مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره پانزدهم ، شماره اول ، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۷۸-۷۴

بررسی عفونت نهفته هپاتیت "ب" در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت

محمد کاظمی عرب آبادی*[۱]، دکتر عباسعلی پورآذر[۲]، دکتر منصور صالحی[۳]، دکتر عبدا... جعفرزاده[۴] ، فرزاد عریضی[۵]، کیوان شریعتی نژاد[۶]، ونوس خوشخویی[۷]، ابراهیم رضازاده زرندی[۸]، دکتر غلامحسین حسن شاهی[۹]، احمد شبانی زاده[۱۰]، علی راوری[۱۱]

چکیده

مقدمه: خطر انتقال بیماریهای عفونی از طریق انتقال خون به میزان زیادی در طی سالهای اخیر کاهش پیدا کرده است. اما با این وجود یکی از هدفهای اصلی انتقال خون به صفر رساندن احتمال انتقال بیماریهای عفونی می باشد. آزمایش رایج برای شناسایی خونهای آلوده به ویرووس هپاتیت B (HBV) تعیین آنتی ژن سطحی ویروس (HBsAg) با روش ELISA می باشد. اما در عفونت نهفته هپاتیت B، HBsAg با روش ELISA قابل شناسایی نیست. بنابراین تستهای حساس تر و تکمیلی برای غربال کردن فرآورده های خونی از نظر آلودگی به HBV نیاز است. بعضی محققین تست anti-HBc را به عنوان یک تست غربالگری برای تشخیص آلودگی به HBV مناسب دانسته اند. هدف از این تحقیق تعیین عفونت نهفته HBV در اهدا کنندگان خون و همچنین مشخص نمودن ارزش واقعی تست anti-HBc به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص عفونت نهفته هپاتیت B بوده است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی در طی ماههای اردیبهشت و خرداد ۱۳۸۳ انجام گرفت، تعداد ۵۴۵ نمونه خون از سازمان انتقال خون اصفهان جمع آوری گردید و به وسیله تست ELISA از نظرHBsAg مورد ارزشیابی قرار گرفتند. سپس نمونه های HBsAg منفی به منظور وجودanti-HBc تست شدند. به منظور به دست آوردن موارد عفونتهای نهفته هپاتیت B تمام نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر وجود HBV DNA با روش PCR بررسی شدند.

نتایج: تمام نمونه ها از نظر HBsAg منفی بودند اما ۴۳ مورد (۸٪) از نمونه های HBsAg منفی از نظر anti-HBc مثبت بودند. با استفاده از روش PCR روی نمونه های HBsAg منفی anti-HBc مثبت، مشخص شد که پنج عدد (۱۱/۶٪) از این نمونه ها از نظر HBV DNA مثبت و آلوده به ویروس HBV بودند.

نتیجه گیری: یکی از فرمهای کلینیکی عفونت HBV، عفونت نهفته هپاتیت B می باشد که در این حالت HBsAg در خون بیماران قابل شناسایی نیست، بنابراین تستهای حساس تری برای غربال کردن فرآورده های خونی از نظر HBV مورد نیاز است. PCR یک تست بسیار حساس است که قادر می باشد HBV DNA را در مقادیر بسیار پایین شناسایی کند. نتایج ما به وضوح نشان داد که یک تست حساس مثل PCR وهمچنین تست تکمیلی مثل anti-HBc برای مطمئن شدن از ایمنی ومناسب بودن فرآورده های خونی به شدت مورد نیاز می باشد.

واژه های کلیدی: PCR, HBsAg, anti-HBc, ELISA .

*۱- نویسنده مسئول: مربی گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان
تلفن: ۵-۵۲۳۴۰۰۳- ۰۳۹۱ ، تلفن همراه: ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳
E-Mail:kazemi24@yahoo.com
۲- دانشیار ایمونولوژی- دانشکده پزشکی
۳- استادیار ژنتیک- دانشکده پزشکی
۴- دانشیار ایمونولوژی- دانشکده پزشکی
۵، ۶- مربی گروه ایمونولوژی
۷- کارشناس آزمایشگاه- سازمان انتقال خون اصفهان
۸- مربی گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی
۹- استادیار هماتولوژی- دانشکده پزشکی
۱۰- مربی گروه آناتومی
۱۱- مربی گروه آمار و اپیدمیولوژی
۱،۴،۸،۹،۱۰،۱۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان
۲،۳،۵،۶- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۱۲/۳

www.SID.ir

مقدمه

خطر انتقال عفونت از طریق انتقال خون در طی سالهای اخیر به میزان زیادی کاهش یافته است. اما با این وجود گزارشاتی از سراسر دنیا مبنی بر انتقال عفونت از طریق انتقال خون منتشر شده است[۱،۲]. در میان عفونتهای منتقله از طریق انتقال خون هپاتیت "ب" بیشترین میزان انتقال را به خود اختصاص داده است[۳]. به گونه ای که چندین گزارش انتقال HBV از طریق انتقال خون را گزارش کرده اند[۱،۲،۴]. برای کاهش انتقال HBV از طریق خون و فرآورده های آن در سازمان انتقال خون ایران از تست غربالگری الیزا برای تشخیص HBsAg در فرآورده های خونی استفاده می شود. اما با این وجود گزارشاتی مبنی بر انتقال عفونت HBV از طریق خونهای HBsAg منفی وجود دارد که نشان می دهد تنها تست کردن فرآورده های خونی از نظر HBsAg برای تشخیص آلودگی به HBV کفایت نمی کند و بایستی تستهای حساستر و یا تستهای تکمیلی را در این مورد به کار برد[۴]. از آنجا که تست PCR یک تست بسیار حساس است و قادر است مقادیر پایین DNA را در نمونه تشخیص دهد، می توان از آن به عنوان تست حساس تر استفاده کرد به گونه ای که حتی می توان آلودگی به HBV را در دوره خسوف تشخیص داد[۵]. در ضمن با توجه به اینکه anti-HBc اولین آنتی بادی است که علیه HBV مثبت می شود و تیتر بالاتری از همه آنتی بادیهای دیگر دارد[۱،۶]. می توان از این آنتی بادی برای تشخیص افرادی که با HBV برخورد داشته اند استفاده کرد و آن را به عنوان تست تکمیلی HBsAg به کار برد[۶]. از آنجا که عوامل مختلفی از قبیل نژاد انسان، وضعیت اکوفیزیکی محل و زیر گروه HBV روی بیان HBsAg اثر می گذارند و سبب سرکوب بیان آن می شوند[۳،۷]. لذا ما بر آن شدیم تا وضعیت عفونت HBV و متعاقب آن بررسی میزان شیوع anti-HBc و وضعیت عفونت نهفته هپاتیت "ب" را در اهداکنندگان خون اصفهان بررسی کنیم.

روش بررسی

جمع آوری نمونه: تعداد ۵۴۵ عدد پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) به میزان نیم سی سی در طی ماه های اردیبهشت تا خرداد سال ۱۳۸۳ از مراجعه کنندگان به سازمان انتقال خون اصفهان که دارای سنین بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند جمع آوری شد سپس نمونه ها در ۲۰°c- برای مدت دو ماه نگهداری شد و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای ۷۰°c – استفاده شد. تعداد نمونه ها از فرمول زیر محاسبه شد:

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{d^2} = \frac{(1.96)^2 (0.15)(1-0.15)}{(0.03)^2} \approx 545$$

P در صد anti-HBc در جمعیت مورد نظر طی تحقیقات گذشته است[۱۰]، Z با اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۱/۹۶ است و d دقت است که ۳٪ در نظر گرفته شده است.حجم کل نمونه ۵۴۵ نفر می باشد.

تستهای الیزا: برای غربال کردن نمونه ها از نظر HBsAg از (کیتهای ۲) الیزای تجارتی (RADIM, Italy) استفاده شد. نمونه های منفی دوباره از نظر HBsAg تست شدند. در این تست از روش ساندویچ استفاده شد. سپس نمونه هایHBsAg منفی با روش الیزا و با استفاده از کیتهای تجاری (RADIM, Italy) جهت غربال کردن نمونه ها از نظر anti-HBc تست شدند. تست اخیر از روش رقابتی استفاده می کند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از ۱۰۰µl پلاسما استفاده شد به گونه ای که ابتدا ۱۰۰µl پلاسما با ۱۰۰µl پروتئیناز k مخلوط شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°c و سپس ۵ دقیقه در ۴°c نگهداری شد سپس استخراج توسط روش فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته نشین کردن DNA توسط اتانول مقدار۳۰µl آب DNase free به آن اضافه شد و در ۲۰°c- نگهداری شد[۵].

PCR و الکتروفورز: PCR در حجم ۲۵µl انجام شد که شامل این موارد بودند:

10 mM tris-HCL ,50 mM KCl ,1.5 mM $MgCl_2$ ژلاتین ۰/۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰,۶ µM از هر پرایمر، ۵ µl از DNA استخراج شده به همراه آنزیم 5 units recombinant Taq DNA polymerase. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده به این گونه بود: ´5-TAT GTT TCC CTC CTG CTG CT-3´ و ترتیب توالی پرایمر معکوس به این گونه بود: ´5-CCC CCA ACT CCC AAT TCT AT-3´ طی این PCR مقدار bp ۳۵۴ از ژنوم HBV تکثیر می شود. سیکلهای PCR به این گونه بود: یک سیکل; ۹۳°c به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰°c به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳°c به مدت ۲۰

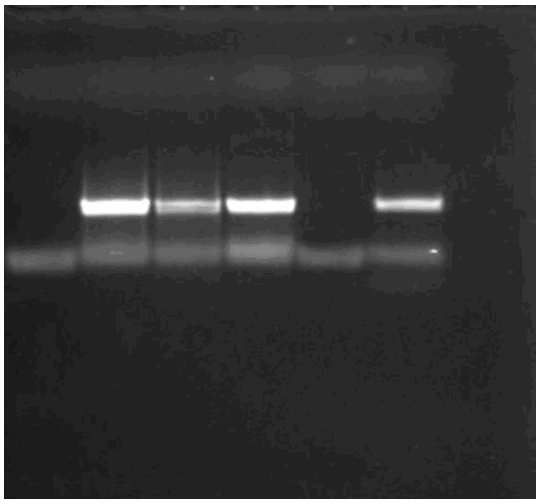
Archive of SID
www.SID.ir

ثانیه، $60^{\circ}c$ به مدت ۲۰ ثانیه، $72^{\circ}c$ به مدت ۴۰ ثانیه. یک نمونه کنترل مثبت از ژنوم HBV از شرکت سیناژن تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵ ٪ درست شد سپس ۱۰µl از محصول PCR را به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز کردیم. وجود باند bp ۳۵۴ نشانگر مثبت بودن نمونه است. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ۱۰۰bp ladder از شرکت سیناژن استفاده شد. داروهای تحقیق با نرم افزار SPSS 11 تحت ویندوز XP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

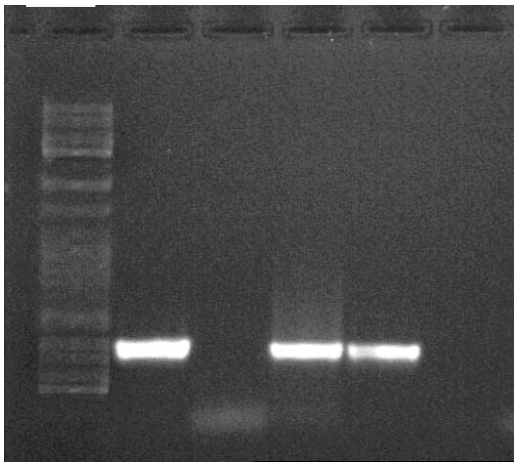
این تحقیق روی ۵۴۵ نمونه جمع آوری شده از سازمان انتقال خون اصفهان انجام شد. نتایج آزمایش الیزا به منظور تشخیص واندازه گیری HBsAg نشان داد که تمامی نمونه ها (۱۰۰٪) از نظر HBsAg منفی بودند. با انجام تست الیزا برای anti-HBc مشخص شد که ۴۳ عدد (۸٪) از نمونه های HBsAg منفی از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی نمونه هایHBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV DNA با تست PCR مشخص شد که ۵ (۱۱,۶٪) عدد از آنها HBV DNA مثبت بودند. شکل (۱) نتایج این الکتروفورز را نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می کنیم ستونهای ۴ و۵ از شکل A.1 و ستونهای ۴ و۲،۳ از شکل B.1حاوی باند می باشند و نشان دهنده مثبت بودن نمونه ها دارد. این نتایج نشان داد که تقریباً ۱۱/۶٪ از نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۹۲٪ از نمونه های HBsAg منفی آلوده به HBV بودند.

A 1 2 3 4 5



-354

B 1 2 3 4 5 6



354-

شکل(۱): نتایج تکثیر DNA توسط PCR در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت. باندها وجود آلودگی به HBV DNA را نشان می دهد. A: ستون۱: ladder ستون۲: کنترل مثبت ستون۳: کنترل منفی ستون۴و۵: دو نمونه مثبت. B: ستون۱: نمونه منفی ستون۳،۲و۴: نمونه های مثبت ستون۵: کنترل منفی ستون۶: کنترل مثبت

بحث

هپاتیت های ویروسی یکی از خطرناکترین بیماریها می باشند که توسط ویروسهای مختلفی از جمله ویروس هپاتیت "ب" (HBV) ایجاد می شود[۳]. این ویروس از طرق مختلف ایجاد آلودگی می کند. یکی از این راهها انتقال خون و فرآورده های آن می باشد[۴]. در طی سالهای اخیر میزان انتقال HBV از طریق انتقال خون به میزان زیادی کاهش یافته است که به علت استفاده از تستهای غربالی از جمله الیزا برای HBsAg می باشد[۵]. علی رغم استفاده از تست غربالگری، انتقال عفونت HBV هنوز بالاترین میزان را در میان بیماریهای ویروسی منتقله از طریق انتقال خون دارا می باشد[۶]. مطالعات زیادی در سراسر دنیا برای پیدا کردن علت این امر انجام شده است. در سالهای اخیر مطالعات روی anti-HBc به عنوان یک شاخص خوب جهت تشخیص آلودگی به HBV متمرکز شده است[۷،۸،۹]. به گونه ای که بعضی کشورها از جمله آمریکا و ژاپن این تست را سودمند دانسته و از آن به عنوان یک تست رایج در آزمایشگاه های مراکز انتقال خون استفاده می کنند[۱۰]. در حالی که در بعضی کشورها از جمله هند طی تحقیقاتی که انجام داده اند این تست را سودمند ندانسته اند[۱۱]. در ایران هنوز تحقیقی روی این زمینه که آیا این تست به عنوان تست تکمیلی مورد نیاز است یا نه

Archive of SID
www.SID.ir

انجام نشده است. لذا بر آن شدیم تا میزان مناسب بودن این تست را در ایران بررسی کنیم. anti-HBc به این علت انتخاب شد که: اولاً زودتر از همه مارکرهای HBV بیان وظاهر می شود ثانیاً به مدت طولانی باقی می ماند و نشانه برخورد با HBV در گذشته می باشد[۵]. اگر HBsAg منفی و anti-HBc مثبت باشد شرایط زیر ممکن است وجود داشته باشد: ۱: حالت مزمن در حاملین که HBsAg قابل اندازه گیری نباشد ۲: در اوایل عفونت که HBsAg قابل اندازه گیری نیست ۳: انتقال غیر فعال anti-HBc به فرد (مثل انتقال خون یا فرآورده های آن) ۴: یک واکنش غیر اختصاصی متقاطع بین HBcAg موجود در کیتهای اندازه گیری anti-HBc با آنتی بادیهای دیگر[۱۲،۱۳].

در این تحقیق تعداد ۵۴۵ نمونه از واحدهای FFP (که HBsAg منفی بودند) از سازمان انتقال خون اصفهان جمع آوری شد. تمام این نمونه ها از نظر anti-HIV, anti-HCV و anti-HTLV-1,2 منفی بودند. نمونه ها توسط روش الیزا به منظور تشخیص وجود HBsAg تست شدند و همگی منفی بودند سپس از نظر anti-HBc بررسی شدند و مشخص شد که ۴۳ عدد (۸٪) عدد از آنها مثبت بودند. سپس این نمونه ها توسط تست PCR جهت پیدا کردن HBV DNA تست شدند که مشخص شد ۵ عدد از آنها آلوده به HBV DNA بودند. نتایج حاصل از الکتروفور این نمونه ها در شکل ۱ نشان داده شده است. این ۵ نمونه عفونت نهفته هپاتیت "ب" داشتند و ممکن است با تزریق این واحدهای خونی عفونت را انتقال دهند. نتایج ما نشان می دهد که عفونت نهفته هپاتیت B شیوع بالایی در ایران دارد که ممکن است به دلایل مختلفی باشد: ۱) نوع سوشی از HBV که در ایران شیوع دارد ۲) منطقه ایران از نظر جغرافیایی و ژئوفیزیکی ۳) نژاد ایرانیان (متفاوت از نظر ایمونولوژیکی).

نتیجه گیری

نتایج ما نشان می دهد که استفاده از تست حساس PCR به شدت در سازمانهای انتقال خون ایران مورد نیاز است. اما از آنجایی که انجام این تست به افراد ماهر و آموزش دیده نیاز دارد و از نظر هزینه و وقت نیز مقرون به صرفه نمی باشد لذا ما پیشنهاد می کنیم که در سازمان انتقال خون از تست تکمیلی anti-HBc به صورت رایج برای حذف نمونه های مشکوک در کنار تست HBsAg استفاده شود. استفاده از تست anti-HBc به عنوان یک تست رایج به دلایل زیر ضروری می باشد:

۱) شیوع متوسط HBV در ایران[۱۴] ۲) HBV DNA در بعضی نمونه های HBsAg منفی وanti-HBc مثبت مشاهده می شود[۱۱،۱۲]. در پایان ما پیشنهاد می کنیم که سازمان انتقال خون حتی المقدور از تست PCR جهت غربال کردن فرآورده های خونی استفاده کند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی اصفهان ، سازمان انتقال خون اصفهان ، اساتید و دیگر عزیزانی که ما را در مراحل انجام پژوهش همکاری و راهنمایی نموده اند کمال سپاس و تقدیر را دارند.

References

1- Jin-Town Wang, Cha-Za Lee, Pei-Jer Chen et al. ***Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of sensitive screening for HBV carriers.*** Transfusion 2002: 42, 1592-1597.

2- Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH, AuBuchon. ***Transfusion medicine***. Second of two parts: blood conservation. N Engl Med 1999:340, 525-33.

3- Robinson WS. ***Hepadnaviridae and their replication***. In: Virology Fields BN, Knipe DM. Raven New York. 1996: 2137-2169.

4- Prince AM, Lee DH, Brotman B. ***Infectivity of***

Archive of SID
www.SID.ir

blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. Transfusion 2001: 41, 329-332.

5- Holger Hennig, Ines PuCHta, Jurgen Luhm et al. ***Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen.*** Blood 2002: 100 (7), 2637-2641.

6- Holger Hennig, Ines PuCHta, Jurgen Luhm et al. ***Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen.*** Blood 2002; 100 (7): 2637-2641.

7- Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini- Brechot P. ***Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely 'occult'?*** Hepatology 2001: 34, 194–206.

8- Tristram G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba L. Terr, John B. Imboden. ***Medical Immunology.*** Lang Medical Book Mc Graw Hill. New york. 2001: 617-635.

9- Cesar de Almedia Neto, Edna Cerderia Sabino, Edna Strauss et al. ***Significance of isolated hepatitis B core Antibody in blood donors from sao Paulo.*** Rev 2001: 43 (4), 203-208.

10- Grob P, Jilg W, Bornhak H et al. ***Serological pattern 'anti- HBc alone': report on a workshop.*** J Med Virol 2000: 62, 450–455.

11- Chaudhuri V, Nanu A, Panda SK, Chand P. ***Evaluation of serologic screening of blood donors in India reveals a lack of correlation between anti-HBc titer and PCR-amplified HBV DNA***. Transfusion. 2003: Oct;43(10),1442-8.

12- Holland, P. V. ***Notification and counseling of blood donors.*** Vox Sang 1996: 70, 46-49.

13- Schifman, R.B. Rivers, S. l. ***Significance of isolated hepatitis B core Antibody in blood donors.*** Arch. Intern. Med 1993: 153,2261-2266.

14- Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. ***Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronoc hepatitis C***. J Hepatol 2000: 33, 785-790

Archive of SID

www.SID.ir