

عفونت نهفته هپاتیت B در اهداکنندگان خون شهرستان رفسنجان

محمد کاظمی عرب آبادی^{۱*}، علی اکبر پورفتح‌اله^۲، عبدالله جعفرزاده^۳، غلامحسین حسن‌شاهی^۴، محمدرضا افروز^۵، محمود حدادیان^۵

- ۱- مربی، گروه میکروبیولوژی، ایمنولوژی و هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
- ۲- استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
- ۴- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
- ۵- کارشناس، سازمان انتقال خون ایران، مرکز رفسنجان، رفسنجان، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۸

چکیده

هدف: عفونت نهفته هپاتیت B یک فرم بالینی از بیماری هپاتیت B است که در آن فرد با وجود این‌که از نظر HBsAg منفی است اما دارای HBV-DNA در خون محیطی است. این فرم از بیماری مشکلات عدیده‌ای را در انتقال خون به‌وجود خواهد آورد. هدف از انجام این تحقیق بررسی وضعیت عفونت نهفته هپاتیت B در میان اهداکنندگان خون رفسنجان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی توصیفی تعداد ۳۷۰۰ نمونه پلاسما از انتقال خون رفسنجان جمع‌آوری شد و به‌وسیله آزمایش ELISA از نظر HBsAg و anti-HBc مورد ارزشیابی قرار گرفتند. به‌منظور به‌دست آوردن موارد عفونت نهفته هپاتیت B تمام نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر وجود HBV-DNA با روش واکنش تکثیر زنجیره‌ای (PCR) بررسی شدند.

نتایج: نتایج این تحقیق روی نمونه‌های HBsAg منفی نشان داد که ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱ درصد) از این نمونه‌ها از نظر anti-HBc مثبت هستند. با بررسی این نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با آزمایش PCR، مشخص شد که ۵۷ (۱۶/۱ درصد) افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی و حدود ۱/۵۴ درصد از کل نمونه‌ها) نمونه HBV-DNA مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: این نتایج با بررسی‌های قبلی محققان حاضر روی اهداکنندگان خون مطابقت دارد و آن‌ها را تأیید می‌کند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که شیوع این فرم از عفونت هپاتیت B در بین اهداکنندگان خون بالا است و باید بررسی بیشتری در ارتباط با امکان احتمال هپاتیت B بعد از تزریق خون و فراورده‌های خونی از این طریق به‌عمل آید.

کلیدواژگان: عفونت نهفته هپاتیت B، HBV-DNA، HBsAg، anti-HBc

۱- مقدمه

از سراسر دنیا مبنی بر انتقال عفونت از طریق انتقال خون منتشر شده است [۲، ۳]. هپاتیت B در میان عفونت‌های منتقل شده از

خطر انتقال عفونت از طریق انتقال خون طی سال‌های اخیر به میزان زیادی کاهش یافته است [۱]. اما با این وجود گزارش‌هایی

* نشانی مکاتبه: رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، ایمنولوژی و هماتولوژی، صندوق پستی: ۷۷۱۷۵-۸۳۵
Email: kazemi24@yahoo.com

طریق انتقال خون بیشترین میزان انتقال را به خود اختصاص داده است [۲]؛ به‌گونه‌ای که چندین مطالعه انتقال ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus: HBV) از طریق انتقال خون (Post Transfusion Hepatitis: PTH) را گزارش کرده‌اند [۲، ۴]. برای کاهش انتقال HBV از طریق خون و فرآورده‌های آن از آزمایش غربالی الیزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای تشخیص HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) در فرآورده‌های خونی استفاده می‌شود [۵]؛ اما با این وجود گزارش‌هایی مبنی بر انتقال عفونت HBV از طریق خون‌های HBsAg منفی وجود دارد [۲، ۵] که نشان می‌دهد بررسی فرآورده‌های خونی از نظر HBsAg برای تشخیص آلودگی به HBV کفایت نمی‌کند. از آنجا که PCR یک آزمایش بسیار حساس بوده و قادر است مقادیر پایین DNA را در نمونه تشخیص دهد [۵، ۶]، می‌توان از آن به‌عنوان آزمایش حساس‌تر استفاده کرد به‌گونه‌ای که می‌توان آلودگی به HBV را در غیاب HBsAg تشخیص داد [۵]. با توجه به این‌که anti-HBc اولین آنتی‌بادی است که علیه HBV قابل اندازه‌گیری است و تیتربالاتری از همه آنتی‌بادی‌های دیگر دارد [۵، ۷]، می‌توان به‌عنوان آزمون تکمیلی از این آنتی‌بادی برای تشخیص هپاتیت B در افرادی که با HBV برخورد داشته‌اند استفاده کرد [۵]. با توجه به این‌که یکی از دلایل اصلی ایجاد PTH، وجود فرم بالینی عفونت نهفته هپاتیت B (Occult hepatitis B virus (HBV) Infection: OBI) است [۵، ۸، ۹] و محققان حاضر نیز در مطالعات قبلی به بررسی این فرم از عفونت پرداخته بودند [۸، ۱۰] پروژه حاضر برای بررسی وضعیت OBI در میان اهداکنندگان خون شهرستان رفسنجان طراحی شده تا تأییدی بر وضعیت کنونی OBI در میان اهداکنندگان خون این منطقه جغرافیایی باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

تعداد ۳۷۰۰ عدد پلاسمای تازه منجمد شده

۲-۲- آزمایش‌های ELISA

برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر HBsAg از کیت‌های ELISA تجارتي (Behring, Germany) طبق رهنمودهای شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg آزمایش شدند. در این آزمایش از روش ساندویچ استفاده شد. سپس نمونه‌های HBsAg منفی با روش ELISA و با استفاده از کیت‌های تجاری (RADIM, Italy) برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc (anti-Hepatitis B core antigen) آزمایش شدند. آزمایش اخیر از روش رقابتی استفاده می‌کرد. در ضمن تمام نمونه‌ها از نظر وجود anti-HCV (anti-Hepatitis C Virus) و anti-HIV (anti-Human Immunodeficiency Virus) نیز با کیت‌های تجاری ELISA (Behring, Italy) بررسی شدند.

۲-۳- استخراج DNA

برای استخراج HBV DNA از ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استفاده شد به‌گونه‌ای که ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما با ۲۰۰ میکرولیتر پروتئیناز k (۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس استخراج توسط روش استاندارد فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته‌نشین کردن DNA توسط اتانول مقدار ۳۰ میکرولیتر آب فاقد DNase (DNase free) به آن اضافه و در ۲۰- درجه

سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۴- PCR و الکتروفورز

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل این موارد بود: Tris-HCL KCl ۱۰ میلی مولار، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار، ژلاتین ۱ درصد، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ میکرومول از هر آغازگر (Primer)، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه ۵ واحد آنزیم DNA پلیمرز (Taq DNA polymerase) به این گونه بود: چرخه های PCR به این گونه بود: یک چرخه: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ چرخه به صورت: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه. ترتیب توالی آغازگر جلو برنده به این گونه بود: 5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3' و ترتیب توالی آغازگر معکوس به این گونه بود: 3'-ACAGTGGGGAAAGCCCAT-5' طی این PCR مقدار ۵۰۰ جفت باز از ژن S از HBV تکثیر داده شد. یک نمونه کنترل مثبت از ژنوم HBV از شرکت CinnaGen تهیه و استفاده شد. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵ درصد درست شد سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را به همراه ۴ میکرولیتر از بافر رنگی همراه (بروموفنل بلو به همراه ساکارز) روی این ژل الکتروفورز شد. وجود باند ۵۰۰ جفت بازی نشانگر مثبت بودن نمونه است. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ladder ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد (شکل ۱). تمام مواد فوق از شرکت CinnaGen تهیه شدند. بایستی ذکر کرد که آزمون PCR با کیت های HBV-DNA-PCR از شرکت CinnaGen برای تعیین حساسیت آزمون مقایسه شدند.

۳- نتایج

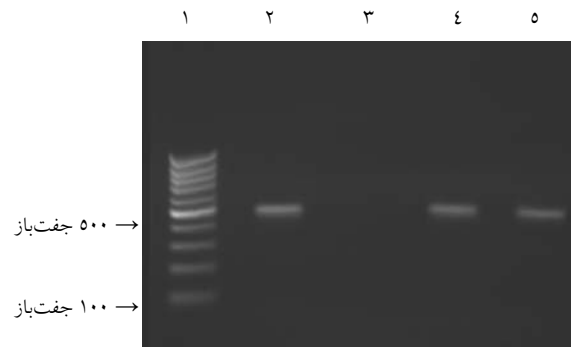
این تحقیق روی ۳۷۰۰ نمونه جمع آوری شده از

اهدانندگان خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان انجام شد. نتایج آزمایش های ELISA به منظور تشخیص و اندازه گیری HBsAg نشان داد که تمامی نمونه ها (۱۰۰ درصد) از نظر HBsAg منفی بودند و تمامی اهدانندگان از نظر HCV و HIV نیز منفی بودند. با انجام آزمایش ELISA به منظور تعیین وجود anti-HBc در اهدانندگان HBsAg منفی، مشخص شد که ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱ درصد) از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی این نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت با PCR مشخص شد که ۵۷ (۱/۶۱ درصد) از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی) نفر از آن ها DNA-HBV مثبت بودند (جدول ۱). شکل ۱ نتایج این الکتروفورز را نشان می دهد. با مقایسه آزمون حاضر با کیت های HBV-DNA-PCR از شرکت CinnaGen که قادر به رهگیری ۱۰۰ نسخه DNA در هر دسی لیتر هستند مقایسه شدند که نتایج یکسانی را در برداشتند. بنابراین می توان این گونه نتیجه گیری کرد که آزمون حاضر قادر به رهگیری حداقل ۱۰۰ نسخه از HBV-DNA در هر دسی لیتر خون محیطی است. همان طور که در شکل مشاهده می شود ستون های ۴ و ۵ حاوی باند ۱۰۰ جفت بازی هستند که نشان دهنده مثبت بودن این نمونه ها است. نتایج این تحقیق نشان داد که ۱/۶۱ درصد از نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۱/۵۴ درصد از کل نمونه ها به HBV آلوده بودند که نشان دهنده OBI در اهدانندگان خون است (جدول ۱).

جدول ۱ تعداد کل اهدانندگان مورد بررسی و همچنین نتایج حاصل از بررسی های آزمایشگاهی نشانگرهای HBV را نشان می دهد.

تعداد کل اهدانکننده مورد بررسی	موارد HBsAg مثبت در میان کل اهدانندگان	موارد anti-HBc مثبت در میان کل اهدانندگان	موارد HBV-DNA مثبت در میان کل اهدانندگان	موارد HBV-DNA مثبت در میان اهدانکنندگان anti-HBc مثبت
۳۷۰۰ نفر	۰ نفر (۰ درصد)	۳۵۲ نفر (۹/۵۱ درصد)	۵۷ نفر (۱/۵۴ درصد)	۵۷ نفر (۱/۶۱ درصد)

اخیر محققان حاضر روی جمعیت گسترده‌تر اهداکنندگان نه تنها تأییدی بر نتایج گذشته بلکه نشان‌دهنده شیوع ۱-۲ درصدی OBI در میان اهداکنندگان خون ایرانی است. در سایر مناطق جهان نیز مطالعات زیادی به بررسی این نوع بیماری در میان اهداکنندگان خون پرداخته‌اند که به‌طور مثال آقای آلمدیا (Almedia) با بررسی ۱۵۳۶ اهداکننده خون میزان شیوع anti-HBc را ۳/۶ درصد در برزیل گزارش کرد [۱۲]. این مطالعه تنها به وجود ۲ مورد OBI در میان نمونه‌های مورد بررسی دست یافت [۱۲]. در مطالعه دیگری که در کشور ایتالیا روی ۶۳۱۳ نمونه انجام گرفت نشان داده شد که ۴/۸۵ درصد افراد anti-HBc مثبت بودند که در این میان ۱۴ نفر آلوده به HBV-DNA بودند؛ بنابراین میزان شیوع OBI در میان ایتالیایی‌ها ۰/۲۲ درصد تخمین زده می‌شود [۱۳]. در پاکستان ۵ نفر از ۹۶۶ (۰/۵ درصد) اهداکننده مورد بررسی آلوده به HBV-DNA بودند [۱۴]. در عمان [۱۵] و مکزیک [۱۶] به ترتیب شیوع ۰/۵ درصدی و ۰/۷ درصدی OBI گزارش شده است. محققین ایرانی نیز به بررسی میزان شیوع OBI در میان اهداکنندگان خون توجه داشته‌اند به‌گونه‌ای که مطالعه بهبهانی (Behbahani) و همکاران روی ۲۰۰۰ اهداکننده مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون استان فارس نشان داد که ۰/۸ درصد از آن‌ها آلوده به فرم بالینی OBI بودند [۲]. طی مطالعه دیگری امینی (Amini) و همکاران نیز ضمن بررسی ۲۰۰۰ اهداکننده تهرانی شیوع ۰/۱۵ درصدی را در تهران نشان دادند [۱۷]. به نظر می‌رسد که در مقایسه با مطالعات انجام شده دنیا و در سایر استان‌هایی که در ایران مطالعه شده است، مطالعه حاضر بیشترین شیوع OBI را در میان اهداکنندگان خون نشان می‌دهد. این تفاوت ممکن است به دلایل زیر باشد: (۱) نوع ژنوتیپ شایع HBV در ایران که اغلب نوع D است [۱۸]، (۲) نژاد و پس‌زمینه ژنتیکی و ایمونولوژیکی متفاوت ایرانیان نسبت به دیگر جوامع و همچنین (۳) شیوع بالاتر anti-HBc در میان اهداکنندگان مورد بررسی در مطالعه حاضر [۸، ۱۰]. در پاسخ به این سؤال که با وجود شیوع بالای OBI در میان اهداکنندگان خون، چرا میزان PTH نیز به همان اندازه گزارش



شکل ۱ نتایج تکثیر DNA توسط PCR در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت؛ وجود باند ۵۰۰ جفت‌بازی نشان‌دهنده آلودگی به HBV DNA است. ستون ۱: ladder؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ستون ۳: کنترل منفی؛ ستون‌های ۴ و ۵: دو نمونه مثبت

۴- بحث

هپاتیت‌های ویروسی از خطرناک‌ترین بیماری‌هایی هستند که توسط ویروس‌های مختلفی از جمله HBV ایجاد می‌شوند [۱۱]. HBV از روش‌های مختلفی مانند انتقال خون و فراورده‌های خونی منتقل و بیماری‌زایی می‌نماید [۱۱]. طی سال‌های اخیر به‌علت آزمایش‌های غربالگری HBsAg و همچنین تغییر در برنامه‌های جذب اهداکنندگان، میزان انتقال HBV از طریق انتقال خون به میزان زیادی کاهش یافته است [۲، ۵]. اما با وجود استفاده از این آزمایش غربالی، انتقال عفونت HBV بالاترین میزان را در میان بیماری‌های ویروسی منتقل شده از طریق انتقال خون را تشکیل می‌دهد [۸]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ۱/۵۴ درصد از اهداکنندگان خون مبتلا به فرم نهفته هپاتیت B هستند. مطالعات گذشته محققان حاضر روی ۵۴۵ اهداکننده اصفهانی و ۲۷۰ اهداکننده رفسنجانی نشان داد که به ترتیب ۰/۹۲ درصد [۸] و ۱/۴۵ درصد [۱۰] از اهداکنندگان مبتلا به OBI بودند. با مقایسه دو مطالعه قبلی مشخص می‌شود که گرچه تعداد نمونه مورد مطالعه در میان اهداکنندگان رفسنجانی کمتر بوده اما شیوع OBI به‌دست آمده در میان اهداکنندگان خون بالاتر است. دلیل این امر را می‌توان در تفاوت‌های نژادی، ژنتیکی و ایمونولوژیکی دو گروه مورد بررسی دانست. بنابراین مطالعه

کامل عفونت‌زا در خون محیطی این افراد نیست [۲۱]. اما با وجود دلایل ذکر شده به نظر می‌رسد که OBI یک مشکل جدی بهداشتی در انتقال خون باشد و ممکن است مشکلاتی را در میان دریافت‌کنندگان خون ایجاد کند. بنابراین امکان‌سنجی و بررسی هزینه و فایده آزمایش‌های تکمیلی و حساس‌تر از جمله anti-HBc و PCR و بررسی امکان آلودگی از این طریق پس از انتقال خون ضروری به نظر می‌رسد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان بابت همکاری‌های بی‌دریغشان در انجام این پروژه و همچنین تمامی اهداکنندگان خون که بدون هیچ چشم‌داشتی اقدام به اهدا خون برای انجام آزمایش‌های مربوط همت گماردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

نمی‌شود، می‌توان به دلایل زیر اشاره کرد: (۱) احتمالاً تعداد نسخه ویروس موجود در مبتلایان به OBI بسیار پایین و حتی در بعضی موارد به زیر ۱۰۰ نسخه در هر دسی‌لیتر برسد [۵] و بنابراین به محض ورود ویروس سیستم ایمنی ذاتی (در افراد سالم از نظر سیستم ایمنی) قادر خواهد بود با این میزان کم ویروس مقابله کند [۱۹]؛ (۲) مطالعات نشان می‌دهد که سرم افراد مبتلا به OBI که تیترا بالایی از HBs-Ab (Hepatitis B surface Antibody) دارند، عفونت‌زایی بسیار کمی دارند [۲۰]، بنابراین به نظر می‌رسد که احتمال ایجاد PTH توسط نمونه افراد مبتلا به OBI که دارای HBs-Ab با تیترا نسبتاً خوبی هستند، بسیار کم باشد [۱۰]؛ (۳) از آن‌جا که HBV طی OBI قادر به تولید HBsAg به مقدار کافی نیست، به نظر می‌رسد که برخی از HBV-DNA‌های موجود در سرم فاقد قدرت عفونت‌زایی باشند، بنابراین اگر چه آزمایش HBV-DNA با PCR در این افراد مثبت می‌شود اما این مسئله نشان‌دهنده وجود ویروس

۶- منابع

- [1] Karki S, Ghimire P, Tiwari BR, Maharjan A, Rajkarnikar M. Trends in hepatitis B and hepatitis C seroprevalence among Nepalese blood donors. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(4):324-6.
- [2] Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei SZ, Lankarani KB, Torab A, Moaddeb A. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. *Indian J Med Res* 2006; 123(1): 37-42.
- [3] Satoh K, Iwata-Takakura A, Yoshikawa A, Gotanda Y, Tanaka T, Yamaguchi T, Mizoguchi H. A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. *Vox Sang* 2008; 95(3): 174-80.
- [4] Kocazeybek B, Arabaci U, Sezgiç M. Investigation of transfusion transmitted viruses in cases clinically suspected of posttransfusion hepatitis with undetermined ethiology. *Transfus Apher Sci* 2002; 26(3): 157-65.
- [5] Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H, Zarandi ER, Moradi M, Mahmoodi M. No detected hepatitis B virus-DNA in thalassemic patients infected by hepatitis C virus in Kerman province of Iran. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(13): 1738-41.
- [6] Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. PCR-Based Methods for the Enrichment of Minority Alleles and Mutations. *Clin Chem* 2009; [Epub ahead of print].
- [7] Ollier L, Laffont C, Kechkekian A, Doglio A, Giordanengo V. Detection of antibodies to

- hepatitis B core antigen using the Abbott ARCHITECT anti-HBc assay: analysis of borderline reactive sera. *J Virol Methods* 2008; 154(1-2): 206-9.
- [8] Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Kazemi Arababadi M, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection of HBV DNA in HBsAg Negative Normal Blood Donors. *IJI* 2005; 2(3): 172-6.
- [9] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection. *Transfus Clin Biol* 2004; 11(1): 18-25
- [10] Jafarzadeh A, Kazemi Arababadi M, Mirzaee M, Pourazar A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Acta Medica Iranica* 2008; 46(1): 27-32.
- [11] Dhawan HK, Marwaha N, Sharma RR, Chawla Y, Thakral B, Saluja K, Sharma SK, Thakur MK, Jain A. Anti-HBc screening in Indian blood donors: Still an unresolved issue. *World J Gastroenterol* 2008; 14(34) 5327-30.
- [12] Almeida D, Tavares-Neto J, Trepo C, Almeida A, Mello C, Chemin I, Paraná R. Occult B infection in the Brazilian northeastern region: a preliminary report. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(4): 310-2.
- [13] Manzini P, Giroto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, Testa D, Ghiazza P, Vacchini M, Daniëlle F, Pizzi A, Valpreda C, Castagno F, Curti F, Magistrone P, Abate ML, Smedile A, Rizzetto M. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica* 2007; 92 (12): 1664-70.
- [14] Bhatti FA, Ullah Z, Salamat N, Ayub M, Ghani E. Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion* 2007; 47(1): 74-9.
- [15] Kaminski G, Alnaqdy A, Al-Belushi I, Nograles J, Al-Dhahry SH. Evidence of occult hepatitis B virus infection among Omani blood donors: a preliminary study. *Med Princ Pract* 2006; 15(5): 368-72.
- [16] García-Montalvo BM, Farfán-Ale JA, Acosta-Viana KY, Puerto-Manzano FI. Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfus Med* 2005; 15(5): 371-8.
- [17] Amini KS, Talebian A, Moghtadaie M, Ranjbar KF, Ferdowsian F, Samie S, Taghi NA, Sobhani M, Ataie Z, Kavari M, Paz Z. Detection of hepatitis B virus DNA (PCR) in HBsAg negative, anti-HBc positive blood donors in Tehran province. *Blood J* 2004; 3(5): 379-87.
- [18] Bahramali G, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, Alavian SM, Behzad-Behbahani A, Adeli A, Aghasadeghi MR, Amini S, Mahboudi F. Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14(35): 5448-53
- [19] Vierling JM. The immunology of hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2007; 11(4): 727-59.
- [20] Awerkiew S, Däumer M, Reiser M, Wend UC, Pfister H, Kaiser R, Willems WR, Gerlich WH. Reactivation of an occult hepatitis B virus escape mutant in an anti-HBs positive, anti-HBc negative lymphoma patient. *J Clin Virol* 2007; 38(1): 83-6.
- [21] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46(1): 160-70.