاوت نتیجه می تواند مربوط به یک مورد *CHB* تحت درمان در مطالعه ایلام باشد ، که از وی *HBV-DNA* جدا نگردید.

نتایج جداسازی *HBV-DNA* از سرومن بیماران در مطالعه اخیر ، در مقایسه با نتایج بررسی های *(Eui – kungohi etal)* و *(Kalcioglu MT et al )* مشخص شده است که مطالعه ایلام ۸۷ درصد ، *(Eui)* و همکاران ۶۶ درصد و *Kalcio* و همکاران ۲۷/۵ درصد ، *HBV-DNA* مثبت بوده اند . دلایل تفاوت نتایج سرومن در مطالعه اخیر با دو مطالعه دیگر ممکن است ناشی از کیفیت نمونه گیری سرومن ، نوع کیت به کار گرفته شده ، نوع دستگاه *Real Time PCR* و یا دقت عمل متفاوت ، در مراحل مختلف آزمایش *(Real Time PCR)* باشد .

مقایسه میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* زنان و مردان در نمونه های سرومن و سرم نشان داد ، با وجود تفاوت آشکار در مقدار *HBV-DNA* نمونه های سرومن و سرم دو جنس ، از نظر آماری این اختلاف معنی دار نبوده است (*Pc*=۰/۸۸۹ و *Ps*=۰/۹۶۷). به علاوه بین واریانس های مقدار کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم دو جنس نیز ، اختلاف معنی داری وجود نداشت (*Pcv*=۰/۸۵۹ و *Psv*=۰/۸۱۹) .

همچنین حد بالا و پایین کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم دو جنس به ترتیب (سرم زنان و مردان = $۶/۲\times۱۰^{۸}-۵/۸۷\times۱۰^{۸}$ ، سرومن زنان و مردان = $۱/۷۱\times۱۰^{۷}-۱/۹۸\times۱۰^{۷}$) بوده است (*P*<۰/۰۵). به عبارت دیگر جنسیت بیماران *CHB* نتوانسته است اختلاف آماری معنی داری بین مقدار کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم این مطالعه نشان دهد .

نتایج مطالعه اخیر نشان داد ، میانگین کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیمارانی که در طول بیماری داروی ضد *HBV* مصرف کرده بودند با آنانی که هیچ دارویی مصرف نکرده بودند اختلاف معنی دار وجود ندارد (*Ps*=۰/۱۸۸ و *Pc*=۰/۱۰۶ ) ولی بین واریانس کپی های *HBV-DNA* نمونه های سرومن و سرم ، این دو گروه اختلاف معنی دار بوده است (*Ps*=۰/۰۰۰ و *Pc*=۰/۰۰۰) . میانگین کپی *HBV-DNA* بین دو گروه بیماران ( عدم مصرف دارو ، با مصرف دارو) در سرومن و سرم به ترتیب : سرم ( عدم مصرف دارو = $۸/۳\times۱۰^{۸}$ کپی در میلی لیتر، با مصرف دارو = $۱\times۱۰^{۸}$کپی در میلی لیتر) در آزمایشات نشان داده شد .

## نتیجه گیری :

کاربرد روش های مولکولی کمی در سنجش مقدار کپی *HBV-DNA* ، می تواند در پایش مراحل بیماری و بازدهی درمان بیماران *CHB* ، بسیار مفید و رهگشا باشد . مطالعه اخیر که با استفاده از روش ملکولی *Real Time PCR* برای تشخیص و تعیین مقدارکپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران *CHB* در ایلام انجام شد نسبت به سایر مطالعات مشابه در خصوص سرومن ، میزان موارد مثبت *HBV-DNA* بیشتری را نشان می دهد (۸۷ درصد). مطالعه اخیر نشان داد متغیرهای اپیدمیولوژیک مانند گروه های سنی ، جنسیت و مصرف دارو با وجود تأثیرگذاری بر مقادیر کپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران ،

Archive of SID

www.SID.ir

اختلاف آماری معنی داری را در این بررسی ایجاد نکـرده است .

## فهرست منابع :


1. *Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Brechot C, Pol S,Michel ML. Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carries . Vaccine 2006; **24** :4482-9.*
2. *Redeker AG . Viral hepatitis : clinical as pects AM J Med Sci 1975,270:9-16.*
3. *Shi VH, Shi Ch. Molecular characteristic and of chronic hepatitis B .World Gasetrology2009;**15**(25) :3099-3105.*
4. *Macmahon BJ . Epidemiology and natural history of hepatitis B . Semin Liver Dis 2005;**25** (1): 3-8.*
5. *Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology , disease burden treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat 2004 ; **11**:97-107.*
6. *Gish RG , Gadano AC. Chronic hepatitis B , current epidemiology in the Americas and implification for management . J Viral Hepat2006;**13**:187-89.*
7. *Gastaud P, Badouin CH, Ouzan D. Detection of HBs antigen , DNA polymerase activity and hepatitis B virus DNA in tears : relevance to hepatitis B transmission by tears .BrJ ophthulmol1989;**73**:333-6.*
8. *Kalcioglu MT, Durmza R, Ozturan O, Bajindir Y, Direkel S. Does cerumen have a risk for transmission of hepatitis B?. INC Laryngoscope2004;**114** :577-80.*
9. *Towers CV, Asrat T, Rumney p. The presence of hepatitis B surface antigen and deoxy ribonucleic acid in amniotic fluid and cord blood . AmJ Obstet Gynecol 2001; **184**:1514-20.*
10. *Knutsson M, Kidd-Ljunggren K . Urine from chronic hepatitis B virus carriers : implications for in fectivity . J Med Virol 2000 **; 6**:1720.*
11. *Ileje UH, Yang HI, SU J, Jen CL, You Sh, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis viral load.Gastroenterolo 2006;**130**: 678-86.*
12. *Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus – induced oncogenesis .Worl J Gastroenterol 2007;**13**:74-81.*
13. *Elgouhari HM, Abu–Rajab Tamimi TI, Carey WD . Hepatitis B virus infection : understanding its epidemiology course and diagnosis . cleve clin J med 2008; **75**:881-89.*
14. *Chen CJ, Yang HI, SUJ, et al . Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum haptitis B virus DNA level .JAMA 2006 ;**296**:65-73.*
15. *Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B virus : inactive carriers . Virol J 2005 ; **2**:82.*
16. *Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidottil G, Chisari FV, Jones J, Hughes J , Milich DR . A function of the hepatitis B virus Precore protein is to regulate the immune response to the coreantigen . Pronatl Acad Sci USA2004 ;**101**:14913-14918.*
17. *Lee WM . hepatitis B virus infection . N Engl J Med 1997; **337**:1733-1745.*
18. *He VL, Zhao YR, Zhang SL, Lin SM. Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection . World J Gastroenterol 2006;**12**:4788-4793.*
19. *Victoria Fdus, Oliverra CM, Victoria MB, Victoria CB, Ferrei LC. Characterization of HBeAg – negative*


Archive of SID

www.SID.ir

*chronic hepatitis in western Brazillian Amazonia .Bra J Infec Dis 2008; **12**:27-37.*

*20. GhO EU-KY, Son Bo-Y , Kong So- Ke, Chon KY-MY , Cho KY -Su . Analysis of Hepatitis B virus in the cerumen and otorrhea of chronic HBV –infected patients : is there a hepatitis B virus infectivity?. J Otology & Neurology 2008; **29**:929-932.*

*21. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, et al . Association between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepato cellular carcinoma . J Natl cancer Inst 2008;**100**: 1134-1143.*

*22. Mahtab MA, Rahman S , Khan M , Karim F. Hepatitis B – virus genotypes : an over view . Hepatobiliary Pancrat Dis Int 2008 ;7 :457-64.*

*23. Maruyama T, Kuwata S, Koike K , Iino S, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K , et al. Precore wild – type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion : no association between genome conversion and seroconversion . Hepatolo1998; **27**:245-53.*

*24. Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutation in the core promoter and precore region during hepatitis Be antigen serroconversion . Hepatolo 1999 ; **29**:976-984.*

*25. Chu, CJ, LOK AS . Clinical utility in quantifying serum HBV DNA levels Using PCR assays. J Hepatol2002 ; **36**:549-51.*

*26. Lok AS, Heathcote EJ, Hofnagle JH. Management of hepatitis B : 2000 summary of a work shop . Gastroenterol2001; **120**:1828-53.*

*27. Paraskevis DC, Haidu N, Tassopoulos M, Ratopoulodu D, Tsantoulas H, papachistou V, Sypsa & Hatzakis A . Development and assessment of a novel Rea-l Time PCR assay for quantitation of HBV DNA . J Virol Methods 2002; **103**: 201-12.*

*28. Hendrisk DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, et al . Quantitation of HBV DNA in human serum using branched DNA Signal amplification assay . AMJ clin pathol 1995 ;**104**:537-46.*

*29. HO SKN, Chan TM.An overview of assy for serum HBVDNA .clin lab 2000;**46**:609-14.*

*30. Sum SM ,Wong DKH, Yuen MF, Yuan HJ, YUJ, Lai CH, et al . Real time PCR assay using molecular be a confor guantitation of Hepatitis B virus DNA. J of Clin Microbiol 2004 ;**42**(8) :3438-40.*

*31. AKI ABE, Inou Ek , Tanaka T, Kato J, Kajijama N, Kawaguchi R , et al . Quantitation of hepatitis B virus Genomic DNA by Realtime Detection PCR , Journal of Microbiol1999; 2899-2903.*

*32. Hosseini ASL, Alaviyan SM, Mohammadnejad M . High prevalence of HBV , HCV and HIV infection in gypsy papulation residingi shahr-e cord . Arch Iran Med 2004 **;** 7:20-2.*

*33. Poustchi H , Mohammadnejad M , Malekzadeh R . Hepatitis B virus infection in Iran .IraninJ of clin infec Dise 2007;**2**(1) :37-51.*

*34. Alaviyan SM, Hajarizaddeh B, Ahmadzad ASL, Kabir A, Bagheri –Lan Karani K. Hepatitis B virus infection in Iran : a systematic review .Hepat 2008;**8**(4):281-294.*

Archive of SID

www.SID.ir