

میزان واقعی هپاتیت C فعال در داوطلبان بی علامت اهداءکننده خون اردبیل

شهرام حبیب زاده^{۱*}، فرامرز درگاهی^۲، عباس یزدانید^۳، سعید حسینی اصل^۴، بهروز قزل باش^۲، عذرا چوخواچی زاده^۲، علیرضا صدیقی^۱

۱-دانشیار بیماریهای عفونی بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ۲ پزشکان سازمان انتقال خون اردبیل، ایران
۳-دانشیار بیماری های گوارش بیمارستان امام خمینی اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران
۴- استادیار ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران
۵- کارشناس ارشد هماتولوژی سازمان انتقال خون اردبیل، ایران
۶- دانشجوی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران
*نشانی برای مکاتبه: خیابان شهیدان نوعی اقدم، بیمارستان امام خمینی، تلفن ۰۰۹۸۹۱۴۴۵۱۹۶۷۰، فاکس: ۰۴۵۳۳۵۵۱۰۰۲۷، s.habibzadeh@arums.ac.ir پست الکترونیک

پذیرش برای چاپ آبان نود و سه

دریافت مقاله: شهریور ۹۳

چکیده

سابقه و هدف: ویروس HCV یک ویروس از نوع RNA تک زنجیره ای و از خانواده فلاوی ویریده است که عمدتاً از طریق تماس با خون آلوده منتقل می شود. بعد از ابتلا به ویروس تقریباً ۸۰٪ مبتلایان به عفونت مزمن مبتلا می شوند. مطالعه حاضر برای تعیین میزان واقعی هپاتیت C فعال در اهداکنندگان خون انجام شده است.

روش کار: در یک مطالعه توصیفی مقطعی تمام نمونه های خون اهدا شده در شهرستان اردبیل طی سه سال که هر دو تست غربالگری الیزا برای HCV Ab و تست اختصاصی و تائید کننده RIBA در آنها مثبت شده بود بررسی شدند. برای تائید عفونت فعال از آزمون RT-PCR استفاده گردید.

یافته ها: کل ۵۵۲۶۲ نمونه خون اهدایی از ۱۳۸۸ تا ۹۱ بررسی شد. در ۶۰ مورد (۱/۰٪) از این موارد، تست غربالگری ELISA برای HCV مثبت بود. تست اختصاصی RIBA در ۱۹ مورد (۳۱٪) از آنها مثبت گردید. تقریباً در ۷۰٪ موارد تست الیزا مثبت کاذب بود. در ۱۹ نفر با تست مثبت RIBA تائید بیماری فعال واکنش پلیمرز زنجیره ای انجام و در ۱۲ مورد (۶۳٪) وجود عفونت اثبات شد. نتیجه گیری: احتمال مثبت شدن تست PCR در افرادی که دارای آنتی بادی واقعی علیه هپاتیت C هستند (تست RIBA مثبت) نشانده مثبت شدن تست RT-PCR، در ۶۳٪ از افرادی که دارای آنتی بادی واقعی علیه هپاتیت C هستند (تست RIBA مثبت) نشانده بهبودی خودبخود در ۳۷٪ از افراد می باشد. قبل از اطلاق بیمار به افراد دارای تست الیزا مثبت، انجام تست های تشخیصی اختصاصی ضرورت دارد، زیرا احتمال تست مثبت کاذب الیزا وهم چنین بهبودی خودبخودی وجود دارد.

واژگان کلیدی: اهداکنندگان خون، HCV، عفونت فعال، اردبیل

مقدمه

آلودگی داشته اند و ویروس سال ها به عنوان عامل هپاتیت غیر A غیر B و در اثر تجویز این فراورده ها منتشر شده تلقی می شد (۴). تست های تشخیصی هپاتیت C به دو گروه تقسیم بندی میشوند. گروه اول، تست های سرولوژیک که آنتی بادی بر علیه ویروس را می سنجند و گروه دوم، تست های ملکولی هستند که ژنوم ویروس هپاتیت C (HCV-RNA) را مشخص می کنند. تست های سرولوژیک عموماً به منظور غربالگری بکار می روند. تست حساس enzyme immunoassay (EIA) و enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) برای سنجش آنتی بادی IgG بر علیه پلی پروتئین های ساختاری و غیر ساختاری ویروس می باشد، اما نتیجه مثبت آن ممکن است کاذب باشد و هم چنین بین عفونت فعال و بهبود یافته افتراق نمی گذارد. در جمعیت های با شیوع بالای بیماری، نسل های سوم این تست حساسیت ۹۷٪ دارد. آنتی بادی

ویروس HCV یک ویروس از نوع RNA ویریده است که عمدتاً از طریق تماس با خون آلوده منتقل می شود. بعد از ابتلا به ویروس تقریباً ۸۰٪ مبتلایان به عفونت مزمن مبتلا می شوند (۱) که در صورت عدم درمان ممکن است به عوارض کشنده ای مثل سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما منتهی شود (۲). گرچه درمان ممکن است به معالجه قطعی بینجامد ولی حتی در کشوری مثل ایالات متحده ۴۵ تا ۸۵ درصد مبتلایان به بیماری، به دلیل ماهیت بی سر و صدای عفونت از ابتلای خود به بیماری مطلع نیستند و لذا جز در موارد پیش رفته و عارضه دار برای درمان اقدام نمی کنند (۳).

از آنجا که فراورده های خونی تجویز شده در قبل از سال ۱۹۸۶ و خونهای اهدایی تجویز شده در قبل از سال ۱۹۹۱ در بسیاری از کشورها احتمال

تاهل) و عوامل خطر ابتلا به هپاتیت C (سابقه تزریق خون، قمه زنی، دیالیز، زندانی شدن، دندانپزشکی، کشیدن دندان، خالکوبی و ...) بررسی شد. از نظر اخلاقی تمام اطلاعات محرمانه بوده و انجام آزمونهای PCR بدون تحمیل هزینه به بیمار صورت گرفته است. تمامی آزمایشات PCR در آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی اردبیل و توسط یک نفر وبا اعتبارات پژوهشی پایان نامه تحقیقاتی انجام گرفته است. تست الیزا با کیت Hapanostika Ultra, ELISA Kit با حساسیت نزدیک به ۱۰۰٪ و تست ریبا با استفاده از کیت HCV Blot 3.0-071113018 با تکنیک وسترن بلات انجام شد. کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit محصول کمپانی Roche جهت استخراج RNA و کیت HCV RG محصول شرکت نوین ژن ایران برای تعیین کمیت ویروس بکار برده شد. حساسیت روش برای تعیین تعداد ۱۰۰ تعداد از ژنوم (۴۰۰ کپی) در هر میلی لیتر پلاسما بود و موارد منفی دوبار چک شدند.

یافته ها

تمامی ۵۵۲۶۲ مورد خون اهدا شده در سالهای ۱۳۸۸ تا ۹۱ بررسی شدند. در ۶۰ مورد از این نمونه ها (مربوط به ۶۰ نفر) اهداء کننده خون، تست غربال گری ELISA برای HCV مثبت بود (۰/۱٪). تست اختصاصی RIBA در ۱۹ مورد از آنها (۳۱٪) مثبت گردید. به عبارت دیگر نزدیک به ۷۰٪ موارد تست الیزا مثبت کاذب بود. در این ۱۹ مورد سونوگرافی کبد، تست های فونکسیون کبد، سطح آمینوترانسفرازها و تست تاییدکننده بیماری فعال با واکنش پلیمرز زنجیره ای به صورت کمی RT-PCR درخواست و در ۱۲ مورد (۶۳٪) عفونت اثبات گردید. در ۷ مورد تمامی تست ها طبیعی بودند. به این ترتیب در جمعیت بی علامت داوطلب اهدای خون در اردبیل احتمال مثبت شدن تست PCR در مواردی که تست غربال گری HCV Ab با الیزا مثبت باشد تقریباً ۲۰٪ می باشد. مثبت شدن تنها ۶۳٪ از افرادی که قطعاً دارای آنتی بادی علیه هپاتیت C هستند (تست RIBA مثبت) احتمالاً نشانه بهبودی خودبخود در ۳۷ درصد از افراد است.

از ۱۹ مورد تست RIBA مثبت، ۱۴ نفر مرد و ۵ نفر زن بودند. میانگین وانحراف معیار سن آنها 40.7 ± 15.2 سال بود. جوان ترین بیمار ۲۵ سال و مسن ترین آنها ۵۷ سال داشت. در ۱۵ نفر (۸۴/۲۱ درصد) از بیماران سابقه حداقل یک عامل خطر شناخته شده وجود داشت. هیچ کدام از آن ها سابقه ای از رفتار جنسی پرخطر، مسافرت به خارج از کشور و خال کوبی را اظهار نمی کردند. سابقه تزریق خون در ۴ بیمار (۲۳/۵۲ درصد)، اعتیاد به مواد مخدر تزریقی در ۴ بیمار (۲۳/۵۲ درصد)، سابقه ابتلا به هپاتیت C در خانواده در ۱ بیمار (۵/۹ درصد) و سابقه زندانی شدن در ۱ بیمار (۵/۹ درصد) وجود داشت. ۱۱ نفر (۶۴/۷ درصد) سابقه مراجعات متعدد دندان پزشکی (بجز کشیدن دندان) داشتند. در ۶ بیمار (۳۵/۳ درصد) سابقه بستری در بیمارستان وجود داشت. در ۲ بیمار (۱۱/۸ درصد) سابقه قمه زنی و در ۱ بیمار (۵/۹ درصد) سابقه چند دوره دیالیز در گذشته وجود داشت. در ۵ مورد سابقه اهداء خون خون در ۵ سال گذشته بدون گزارشی از وجود بیماری وجود داشت (جدول ۱). البته باید تاکید نمود که وجود سوابقی که بالقوه می توانند باعث ابتلا به هپاتیت سی شوند لزوماً به معنی اثبات نقش این عوامل خطر در ابتلا نیست و تنها احتمال دخالت آنها مطرح می نماید.

نوع IgM به دلیل آنکه در موارد حاد و مزمن ممکن است مثبت باشد در افتراق عفونت حاد از مزمن کاربرد ندارد. تست اختصاصی (Recombinant immunoblot assay) RIBA می باشد. ریبا با هدف شناسایی موارد مثبت کاذب از مثبت واقعی در سنجش آنتی بادی های ضد HCV ساخته شده است (۵). ویژگی تست ریبا بالا بوده و به عنوان نمونه در مطالعه امینی از ۴۸ بیمار با RIBA مثبت، ۹۱/۷ درصد تست RT-PCR مثبت نیز داشتند و همه مواردی که در تست RIBA به عنوان منفی ارزیابی شده بودند، در متد RT-PCR نیز منفی گزارش شدند (۶). تست های تأیید کننده عفونت فعال بر مبنای تعیین RNA ویروس با متد Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) در خون انجام می شوند (۷). تست های شناسایی RNA معمولاً بعد از یک تا دو هفته بعد از مواجهه با ویروس می توانند مثبت شوند گرچه این زمان می تواند از ۳ روز تا چند هفته هم متغیر باشد (۸).

میزان مثبت شدن تست های غربال گری هپاتیت C با بررسی Anti HCV در اهداکنندگان خون سالم در نقاط مختلف جهان متفاوت است. در مطالعه سال ۱۹۹۵ در انگلیس ۰/۳۵ درصد (۹) و در بررسی انجام شده بر روی خون های اهدایی در لهستان (۱۰) از ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۳ بطور میانگین ۴۸/۴۸ درصد، در کشورهای در حال رشد مثل اندونزی (۱۱) در سال ۱۹۹۵، ۲/۱ درصد و در سال ۱۹۹۷ در تایلند ۵/۶ درصد (۱۲) گزارش گردیده است، بخش عمده ای از تفاوت های موحود در این مطالعات به حساسیت و ویژگی تست های تعیین آنتی بادی های Anti HCV مربوط می شود.

با توجه به وجود موارد مثبت کاذب در تست های الیزا و هم چنین احتمال بهبودی خودبخود در سیر بالینی هپاتیت C، نتیجه مثبت تست سرولوژیک ممکن است بر عفونت قدیمی یا بهبود یافته و حتی مثبت کاذب دلالت نماید. این میزان به عواملی مثل شیوع بیماری در جامعه و هم چنین احتمال بهبودی خودبخود وابسته است که ارزش اخباری مثبت تست را متاثر می سازد.

هدف مطالعه حاضر تعیین میزان عفونت واقعی در اهداکنندگان خون در اردبیل می باشد. از طرفی انجام تست های واکنش زنجیره ای پلیمرز در افرادی که تست های اختصاصی هپاتیت C در آنها مثبت است موارد فعال بیماری را نشان خواهد داد و می توان تخمینی از میزان مثبت کاذب تست الیزا و بهبود خودبخودی عفونت هپاتیت C بدست داد.

روش کار

این مقاله حاصل یک مطالعه توصیفی مقطعی است که بر روی نمونه های خون اهدا شده در شهرستان اردبیل انجام شده است. جامعه آماری شامل تمامی نمونه هایی است که در طی مطالعه در شهرستان اردبیل اهداء شده بود. حجم نمونه شامل افرادی است که هر دو تست غربال گری الیزا برای HCV Ab و تست اختصاصی و تأیید کننده RIBA در آنها مثبت شده باشد. در این افراد سونوگرافی کبد تست های عمل کرد کبد، آمینوترانسفرازها و

آزمون PCR به صورت کمی ((Real Time) انجام گردید و موارد مثبت از نظر ویژگی های فردی (سن، جنس، محل سکونت، شغل، وضعیت

جدول ۱ : سابقه وجود فاکتورهای خطر در بیماران با تست ریبا مثبت

ردیف	سن	جنس	نتیجه تست PCR	ریسک فاکتور	سابقه دریافت خون	سابقه همپاتیت C	سابقه تزریقی	سابقه شدن	سابقه دندانپزشکی	سابقه مراجعات	سابقه بستری	سابقه قمه زنی بیمارستانز	سابقه دیالیز
۱	۳۹	زن	منفی	دارد	دارد	-	-	-	دارد	دارد	دارد	-	-
۲	۴۵	مرد	مثبت	دارد	دارد	-	-	-	-	-	دارد	-	-
۳	۳۳	مرد	منفی	ندارد	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۴	۳۸	مرد	مثبت	دارد	-	دارد	-	-	دارد	-	-	-	-
۵	۲۵	مرد	منفی	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۶	۳۴	مرد	مثبت	دارد	-	دارد	دارد	دارد	دارد	-	-	-	-
۷	۴۳	مرد	مثبت	دارد	-	دارد	-	-	-	-	دارد	دارد	دارد
۸	۲۹	مرد	مثبت	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۹	۳۴	مرد	مثبت	دارد	-	دارد	-	-	دارد	-	-	-	-
۱۰	۳۶	مرد	مثبت	دارد	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-
۱۱	۴۲	زن	مثبت	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۱۲	۴۴	زن	منفی	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۱۳	۳۹	مرد	منفی	دارد	-	-	-	-	-	دارد	-	-	-
۱۴	۵۳	زن	مثبت	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۱۵	۴۱	مرد	منفی	دارد	-	-	-	-	دارد	-	-	-	-
۱۶	۴۳	زن	منفی	ندارد	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۷	۵۵	مرد	مثبت	ندارد	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۸	۴۳	مرد	مثبت	دارد	دارد	-	-	-	دارد	دارد	دارد	-	-
۱۹	۵۷	مرد	مثبت	دارد	-	دارد	-	-	-	دارد	دارد	دارد	-

توجه به امکان وجود موارد مثبت کاذب و نیز امکان بهبودی از عفونت فعال قابل قضاوت نبوده اند. در مطالعه موتیمر در انگلیس (۹) بر روی نمونه های خون اهدایی سال ۱۹۹۵ تنها در ۵٪ از ۰/۳۵٪ افرادی که تست غربال گری نسل اول مثبت داشته اند وجود آنتی بادی با تست های اختصاصی تایید شده است. در ایران نیز شیوع میزان عفونت HCV در یک متانالیز ۰/۱۶ درصد تخمین زده شده (۱۴) و در یک مطالعه دیگر دریافت خون انجام آندوسکوپی، فعالیت های جنسی در خارج از چهارچوب خانواده، مصرف تزریقی و غیر تزریقی مواد مخدر و زخمی شدن در جریان جنگ تحمیلی ایران و عراق از عوامل خطر برای ابتلا بوده اند (۱۵).

بحث

تست های تأیید کننده عفونت فعال بر متد Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) در خون انجام می شوند و برای تایید قطعی نتایج تست های غربال گری انجام آنها ضرورت دارد. تفاوت های موجود در میزان موارد مثبت تست های غربال گری همپاتیت C با بررسی Anti HCV در اهداکنندگان خون سالم در نقاط مختلف جهان، هم به دقت کیت های مورد استفاده و هم به شیوع واقعی بیماری در جامعه مربوط می شوند. در اندونزی در سال ۱۹۹۵ با استفاده از نسل دوم کیت ها (۱/۱ درصد) (۱۱)، و در سال ۱۹۹۷ با استفاده از کیت های نسل دو و سه در تایلند ۵/۶ درصد (۱۲)، گزارش گردیده و لی با

دارای آنتی بادی واقعی علیه هیپاتیت C هستند (تست RIBA مثبت) به احتمال زیاد نشانه پاک شدن خودبخودی ۳۷٪ از افراد می باشد. با این حال احتمال ضعیفی وجود دارد که در این افراد تیترهای پایین ویروس که قابل کشف نبوده باشند وجود داشته باشد و به رغم منفی بودن واکنش های زنجیره پلیمرز در پلاسما این تست در نمونه بافت کبد مثبت باشد و اهمیت این قضیه در مشابهت سیر بالینی این افراد با افرادی است که نمونه RT-PCR سرم آنها مثبت می باشد (۲۲). برای تعیین موارد مذکور بررسی های سریال بصورت سالانه با تکرار تست RT-PCR سرم و نیز بررسی تست های عمل کرد کبد یا فیبرواسکن کبد به منظور احراز بهبودی واقعی و پاک شدن بیمار از ویروس هیپاتیت سی راه گشا هستند که در مطالعه حاضر انجام نشده اند و این از محدودیت های مطالعه می باشد.

نتیجه گیری

تست منفی RT-PCR HCV ، در یک فرد داوطلب سالم اهدای خون که نشانه قطعی سابقه عفونت بصورت مثبت بودن تست ریا در او وجود دارد نشانه بهبود خودبخودی بیمار است. گر چه تنها یک بار چک نمودن وجود ژنوم ویروس در خون ممکن است با نتایج منفی کاذب ناشی از نوسان تعداد ویروس هم راه شود ولی این موارد تنها در تعداد کم ویروس و نیز اوایل سیر بیماری در حالی که هنوز آنتی بادی ساخته نشده و ویروس تکثیر قابل توجهی نداشته شایع تر است. احتمال بهبود خودبخودی گزارش شده در مطالعات مختلف متفاوت بوده ولی در هر حال بیان گر آن است که قبل از زدن مارک بیماری به افرادی که تست الیزا Anti HCV در آنها مثبت شده، انجام تست های اختصاصی ضرورت دارد ، زیرا در برخی افراد تست الیزا مثبت کاذب است و در برخی نیز بهبودی خودبخود روی می دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه محصول پایان نامه دکتر علیرضا صدیقی است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شده است. از مساعدت و هم کاری آقای دکتر حبیب افضلی فرد ریاست محترم بیمارستان امام خمینی (ره) و سایر پرسنل بیمارستان تشکر می نمایم.

در مطالعه ی خان و هم کاران بر روی ۷۱۴۸ داوطلب اهداء خون پاکستانی در ۱۳۵ نفر (۱/۸۹٪) آنتی بادی علیه HCV وجود داشته و از این افراد تنها ۸۷٪ تست PCR مثبت داشته اند (۱۶). در مطالعه ۳۴۷۲۵ اهداکننده داوطلب خون در استرالیا نیز تست الیزا در ۱۸۳٪/۰/۵۵ از آنان مثبت شده ولی آزمون PCR تنها در ۶۹ نفر (۳۸٪) از آنها عفونت را تایید نموده است (۱۷). در بررسی اهداکنندگان خون در کره از ۱۱۰۶۴۵۳۲ فرد میزان مثبت بودن آنتی بادی ۰/۱۶٪ (۱۷۲۵۰ نفر) افراد را شامل شده است ولی تنها ۰/۵٪ از این افراد ، دارای آزمون PCR مثبت بوده اند (۱۸). در مطالعه زمانی در شهر آمل از استان مازندران که مبتنی بر جمعیت بوده ۳ نفر از ۵ نفر (۶۰ درصد) بیمارانی که تست ریبای مثبت داشتند دارای هیپاتیت مزمن فعال بوده اند (۱۹). تأیید نشدن وجود عفونت فعال در افرادی که قطعاً دارای آنتی بادهای ضد HCV می باشند به طراحی مطالعات کوهورت برای بررسی سیر عفونت حاد منتهی شده است تا احتمال وقوع بهبودی خودبخودی از هیپاتیت C مورد ارزیابی قرار گیرد که میزان های بالا و نزدیک به ۵۰ درصد را گزارش نموده اند (۲۰) و به عنوان نمونه مطالعه سیر بیماری به دنبال ابتلا ناشی از انتقال خون آلوده در برزیل در ۶۵ بیمار با تابلوی هیپاتیت حاد سی در یک پی گیری ۴۰ ماهه معلوم نموده که میزان بهبودی تجمعی از بیماری حاد بصورت خودبخودی ۴۴/۶٪ می باشد. میزان بهبودی با تعداد کم تر ویروس در زمان بیماری و وجود علائم بالینی ارتباط داشته و تعداد کم ویروس و وجود علائم بالینی با افزایش احتمال بهبودی هم راه بوده اند (۲۱). هم چنین در مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به هیپاتیت حاد C که ۲۰ نفر از آنان زردی داشته اند ۱۳ نفر در طی ۱۲ هفته بهبودی داشته اند که با نرمال شدن سطوح ترانس آمینازها و پاک شدن سرم از ویروس مشخص شده و وجود زردی با بهبودی خودبخود رابطه داشته است و در کل ۳۰ درصد موارد هیپاتیت حاد بهبود داشته اند (۲۱).

در مطالعه حاضر بهبودی از عفونت هیپاتیت C در افرادی که دارای تست های ریبای مثبت می باشند با نرمال بودن نتایج هر ۳ تست بررسی عمل کرد کبد ، سونوگرافی کبد و تعیین وجود ژنوم ویروس (RT-PCR) در یک فرد فاقد علامت تعریف شده و احتمال مثبت شدن تست PCR در افرادی علامت اردبیلی که آزمون غربال گری الیزا در آنها مثبت است تقریباً ۲۰٪ بوده و مثبت شدن تست RT-PCR ، در ۶۳٪ از افرادی که

REFERENCES

- 1-Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-74.
- 2 - Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A., et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2011;140:1182-8.

- 3- CDC. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. MMWR 2012;61(No. RR-4). August 17, 2012, Available from: http://www.cdc.gov/mmwr/cme/serial_conted.html
- 4- Soldan K, Ramsay M, Robinson A, Harris H, Anderson N, Caffrey E, et al. The contribution of transfusion to HCV infection in England. *Epidemiol. Infect*; 2002; 129: 587-91
- 5- Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol*. 2002;40(12):4407-12
- 6- Sedighe Amini Kafiabad, Ali Talebian, Zahra Ataii, Fahime Ranjbar Karmani. Relevance of RIBA-3 Complementary Test to HCV RT-Positivity, *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences.*, 2006;10(2):45-49
- 7- Sung C. Lee, Anisha Antony, Nitta Lee, Jeff Leibow, Jian Q. Yang, Stephen Soviero, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J. Clin. Microbiol.* 2000 38(11):4171-4179
- 8- Teh Y. Wang, Hsing T. Kuo, Lien C. Chen, Yu T. Chen, Chun N. Lin and Matthew M. Lee. Use of Polymerase Chain Reaction for Early Detection and Management of Hepatitis C Virus Infection after Needle stick Injury. *Ann Clin Lab Sci* . 2002 32(2): 137-141
- 9 - Mutimer DJ, Harrison RF, O'Donnell KB, Shaw J, Martin BA, Atrah H, , et al. Hepatitis C virus infection in the asymptomatic British blood donor. *J Viral Hepat*. 1995;2(1):47-53.
- 10 - Seyfried H, Brojer E, Grabarczyk P, Rosińska M, Gronowska A, Letowska M. Prevalence of hepatitis C virus markers in Polish blood donors in 1994-2003]. *Przegl Epidemiol*. 2005;59(4):807-14. [Article in Polish]
- 11 – Sulaiman HA, Julitasari. Sie A, Rustam M, Melani W, Corwin A, et al. Prevalence of hepatitis B and C viruses in healthy Indonesian blood donors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89:167-170.
- 12 -Songsivilai S, Jinathongthai S, Wongsena W, Tiangpitayakorn C, Dharakul T. Prevalence of hepatitis C infection among blood donors in northeastern Thailand .*Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(1):66-9..
- 13 – Arthur RR, Hassan NF, Abdallah MY, El-Sharkawy MS, Saad MD, Hackbart BG, et al. Hepatitis C antibody prevalence in blood donors in different governorates in Egypt. *T Roy Soc Trop Med H*. 1997;91(3):271-4
- 14 - Seyed Reza Mohebbi, Azar Sanati, Kouros Cherahipour, Mohammad Rostami Nejad, Hamid Mohaghegh Shalmani, and Mohammad Reza Zali. Hepatitis C and Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Risk Factors in a Large Cohort of Pregnant Women in Lorestan, West of Iran. *Hepat Mon*, 2011; 11(9): 736-739.
- 15 - Alavian SM, Gholami B, Masarrat S. Hepatitis C risk factors in Iranian volunteer blood donors: a case-control study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(10):1092-7.

- 16 -Khan NU, Ali I, Ahmad NU, Iqbal A, Rehman LU, Munir I, et al. Prevalence of active HCV infection among the blood donors of Khyber Pakhtunkwa and FATA region of Pakistan and evaluation of the screening tests for anti-HCV. *Virol J.* 2011 Apr 1;8:154. Available from: <http://www.virologyj.com/content/8/1/154>
- 17 -Mison LM, Young IF, O'Donoghue M, Cowley N, Thorlton N, Hyland CA. Prevalence of hepatitis C virus and genotype distribution in an Australian volunteer blood donor population. *Transfusion.* 1997;37(1):73-8.
- 18-Deok Ja Oh, M.D., Yoon Mee Park, M.D., Young Ik Seo, M.D., Jae Sook Lee, B.S., and Ja Young Lee, M.S Prevalence of Hepatitis C Virus Infections and Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes among Korean Blood Donors. *Ann Lab Med.* 2012; 32(3): 210–215. Available from: <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.3.210>
- 19 - Farhad Zamani, , Masoudreza Sohrabi, Hossein Poustchi, Hossein Keyvani, Fatemeh Sima Saedian, Hossein Ajdarkosh, et al. Prevalence and Risk Factors of Hepatitis C Virus Infection in Amol City, North of Iran: A Population-Based Study (2008-2011). *Hepat Mon.* 2013 December; 13(12): e13313. Published online Dec 7, 2013. doi: 10.5812/hepatmon.13313
- 20- S Barrett, J Goh, B Coughlan, E Ryan, S Stewart, A Cockram, et al. The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. *Gut* 2001;49:423–430
- 21 -Lewis-Ximenez LL, Lauer GM, Schulze Zur Wiesch J, de Sousa PS, Ginuino CF, Paranhos-Baccalá G, et al. Prospective follow-up of patients with acute hepatitis C virus infection in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2010 1;50(9):1222-30.
- 22 -Santantonio T, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, Gentile A, et al. Natural course of acute hepatitis C: a long-term prospective study. *Dig Liver Dis.* 2003;35(2):104-13.
- 22 - G H Haydon, L M Jarvis, C S Blair, P Simmonds, D J Harrison, K J Simpson, et al. Clinical significance of intrahepatic hepatitis C virus levels in patients with chronic HCV infection. *Gut* 1998;42:570–575