خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۵ زمستان ۸۵ ویژه‌نامه(۳۸۷-۳۷۹)

بررسی وجود DNA ویروس هپاتیت B در پلاسمای حاصل از واحدهای خون اهداکنندگان HBsAg منفی و anti-HBc مثبت استان تهران با استفاده از PCR

دکتر صدیقه امینی کافی‌آباد[۱]، دکتر علی طالبیان[۲]، مینا مقتدایی[۳]، فهیمه رنجبر کرمانی[۴]، فرشته فردوسیان[۵]، شهرام سمیعی[۶]، افسانه تقی‌نیا[۷]، مریم سبحانی[۴]، زهرا عطایی[۸]، مهناز کواری[۷]، زهرا پاز[۷]

چکیده

سابقه و هدف

بروز هپاتیت B پس از انتقال خون با غربالگری خون‌های اهدایی برای HBsAg کاهش یافته ولی هنوز HBV مسؤول بروز تعدادی موارد هپاتیت پس از انتقال خون در سراسر جهان است. برآورد و تخمین میزان anti-HBc و HBV DNA مثبت در واحدهای خون‌های اهدایی جهت ارزیابی لزوم غربالگری اهداکنندگان خون از نظر anti-HBc مهم است. در این مطالعه واحدهای خون اهدایی که HBsAg منفی بودند از نظر anti-HBc مورد بررسی قرار گرفته و وجود HBV DNA در نمونه‌های anti-HBc مثبت با روش PCR ارزیابی شدند.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. در این مطالعه ۲۰۰۰ اهداکننده خون که در آزمایش‌های غربالگری HBsAg ، anti-HCV ، anti-HIV و RPR منفی بودند،از نظر وجود anti-HBc(Total) بررسی شدند. کلیه نمونه‌های مثبت به صورت منفرد از نظر anti-HBs و وجود HBV DNA با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. حساسیت آزمایش HBV DNA(PCR) به میزان ۳۰۰ geq/ml طبق پانل‌های تاییدی VQC برآورد شده است.

یافته‌ها

از ۲۰۰۰ نمونه اهداکننده، (۱۱/۵٪) ۲۳۰ اهداکننده anti-HBc مثبت و از این گروه، ۱۷۹ نمونه anti-HBs مثبت بودند. ۲۲۷ نمونه در بررسی HBV DNA(PCR) منفی گزارش شدند. ۳ اهداکننده برای بررسی مجدد فراخوان شدند که ۲ نفر آنان مراجعه کرده و نمونه جدید منفی گزارش شد.

نتیجه گیری

تحقیقات آینده برای ارزیابی حضور HBV DNA در نمونه‌های خون اهداکنندگان anti-HBc مثبت با بهره‌برداری از دستگاه‌های تمام اتوماتیک و استفاده از کیسه‌های خون دارای ضمایم جانبی توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: **PCR ، اهداکنندگان خون، HBsAg**

تاریخ دریافت : ۸۴/۱۲/ ۳
تاریخ پذیرش : ۸۵/۱۱/ ۷

۱- مؤلف مسؤول: متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲- متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- کارشناس ارشد انگل شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایرن
۵- کارشناس ارشد میکروب شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷- کارشناس میکروب شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۸- کارشناس زیست شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

مقدمه

خطر انتقال ویروس هپاتیت B(HBV) از راه تزریق خون با غربالگری اهداکنندگان برای آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) کاهش یافته، اما هنوز عفونت HBV پس از دریافت خون گزارش می‌شود. خطر باقیمانده انتقال HBV در بین عفونت‌های منتقله از راه خون و فرآورده‌های آن شایع‌تر است، چنان که ۱۳-۷ درصد موارد هپاتیت پس از انتقال خون با یک مورد انتقال عفونت در ۶۳،۰۰۰ تا ۱۰۰،۰۰۰ واحد تزریقی گزارش می‌شود(۸-۱).

آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن مرکزی ویروس هپاتیت B (anti-HBc) ، بهترین و حساس‌ترین شاخص سابقه تماس با ویروس هپاتیت B است. این آنتی‌بادی در مرحله حاد بیماری ظاهر می‌شود و در هپاتیت مزمن، پس از بهبودی نیز قابل شناسایی است. ارزیابی و تفسیر وجود anti-HBc بدون حضور سایر شاخص‌های عفونت با HBV مانند HBsAg و anti-HBs مشکل بوده و می‌تواند به اشکال زیر توجیه شود: ۱) هپاتیت مزمن با کاهش HBsAg در خون تا حد زیر محدوده قابل شناسایی HBsAg، ۲) با وجود بهبودی از عفونت با ویروس هپاتیت B وجود anti-HBs قابل سنجش نبوده و آنتی‌بادی در خون کاهش یافته است، ۳) وجود موتاسیون در ژن HBsAg که آنتی‌ژن تولیدی توسط کیت‌های رایج قابل شناسایی نیست، ۴) دوره پنجره سرولوژیک که آنتی‌ژن ناپدید و آنتی‌بادی به تدریج ظاهر می‌شود، ۵) در ارتباط با سایر عفونت‌ها مانند عفونت با HIV و HCV مشاهده می‌شود، و بالاخره شایع‌ترین علت آن، ۶) واکنش‌های غیر اختصاصی و مثبت کاذب anti-HBc است(۱۳-۹، ۱)، بنابراین تثبیت و برقراری روش آزمایشگاهی جهت شناسایی واحدهای خونی که HBsAg منفی بوده ولی می‌توانند عفونت را منتقل نمایند در کنترل انتقال افقی عفونت نقش مهمی دارد.

برای ارزیابی انتقال عفونت HBV از طریق واحدهای خون HBsAg منفی و anti-HBc مثبت، واحدهای اهدایی که در آزمایش‌های غربالگری منفی بوده ولی anti-HBc مثبت بودند از نظر وجود HBV DNA مورد آزمایش قرار گرفتند. در یک مطالعه در هند فراوانی HBV DNA در واحدهای مذکور ۹/۹۱٪ و در ایالت مینوسوتای آمریکا در جمعیت اهداکنندگان با شیوع کم HBV، عفونت صفر گزارش شده است(۱۴، ۱۳).

با توجه به شیوع عفونت با ویروس هپاتیت B در ایران که در آمارهای ارایه شده جهانی در گروه کشورهای شیوع متوسط قرار گرفته است(۱۵)، برای ارزیابی موارد HBV DNA مثبت در نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت، ۲۰۰۰ اهداکننده که در آزمایش‌های غربالگری منفی بودند از نظر حضور HBV DNA مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی از ۲۰۶۸ اهداکننده خون داوطلب در پایگاه انتقال خون تهران به روش سرشماری نمونه‌گیری به عمل آمد. از هر اهداکننده دو لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA برای آزمایش PCR و یک لوله فاقد ضد انعقاد برای انجام آزمایش anti-HBc total ، نمونه خون جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از انتقال آلودگی، برای قطع کورد کیسه خون‌گیری برای هر واحد از قیچی مجزا استفاده شد یا پس از ضد عفونی مورد استفاده مجدد قرار گرفت. کلیه نمونه‌هایی که دارای نتیجه مثبت در یکی از آزمایش‌های غربالگری شامل anti-HIV، HBsAg، anti-HCV و RPR بودند از مطالعه حذف شدند. ۲۰۰۰ نمونه از ۲۰۶۸ نمونه جمع‌آوری شده در آزمایش‌های غربالگری منفی گزارش شدند. ۲۰۰۰ نمونه مورد بررسی و آزمایش anti-HBc با روش آنزیم ایمنواسی و HBV DNA با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تحت بررسی قرار گرفتند.

لوله‌های خون حاوی ضد انعقاد به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. پس از جداسازی نمونه، ۵۰۰ میکرولیتر(۰/۵ میلی‌لیتر) پلاسما به میکروتیوب‌های اپندورف درب قفل‌دار ۱/۵ میلی لیتری برای ذخیره سازی منتقل و در دمای ۷۰°C- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. نمونه برای آزمایش anti-HBc پس از سانتریفوژ وجداسازی در دمای ۲۰°C- تا زمان انجام آزمایش ذخیره شد. نمونه‌های ۲۰۰۰ اهداکننده خون HBsAg منفی از نظر وجود anti-HBc total با استفاده از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

کیت ETI-AB-COREK-2 محصول شرکت دیاسورین مورد آزمایش قرار گرفتند و سپس نمونه‌های anti-HBc مثبت به صورت منفرد از نظر HBV DNA (PCR) ارزیابی شدند. نمونه‌های anti-HBc مثبت با کیت ETI-AB-AUK-3 از شرکت دیاسورین از نظر وجود anti-HBs بررسی شدند.

شناسایی ژنوم ویروس در نمونه‌ها

تخلیص DNA از پلاسما (Extraction) :

برای تخلیص ابتدا از ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما استفاده شد. با استفاده از بافر لیز کننده پروتئین‌های پوشش ویروس و موجود در پلاسما از ژنوم ویروس جدا گردید. اسید نوکلئیک آزاد شده از پروتئین‌های موجود در محیط با استفاده از جاذب(Sorbent) جدا و برای جداسازی DNA ویروس متصل به سوربنت از بافر حل کننده استفاده شد. محصول نهایی در صورت حضور ژنوم ویروس هپاتیتB ، حاوی DNA تخلیص شده ویروس بود.

تکثیر ژنوم ویروس (Amplification) :

برای تکثیر از مخلوط اصلی حاوی الیگونوکلئوتیدها یا dNTP و آغازگرها همراه با بافر حاوی گلیسرول، منیزیم کلراید، بافر ۱۰X و آنزیم Taq DNA Polymerase استفاده شد که به DNA استخراج شده، افزوده شدند. جداسازی دو رشته DNA، اتصال آغازگر به زنجیره‌های DNA هدف و طویل شدن رشته‌های مکمل با استفاده از تغییرات دما در ترمال سایکلر انجام شد.

شناسایی و ارزیابی (Detection):

۱۳ لاندا از محصول تکثیر ژنوم ویروس با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شده به وسیله رنگ اتیدیوم بروماید و در طول موج ۳۰۲ نانومتر باند DNA در جایگاه ۱۵۰ bp رؤیت شد.

ارزیابی کیفی هر سری آزمایش:

برای ارزیابی هر سری آزمایش که شامل ۱۱ نمونه پلاسما بود، از نمونه پلاسمای مثبت قطعی با رقت 10^{-2} به عنوان نمونه مثبت استفاده شد که مطابق نمونه‌های پلاسمایی کلیه مراحل آزمایش بر روی آن انجام گرفت. در تعدادی از نوبت‌های کاری از نمونه‌های ران کنترل تولید(VQC(Virological Quality Control حاوی ۳۰۰۰geq/ml استفاده گردید. نمونه کنترل مثبت، DNA ویروس هپاتیت B بود و برای کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد. هر سری آزمایش که نمونه مثبت، کنترل مثبت و یا کنترل منفی آن منطبق با شرایط فوق نبود غیر قابل قبول اعلام شده و تکرار گردید. در مجموع سه نوبت کاری، به علت عدم واکنش کنترل مثبت(یک مورد) و عدم پاسخ ران کنترل VQC (دو مورد)، ۳۳ نمونه مورد آزمایش مجدد قرار گرفت.

حساسیت و ویژگی آزمایش :

آغازگر مورد استفاده از ناحیه Pre-S انتخاب شده و جهت تعیین ویژگی آغازگر با برنامه نرم‌افزاری بلاست مورد ارزیابی قرار گرفت که جهت ویروس هپاتیت B کاملاً اختصاصی بود.

جهت تعیین حساسیت کیت مصرفی از پانل‌های تعیین سطح کارآیی استفاده و میزان حساسیت آزمایش حداقل ۳۰۰ geq/ml با اطمینان ۹۵٪ برآورد گردید.

اطلاعات به دست آمده جمع‌آوری و بر حسب درصد در جمعیت مورد مطالعه بیان شد.

یافته ها

از ۲۰۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از اهداکنندگان، ۲۳۰ نمونه از نظر آزمایش anti-HBc total با کیت ETI-AB-COREK-2 نتیجه مثبت داشتند. از بین ۲۳۰ اهداکننده، ۲۳ مؤنث(۱۰٪) و بقیه مذکر(۹۰٪) بودند. محدوده سنی اهداکنندگان ۱۸ تا ۶۸ سال بود(جدول ۱).

از ۲۳۰ نمونه، ۱۷۹ نمونه anti-HBs مثبت و بقیه منفی بودند. آزمایش HBV DNA (PCR) بر روی ۲۳۰ نمونه به صورت منفرد انجام شد. از میان ۲۳۰ نمونه‌ای که آزمایش HBV DNA (PCR) برای آن‌ها انجام شد، در اولین نوبت آزمایش ۲۱ نمونه واکنش نشان دادند. در دو نوبت کاری جداگانه ۲۱ نمونه فوق مجدداً مورد آزمایش قرار گرفتند.

در مجموع نمونه‌هایی که ۲ بار از ۳ بار فاقد واکنش بودند به عنوان منفی گزارش شدند. اگر نمونه‌ای دو بار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

جدول ۱: توزیع فراوانی اهداکنندگان خون که در آزمایش‌های غربالگری منفی و anti-HBc مثبت بوده‌اند به تفکیک سن، جنس، وضعیت اهدا و نتایج آزمایش‌های anti-HBc و anti-HBs

عوامل مرتبط	اهداکنندگان مورد مطالعه n :۲۰۰۰	وضعیت آزمایش		
		anti-HBc مثبت n :۲۳۰	anti-HBc مثبت و anti-HBs مثبت n :۱۷۹	anti-HBc و anti-HBs منفی n :۵۱
وضعیت اهدا:				
مستمر	۱۲۱۲(۶۰/۶)	۱۲۷(۵۵/۲)	۹۶(۵۳/۶)	۳۱(۶۰/۷)
با سابقه	۵۳۷(۲۶/۹)	۸۳(۳۶)	۶۷(۳۷/۴)	۱۶(۳۱/۴)
نوبت اول	۲۵۱(۱۲/۵)	۲۰(۸/۷)	۱۶(۰/۹۳)	۴(۷/۸)
جنس:				
مؤنث	۱۲۵(۶/۲۵)	۲۳(۱۰)	۲۱(۱۱/۷)	۲(۳/۹)
مذکر	۱۸۷۵(۹۳/۷۵)	۲۰۷(۹۰)	۱۵۸(۸۸/۳)	۴۹(۹۶)
سن(برحسب سال):				
۱۸–۲۴	۲۷۹(۱۴)	۶(۲/۶)	۴(۲/۲)	۲(۳/۹)
۲۵–۳۴	۶۰۱(۳۰)	۴۶(۲۰)	۳۸(۲۱/۲)	۸(۱۵/۷)
۳۵–۴۴	۶۱۸(۳۰/۸)	۶۲(۲۷)	۵۱(۲۸/۵)	۱۱(۲۱/۶)
۴۵–۵۴	۳۵۵(۱۷/۷)	۷۶(۳۳)	۵۹(۳۳)	۱۷(۳۳/۳)
۵۵–۶۴	۱۴۳(۷/۲)	۳۹(۱۷)	۲۶(۱۴/۵)	۱۳(۲۵/۵)
۶۵ به بالا	۴(۰/۲)	۱(۰/۴)	۱(۰/۶)	۰

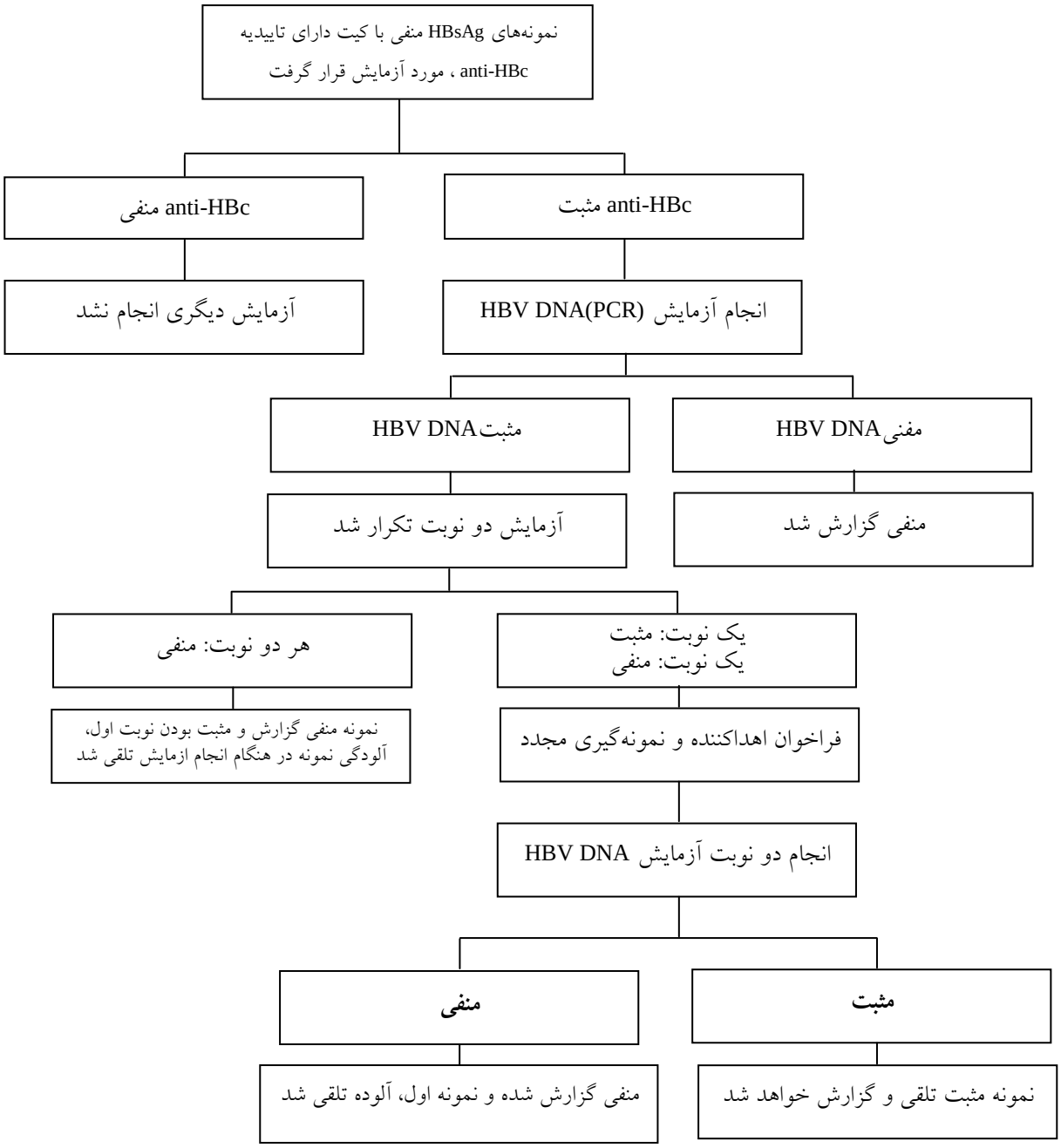
از سه بار دارای واکنش بود، به عنوان نمونه مثبت گزارش گردید. از بین ۲۱ نمونه‌ای که مجدداً برای دو نوبت دیگر بررسی شدند، ۳ نمونه از سه نوبت آزمایش، در دو نوبت مثبت بودند. برای جلوگیری از خطای آلودگی در هنگام تهیه نمونه، ۳ اهداکننده فراخوان شده و مجدداً نمونه تهیه شد. ۲ نفر از ۳ اهداکننده مراجعه کردند و نمونه جدید آن‌ها مورد آزمایش HBV DNA (PCR) در دو نوبت کاری متفاوت قرار گرفت که فاقد واکنش بود(شکل ۱)(۱۹–۱۶).

بحث

شیوع anti-HBc در اهداکنندگان در این مطالعه ۱۱/۵٪ برآورد شده که تقریباً مشابه سایر مطالعاتی است که در جمعیت اهداکنندگان تهران انجام شده و بین ۱۳٪–۱۱٪ گزارش شده است(مطالعه منتشر نشده سال‌های ۸۰–۷۸ در اهداکنندگان تهران). ولی در مطالعه‌ای که بر روی اهداکنندگان شیراز انجام شده ۶/۵۵٪ گزارش شده است(۲۰). تفاوت شیوع anti-HBc می‌تواند بیانگر تفاوت در شیوع عفونت HBV در نواحی مختلف جغرافیایی کشور باشد. بر طبق آمارهای فوق در صورت معدوم نمودن واحدهای خون anti-HBc مثبت تعداد واحدهای خون غیر قابل مصرف در نواحی مختلف کشور متفاوت بوده و در نواحی با شیوع زیاد عفونت HBV، تعداد واحدهای غیر قابل مصرف می‌تواند تا ۲۰٪ واحدهای اهدایی افزایش یابد. شیوع anti-HBs در این مطالعه ۷۷/۸٪ موارد anti-HBc مثبت بوده است.

در مطالعاتی که در یونان سال ۲۰۰۰، کانادا سال ۱۹۹۴، برزیل سال ۲۰۰۵، برزیل(سائوپلو) سال ۲۰۰۱، اهداکنندگان بار اول برزیل در ۱۹۹۷و اهداکنندگان بار اول آلمان در سال ۲۰۰۲ انجام شده، شیوع HBV DNA در اهداکنندگان HBsAg منفی و anti-HBc مثبت به ترتیب ۰٪، ۰٪، ۳/۳٪، ۰٪، ۲/۷۲٪، ۱/۵٪ بوده است(۲۲، ۲۱، ۱۱،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]



شکل ۱: الگوریتم بررسی نتایج نمونه‌های اهداکنندگان HBsAg منفی و anti-HBc مثبت

۱۰، ۸، ۱). در تعدادی از این اهداکنندگان علاوه بر این که anti-HBc مثبت بوده، anti-HBs نیز مثبت گزارش شده است.

حساسیت آزمایش HBV DNA در مطالعات مختلف متفاوت بوده و از ۲۷/۸ IU/ml تا ۵۰۰۰copies/ml برآورد شده است(۲۱، ۱۶، ۱۱).

در مطالعه‌ای که در شیراز بر روی اهداکنندگان خون انجام شده است ۶/۵۵٪ اهداکنندگان HBsAg منفی، anti-HBc مثبت بودند که ۱۲/۲٪ آنان HBV DNA (PCR) مثبت گزارش شده‌اند ولی در این مطالعه حساسیت آزمایش، نحوه جمع‌آوری نمونه و راه‌های جلوگیری از آلودگی نمونه‌های منفی با نمونه‌های مثبت بیان نشده است(۲۰).

در این مطالعه از بین ۲۳۰ اهداکننده HBsAg منفی که

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

anti-HBc مثبت بودند، ۳ اهداکننده در مرحله اول انجام آزمایش‌ها نتیجه مثبت داشتند. برای تایید نتیجه مثبت، اهداکنندگان فوق فراخوان و مجدداً نمونه‌گیری شدند، که در ۲ اهداکننده‌ای که نمونه‌گیری مجدد شدند HBV DNA منفی بود(۱۹). این ۳ اهداکننده برای anti-HBs مثبت بودند. در نمونه‌های اهداکنندگان HBsAg منفی و anti-HBc مثبت، تعداد ذرات ویروس در خون کم بوده و از ۳۰-۱۰ copies/ml تا ۵۰IU/ml گزارش شده است(۱۸، ۹). وجود نمونه‌های HBsAg منفی که anti-HBc و anti-HBs مثبت بوده و در آزمایش HBV DNA (PCR) مثبت هستند، این فرضیه قدیمی که با ظهور anti-HBs بهبودی رخ داده و عفونت و ویروس در خون وجود ندارد نیاز به بازنگری دارد ولی انتقال عفونت از طریق واحدهای خون با شرایط فوق ثابت نشده است(۲۴، ۲۳، ۲۱، ۱۱، ۱۰). در مطالعه‌ای که در انستیتوی ایمونولوژی و طب انتقال خون در لوبک آلمان انجام شد مقادیر کمی از سرم و لنفوسیت ۳ اهداکننده‌ای که HBsAg منفی ولی anti-HBc و anti-HBs و HBV DNA مثبت بودند به سه شامپانزه تلقیح شد ولی در هیچ یک از این حیوانات عفونت با HBV گزارش نشد(۱۱). انتقال واحدهای خون که فقط anti-HBc و HBV DNA مثبت هستند می‌تواند منجر به انتقال عفونت در گیرندگان خون شود(۲۵، ۹، ۵).

غربالگری خون‌های اهدایی برای عفونت با ویروس هپاتیت B با انجام آزمایش HBsAg و anti-HBc نمی‌تواند منجر به حذف تمامی موارد پس از دریافت خون شود. چنان که در انگلستان دو مورد عفونت از طریق واحدهای خون HBsAg ، anti-HBc ، anti-HBs و HBV DNA منفی گزارش شده است و در برزیل نیز انتقال عفونت از طریق یک واحد خون HBsAg و anti-HBc منفی رخ داده است(۲۷، ۲۶، ۶).

برای افزایش سلامت خون و کاهش خطر باقیمانده انتقال عفونت HBV، انجام anti-HBc در مطالعات مختلفی پیشنهاد شده است(۱۰، ۸، ۶). اما به علت وجود موارد مثبت کاذب و غیر اختصاصی که در کشورهایی با شیوع زیاد عفونت با HBV می‌تواند منجر به معدوم نمودن تعداد زیادی واحدهای خون اهدایی شود و ذخایر خون این کشورها را با چالش مواجه سازد و در ضمن منجر به حذف کلیه نمونه‌های مثبت HBV DNA نمی‌شود و در کشورهایی با شیوع کم عفونت با HBV منجر به تعداد زیادی واکنش ضعیف و فاقد اهمیت بالینی می‌گردد(۳۰ ـ ۲۸، ۱۴، ۱۱، ۶، ۱). انجام آزمایش HBV DNA به شکل مجموعه‌های پلاسمایی به علت سطح پایین ویروس و عدم امکان شناسایی کلیه موارد مثبت در مجموعه‌های پلاسمایی و تفاوت قابل توجه شناسایی نمونه‌های مثبت در مجموعه‌های پلاسمایی و انجام آزمایش بر روی هر نمونه کارآیی آن را عملاً کاهش داده است(۳۱، ۲۳، ۱۹، ۱۸)، ولی برای شناسایی واحدهای خون آلوده به HBV در دوره قبل از دگرگونی سرمی (Pre-Seroconversion)، انجام آزمایش بر روی مجموعه‌های پلاسمایی حداکثر حاوی ۲۵ نمونه می‌تواند اثر بخش باشد(۱۱). انجام آزمایش HBV DNA بر روی هر نمونه اهدایی با توجه به هزینه‌های آزمایش به خصوص برای کشورهایی که دارای مشکلات اقتصادی هستند انجام آن را با محدودیت روبرو ساخته است(۱۹).

یکی از راه‌های کاهش احتمال خطر عفونت با HBV پس از انتقال خون، افزایش حساسیت آزمایش HBsAg است که با کاهش دوره قبل از دگرگونی سرمی و فراهم ساختن شناسایی HBsAg حتی در مقادیر بسیار کم در اهداکنندگان با عفونت مزمن HBV کاربرد دارد، حساسیت این کیت(U1tra HBsAg) کمتر از ۰/۱ng/ml برآورد شده است(۳۲، ۲۶).

نتیجه‌گیری

برای افزایش سلامت خون و کاهش موارد هپاتیت B پس از انتقال خون راه‌کارهای متفاوتی مانند غربالگری خون‌های اهدایی برای anti-HBc و HBV DNA در مجموعه‌های پلاسمایی، HBV DNA بر روی هر نمونه، و افزایش حساسیت آزمایش HBsAg مطرح است. انتخاب هر یک از روش‌های فوق پس از ارزیابی دقیق آن‌ها بر روی خون‌های اهدایی و ارزیابی امکانات موجود در مراکز انتقال خون مقدور است. برای ارزیابی کاربرد anti-HBc بر مبنای نتایج HBV DNA بر روی خون‌های اهدایی، مطالعه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

وسیع‌تری لازم است ولی بـرای جلـوگیری از چـالش‌هـای موجود لازم است استفاده از کیسه‌های خون دارای ضـمایم جانبی جهت نمونه‌گیری صحیح و بدون آلودگی، آزمـایش مولکـولی بـا روش‌هـای تمـام اتوماتیـک، اسـتفاده از آزمایش‌هایی با حساسیت زیاد و پیگیری دریافت کننـدگان خون از نظر آلودگی با ویروس هپاتیـت B پـس از تزریـق خون پیشنهاد می‌گـردد(کیسـه‌هـای خـون‌گیـری کـه دارای ضمایم جانبی هستند چون از یک سیستم بسته بـرای تهیـه نمونه آزمایش به روش‌های مولکولی استفاده می‌کنند امکان آلودگی در هنگام تهیه نمونه از آن‌ها ناچیز است ولی چون در زمان انجام مطالعه، از کیسه‌های خون‌گیری فاقد ضمایم جانبی استفاده می‌شد امکان آلودگی در هنگـام تهیـه نمونـه وجود داشته و لازم بود نتایج آزمایش مثبت با دقت بررسی شود.

کیسه‌های دارای ضمایم جانبی کیسه‌هایی هستند کـه در چند سانتی‌متری سوزن خون‌گیری دارای کیسه کوچکی بـا حجم ۳۰ml برای خون ابتدای خون‌گیری بـوده و در کنـار آن سیستمی وجود دارد که امکان استفاده از لوله‌هـای خـلا را برای تهیـه خـون بـرای آزمـایش‌هـای مولکـولی فـراهم می‌سازد.)

References :

1- Neto C, Strauss E, Sabino EC, Sucupira MCA, Chamone DAF. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from Sao paolo. Rev Inst Med trop Paolo 2001; 43(4): 203-208.
2- Sun CF, PAO CC, Wu SY, Liaw Y. Screening for Hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis. J Clinical Microbiol 1988; 26(9): 1848-52.
3- Wang J, Wang T, Sheu J, Shin L, Lin J, Chen D. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. J infectious dis 1991; 163: 397-99.
4- Bodhiphala P, Chaturachumoroenchai S, Chiewsilp P, Pruksananonda P. Detection of HBV genome by gene amplification method in HBsAg negative blood donors. J Med Assoc thai 1999; 82(5): 491-5.
5- Wang JT, Lee CZ, Chen PJ, Wang TH, Chen DS. Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of more sensitive screening. Transfusion 2002; 42(12): 1592-7.
6- Panhotra BR, Al-Bahrani A, Ui-Hassan Z. Epidemiology of antibody to hepatitis B core antigen screening among blood donors in Eastern Saudi Arabia. Need to replace the test by HBV DNA testing. Saudi Med J 2005; 26(2): 270-3.
7- Liang TJ, Bodenheimer HC Jr, Yankee R, Brown NV, Chang K, Huang J, *et al*. Presence of hepatitis B and C viral genomes in US blood donors as detected by polymerase chain reaction amplification. J Med Virol 1994; 42(2): 151-7.
8- Scully LJ, Sung H, Pennie R, Gill P. Detection of hepatitis B virus DNA in the serum of Canadian hepatitis B surface antigen negative, anti-HBc positive individuals, using the polymerase chain reaction. J Med Virol 1994; 44(3): 293-7.
9- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. Vox sang 2004; 86(2): 83-91.
10- Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lou W, Barreto S, Pereira LM, *et al*. The biological meaning of anti-HBc positive results in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. Rev Inst Med Trop S Paulo 2003; 45(3): 137-140.
11- Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B Core antigen. Blood 2002; 100(7): 2637-41.
12- Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. J Med Virol 2001; 64(3): 312-19.
13- Alhabibi F, Sallam TA, Tong CY. The significance of anti-HBc only in the clinical virology laboratory. J Clin Virol 2003; 27(2): 162-9.
14- Douglas DD, Taswell HF, Rakela J, Rabe D. Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive form a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. Transfusion 1993; 33(3): 212-6.
15- http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep-b/slide-9.html.
16- Cardoso MS, Koerner K, and Kubanek B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. Transfusion 1998; 38: 905-7.
17- Eglin R. Implementation of genome amplification technology for HCV RNA detection. Transfusion Med 2002; 12: 265-73.
18- Kleinmen SH, Kuhns MC, Todd DS, Glynn SA, McNamara A, DiMarco A, *et al*. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. Transfusion 2003; 43: 696-704.
19- Stramer SL. US NAT yield: where are we after 2 years? Transfusion Med 2002; 12: 243-253.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

20- Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei SZ, Lankarani KB, Torab A, and Moaddab A. anti-HBc and 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.
21- Tseliou P, Spiliotakara A, Dimitra Copoulos Go, Christofidou M. Detection of hepatitis B virus DNA in blood units with anti-HBc as the only positvie serological marker. Haematologia (Budap) 2000; 30(3): 159-65.
22- Silva CM, Costi C, Costa C, Michelon C, Oravec R, Ramos AB, *et al*. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. J Infect 2005; 51(1): 24-9.
23- Allain JP, Candotti D, Soldan K, Sarkodie F, Phelps B, Giachetti C, *et al*. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. Blood 2003; 101(6): 2419-25.
24- Roth WK, and Seifried E. The German experience with NAT. Transfusion Med 2002; 12: 243-253.
25- Wang JT, Lee CZ, Chen PJ, Wang TH, Chen DS Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of more sensitive screening for HBV carriers. Transfusion 2002; 42(12): 1592-7.
26- Dow BC, Peterkin MA, Green RHA, Cameron SO. Hepatitis B virus transmission by blood donation HBsAg, antibody to hepatitis B core antigen and HBV DNA. Vox sang 2001; 81: 140.
27- Almedia RP, Cardose DD. Detection of HBV DNA by nested-PCR in a HBsAg and anti-HBc negative blood bank donor. J Clin Viral 2006; 27: (Ahead of print).
28- 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(4): 450-5.
29- Christensen PB, Titlestad IL, Homburg KM, Georgsen J, Kristensen T. Hepatitis B core antibodies in Danish blood donors: a surrogate marker of risk behavior. Vox Sang 2001; 81(4): 222-7.
30- Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, Tsianso EV. Value of anti-HBV screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in northwestern Greece. Transfuison 2001; 41(5): 652-8.
31- Dreier J, Kroger M, Diekmann J, Gotting C, Kleesiek K. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc and anti-HBs Positive blood donor. Transfusion Med 2004; 14(2): 97-103.
32- Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, *et al*. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. Transfusion 2003; 43(6): 788-798.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]

Detection of hepatitis B virus DNA (PCR) in HBsAg negative, anti-HBc positive blood donors in Tehran province

Amini Kafi-abad S.[1](MD), Talebian A.[1](MD), Moghtadaie M.[1](MSc), Ranjbar Kermani F.[1](MSc), Ferdowsian F.[1](MSc), Samie Sh.[1](MSc), Taghi Nia A.[1](BS), Sobhani M.[1](BS), Ataie Z.[1](BS), Kavari M.[1](BS), Paz Z.[1](BS)

[1] *Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center*

Abstract

Background and Objectives

The incidence of post transfusion hepatitis has been reduced by blood donor screening for HBsAg, but the HBV infection is still responsible for certain cases of post-transfusion hepatitis world-wide. An estimate of the rate of HBV DNA and anti-HBc positive units is important for evaluation of the need for anti-HBc blood donor screening. In this study, the HBsAg negative blood units were evaluated for anti-HBc and all of anti-HBc positive units were tested for HBV DNA by PCR method.

Materials and Methods

Extra samples were collected from 2000 HBsAg, anti-HCV, anti-HIV and RPR-negative blood donors. All of the samples were examined by the approved anti-HBc assay. All anti-HBc positive samples were tested by anti-HBs assays and evaluated for HBV DNA (PCR). The sensitivity of the HBV DNA (PCR) assasy was estimated to be 300 geq/ml according to VQC proficiency panels.

Results

230 (11.5%) out of 2000 samples were positive for anti-HBc. 179 (77.8%) out of 230 anti-HBc positive samples were HBsAb positive, and 51(23.2%) HBsAb negative. All 230 samples were assayed for single HBV DNA (PCR) 227 of which came out to be negative for HBV DNA (PCR). Three blood donors were recalled and new samples from two of whom were collected. These new samples were negative for HBV DNA.

Conclusions

Further study for evaluation of HBV DNA in anti-HBc positive blood units with full automatic instruments and usage of blood bags with accessories is strongly recommended.

Key words: PCR, Blood donors, HBs Ag
SJIBTO 2007; 3(5):379-387

Received: 22 Feb 2006
Accepted: 27 Jan 2007

*Correspondence:*Amini Kafi-abad S., MD. Pathologist. IBTO-Research Center.
P.O.Box: 14665-1157,Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601559; Fax: (+9821) 88601559
E-mail: *amini@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-01]