

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 کافی آباد^۱، دکتر علی طالبیان^۲، مینا مقتدایی^۳، فهیمه رنجبر کرمانی^۴، فرشته فردوسیان^۵، شهرام سمیعی^۶،
افسانه تقی نیا^۷، مریم سبحانی^۸، زهرا عطایی^۹، مهناز کواری^{۱۰}، زهرا پاز^{۱۱}

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 و روشها

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 بهره برداری از دستگاههای تمام اتوماتیک و استفاده از کیسههای خون دارای ضمایم جانبی توصیه می گردد.

کلمات کلیدی: PCR، اهداکنندگان خون، HBsAg

تاریخ دریافت: ۱۴/۱۲/ ۳

تاریخ پذیرش: ۱۵/۱۱/ ۷

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

مقدمه

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

آنتی بادی بر علیه آنتی ژن مرکزی ویروس هپاتیت B (anti-HBc)، بهترین و حساس ترین شاخص سابقه تماس با ویروس هپاتیت B است. این آنتی بادی در مرحله حاد بیماری ظاهر می شود و در هپاتیت مزمن، پس از بهبودی نیز قابل شناسایی است. ارزیابی و تفسیر وجود anti-HBc بدون حضور سایر شاخص های عفونت با HBV مانند HBsAg و anti-HBs مشکل بوده و می تواند 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 آنتی بادی در خون کاهش یافته است، ۳) وجود موتاسیون در ژن HBsAg که آنتی ژن تولیدی توسط کیت های رایج قابل شناسایی نیست، ۴) دوره پنجره سرولوژیک که آنتی ژن ناپدید و آنتی بادی به تدریج ظاهر می شود، ۵) در ارتباط با سایر عفونت ها مانند عفونت با HIV و HCV مشاهده می شود، و بالاخره شایع ترین علت آن، ۶) واکنش های غیر اختصاصی و مثبت کاذب anti-HBc است (۱-۱۳، ۹)، بنابراین تثبیت و برقراری روش آزمایشگاهی جهت شناسایی واحدهای خونی که HBsAg منفی بوده ولی می توانند 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 آزمایش های 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 نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت، ۲۰۰۰ اهداکننده که در آزمایش های 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 نمونه گیری 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 جمع آوری شد. برای جلوگیری از انتقال آلودگی، برای قطع کورد کیسه خون گیری برای هر واحد از قیچی مجزا استفاده شد یا پس از ضد عفونی مورد استفاده مجدد قرار گرفت. کلیه نمونه هایی که دارای نتیجه مثبت در یکی از آزمایش های غربالگری شامل anti-HIV، HBsAg، anti-HBc و HCV RPR بودند از مطالعه حذف شدند. ۲۰۰۰ نمونه از ۲۰۶۸ نمونه جمع آوری شده در آزمایش های غربالگری منفی گزارش شدند. ۲۰۰۰ نمونه مورد بررسی و آزمایش anti-HBc با روش آنزیم ایمنواسی و HBV DNA با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) تحت بررسی قرار گرفتند.

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

پلاسمایی کلیه مراحل آزمایش بر روی آن انجام گرفت. در تعدادی از نوبت‌های کاری از نمونه‌های ران کنترل تولید (Virological Quality Control) VQC حاوی ۳۰۰۰ geq/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 کارایی 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.

یافته‌ها

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

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 هپاتیت B، حاوی DNA تخلیص شده ویروس بود.

تکثیر ژنوم ویروس (Amplification):

برای تکثیر از مخلوط اصلی حاوی الیگونوکلوئیدها 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 طولیل شدن رشته‌های مکمل با استفاده از تغییرات دما در ترمال سایکلر انجام شد.

شناسایی و ارزیابی (Detection):

۱۳ لاند 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

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-HBs و anti-HBc

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

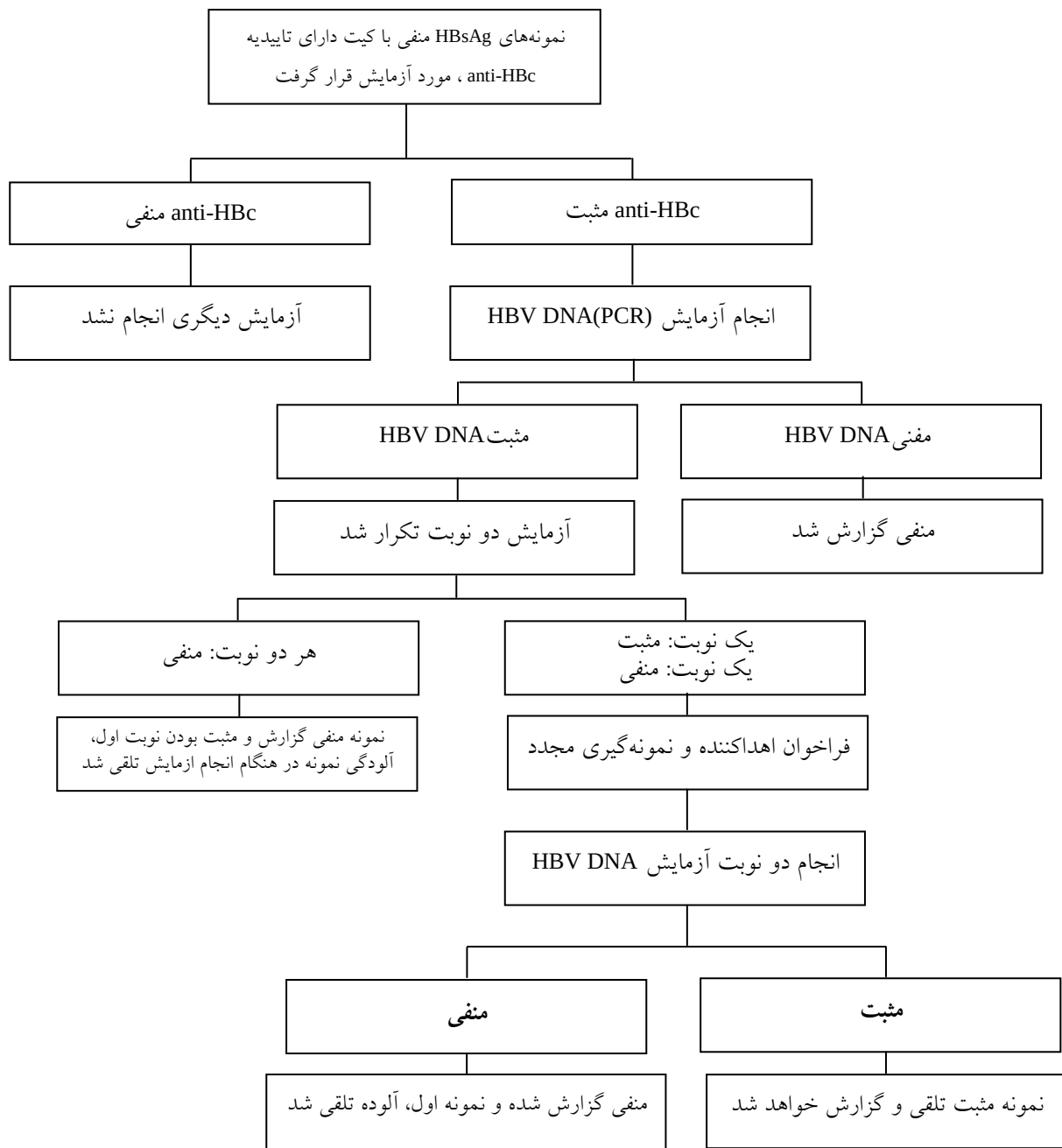
از سه بار دارای واکنش بود، به عنوان نمونه مثبت گزارش گردید. از بین ۲۱ نمونه‌ای که مجدداً برای دو نوبت دیگر بررسی شدند، ۳ نمونه از سه نوبت آزمایش، در دو نوبت مثبت بودند. برای جلوگیری از خطای آلودگی در هنگام تهیه نمونه، ۳ اهداکننده فراخوان شده و مجدداً نمونه تهیه شد. ۲ نفر از ۳ اهداکننده مراجعه کردند و نمونه جدید آن‌ها مورد آزمایش (PCR) HBV DNA 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 ۱۱٪-۱۳٪ 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 (سائوپولو) سال ۲۰۰۱، اهداکنندگان بار اول برزیل در ۱۹۹۷ و 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٪، ۰/۲٪، ۱/۵٪ بوده است (۲۲، ۲۱، ۱۱،



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

انجام شده است ۶/۵۵٪ اهداکنندگان HBsAg منفی، anti-HBc مثبت بودند که ۱۲/۲٪ آنان HBV DNA (PCR) مثبت گزارش شده اند ولی در این مطالعه حساسیت آزمایش، نحوه جمع آوری نمونه و راه های جلوگیری از آلودگی نمونه های منفی با نمونه های مثبت بیان نشده است (۲۰).

در این مطالعه از بین ۲۳۰ اهداکننده HBsAg منفی که

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 ۵۰۰۰ copies/ml برآورد شده است (۱۱، ۱۶، ۲۱).

در مطالعه ای که در شیراز بر روی اهداکنندگان خون

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 ۱۰-۳۰ copies/ml تا ۵۰ IU/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 در 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، و 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 (۳۰-۲۸، 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 کارایی 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 (Uitra HBsAg) کمتر از ۰/۱ ng/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

در زمان انجام مطالعه، از کیسه‌های خون‌گیری فاقد ضمایم جانبی استفاده می‌شد امکان آلودگی در هنگام تهیه نمونه وجود داشته و لازم بود نتایج آزمایش مثبت با دقت بررسی شود.

کیسه‌های دارای ضمایم جانبی کیسه‌هایی هستند که در چند سانتی متری سوزن خون‌گیری دارای کیسه کوچکی با حجم ۳۰ ml برای خون ابتدای خون‌گیری بوده و در کنار آن سیستمی وجود دارد که امکان استفاده از لوله‌های خلا را برای تهیه خون برای آزمایش‌های مولکولی فراهم می‌سازد.

وسیع‌تری لازم است ولی برای جلوگیری از چالش‌های موجود لازم است استفاده از کیسه‌های خون دارای ضمایم جانبی جهت نمونه‌گیری صحیح و بدون آلودگی، آزمایش مولکولی با روش‌های تمام اتوماتیک، استفاده از آزمایش‌هایی با حساسیت زیاد و پیگیری دریافت کنندگان خون از نظر آلودگی با ویروس هپاتیت B پس از تزریق خون پیشنهاد می‌گردد (کیسه‌های خون‌گیری که دارای ضمایم جانبی هستند چون از یک سیستم بسته برای تهیه نمونه آزمایش به روش‌های مولکولی استفاده می‌کنند امکان آلودگی در هنگام تهیه نمونه از آن‌ها ناچیز است ولی چون

References :

- Neto C, Strauss E, Sabino EC, Sucupira MCA, Chamone DAF. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from Sao paulo. *Rev Inst Med trop Paulo* 2001; 43(4): 203-208.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox sang* 2004; 86(2): 83-91.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. *Transfusion* 1993; 33(3): 212-6.
- <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep-b/slide-9.html>.
- 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.
- Eglin R. Implementation of genome amplification technology for HCV RNA detection. *Transfusion Med* 2002; 12: 265-73.
- 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.
- Stramer SL. US NAT yield: where are we after 2 years? *Transfusion Med* 2002; 12: 243-253.

- 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 positive serological marker. *Haematologia (Budap)* 2000; 30(3): 159-65.
- 22- Silva CM, Costi C, Costa C, Michelin 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. *Transfusion* 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.

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) assay 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